

UCH-FC-
MAG-EBE
R 579
C.1

Fisura labiopalatina no sindrómica (FLPNS): análisis molecular del gen candidato *Sonic hedgehog* (SHH) en una muestra de la población chilena.

Tesis

Entregada a la Universidad De Chile
en Cumplimiento Parcial de los Requisitos
para Optar al Grado De

Magíster en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias



Por

RAMIRO JAVIER RINCÓN RODRÍGUEZ

agosto, 2008

Director de Tesis

Dr. Rafael Blanco Castillo

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAESTRÍA

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Maestría presentada por el candidato.

RAMIRO JAVIER RINCÓN RODRÍGUEZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Biología Celular, Molecular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 23 de julio de 2008.

Director de Tesis:

Dr. Rafael Blanco Castillo

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Verónica Palma Alvarado

Dr. Eli Poulin

Dr. José Luis Santos



The image shows three handwritten signatures in blue ink, each followed by a horizontal dotted line. To the right of the signatures is a circular stamp. The stamp contains the text 'FACULTAD DE CIENCIAS' at the top, 'BIBLIOTECA CENTRAL' in the middle, and 'U. DE CHILE' at the bottom.

DEDICATORIA

A Maria, Marina, Natalia y Alejandro.





AGRADECIMIENTOS:

Al doctor Rafael Blanco porque me permitió con sus orientaciones, opiniones y sugerencias crecer espiritual y académicamente.

Al doctor José Suazo por su paciencia y disposición durante todo el tiempo para compartir sus experiencias y conocimientos adquiridos.

A los pacientes con FLPNS y sus familias, porque fueron la base para realizar esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio: Adrián, por sus comentarios alegres que aportaba cada día; Gonzalo, por sus vivencias compartidas; David por su apoyo académico incondicional; Lorena, por su música y compartir un café todos los días; Patricio, por sus aportes y comentarios en el laboratorio y Viviana por su paciencia y disposición como secretaria en la impresión de esta tesis.

Y todos aquellos que de una u otra forma incidieron en esta tesis.

INDICE



Resumen	x
Introducción	1
Marco Teórico	3
Fisura labiopalatina no sindrómica (FLPNS), etiología y epidemiología	3
<i>SHH</i> y el desarrollo de las estructuras del tercio medio facial	7
Migración de Células de la cresta neural al primordio facial y los arcos branquiales	10
Desarrollo del septum nasal y neurocraneo anterior	12
Transformación epitelio-mesenquima	14
<i>SHH</i> esta asociado al síndrome de la holoprosencefalia	17
Estudios poblacionales que involucran al cromosoma 7	20
Hipótesis	21
Objetivo General	22
Objetivos Específicos	22
Materiales y métodos	24
Diseño del estudio	24
Criterios de selección de la muestra	24
Análisis Genético-Molecular para la determinación de variantes en la secuencia del gen <i>SHH</i>	26
Extracción de DNA genómico total	26

Método de CSGE (conformation-sensitive gel electrophoresis)	27
Secuenciación de DNA	31
Identificación de variantes de los genes en estudio	32
Análisis genético utilizando SNPs	32
Métodos de análisis estadísticos	35
Tamaño de la muestra	38
Resultados	39
Discusión	46
Conclusiones	49
Bibliografía	50



LISTA DE TABLAS

- TABLA 1. Segmentos, partidores y condiciones de amplificación
- TABLA 2. Características de los SNPs seleccionados del gen *SHH*.
- TABLA 3. Equilibrio de Hardy-Weinberg para los SNPs de *Shh* rs1233556 y rs1233555
- TABLA 4. Análisis de asociación alélica entre dos SNPs de *SHH* y FLPNS.
- TABLA 5. Análisis de asociación genotípica entre dos SNPs de *SHH* y FLPNS.
- TABLA 6. Análisis de asociación haplotípica entre dos SNPs de *SHH* y FLPNS.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Formación de cara en embrión de ratón.
- Figura 2. Formación del labio superior y el paladar en embrión de cuatro a cinco y media semanas..
- Figura 3. Frecuencia de fisura labiopalatina y miscegenación en diversas poblaciones de Chile.
- Figura 4. Vía de señalización Hh.
- Figura 5. Gen *SHH*.
- Figura 6. Esquema del principio del análisis de heteroduplex.
- Figura 7. Gel MDE y secuenciamiento del segmento con movilidad alterada.
- Figura 8. Gel MDE para tres segmentos del gen *SHH* en cuatro tríos.
- Figura 9. Resultados de la acción de las endonucleasas.

LISTA DE ABREVIATURAS

FLPNS: Fisura labiopalatina no sindrómica

SHH: *Sonic hedgehog* en humanos

Shh: *Sonic hedgehog* en ratón, rata, pollos y peces

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PCR–RFLP: PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism

Bmp: Proteína morfogenética ósea

Fgf: factor de crecimiento fibroblástico

Tgf-β: factor de crecimiento transformante beta

NCC: célula de la cresta neural

CNCC: célula de la cresta neural craneal

BA: arcos branquial

Hh: señalización Hedgehog

EMT: transformación epitelio-mesenquima

Smo: Smoothened

IRMADEMA: Instituto de Rehabilitación de Malformaciones y Deformaciones

Máxilofaciales

CEANFI: Centro de Amigos del Niño Fisurado

EDTA: Acido Etileno Diamino Tetracético

CSGE: conformation-sensitive gel electrophoresis

MDE: análogo de la archilamida

C: Citocina

T: Timina

CC: Citosina-Citocina

CT: Citosina-Timina

TT: Timina-Timina

PRV: Prueba de razón de verosimilitud

LRT: Likelihood Ratio Test

TDT: prueba de desequilibrio de transmisión

RESUMEN

Introducción: La fisura labiopalatina no sindrómica (FLPNS) es una malformación congénita, producida por alteraciones en la fusión de procesos faciales y/o palatinos durante la vida intrauterina. Se ha postulado que en su etiología participarían varios genes candidatos, que interactuarían entre sí más la influencia del medioambiente. Uno de estos genes es *Sonic hedgehog (SHH)*, cuyas mutaciones y haploinsuficiencia están involucradas en el síndrome de la holoprosencefalia en humanos, que presenta entre sus anomalías la fisura labiopalatina. Evidencias experimentales han demostrado que mutaciones de *SHH* producen fenotipos similares a FLPNS. Estudios en población humana, han propuesto que la región distal al brazo largo del cromosoma 7q34 es una región candidata para contener loci asociados a FLPNS. *SHH* se ubica en 7q36.3. Dados estos antecedentes se realizó un estudio de mutaciones y adicionalmente un estudio de asociación entre polimorfismos del gen *SHH* y la FLPNS en la población chilena.

Metodología: Se analizaron 150 tríos caso-progenitores y 150 controles. Se analizó las regiones exónicas e intrónicas adyacentes a los exones de este gen, en busca de mutaciones causales utilizando el método de heteroduplex en geles MDE. En una segunda etapa, se seleccionaron tres SNPs de *SHH*, rs1233556 (intrón uno), rs9333613 (intrón uno) y rs1233555 (intrón uno), y se

genotificaron para cada individuo de las muestras en estudio, mediante PCR-RFLP. Se analizó la asociación a nivel alélico, genotípico y haplotípico con la FLPNS, en las muestras tríos caso-progenitores, caso-control y la combinación de ambas muestras.

Resultados: No se encontraron mutaciones causales en las regiones exónicas e intrónicas adyacentes a los exones analizadas. Para la muestra de caso-progenitores, no se observaron alelos o haplotipos preferentemente transmitidos desde los progenitores a la progenie afectada. En esta muestra, no se observaron otros resultados significativos para alelos, genotipos y haplotipos. El estudio de la muestra caso-control mostró un resultado de asociación global significativo para rs1233555 a nivel alélico (LRT $p=0.028$), pero sin presentar alelos de riesgo. En el caso de la muestra combinada, se presentó un resultado global significativo para el mismo SNP (rs1233555) pero a nivel genotípico (LRT $p=0.04228$). Ningún genotipo en particular presentó un riesgo incrementado para FLPNS. Para esta muestra no se presentaron otros resultados significativos para alelos, genotipos o haplotipos.

Conclusiones: Dado que se encuentran resultados significativos globales en el estudio de asociación caso-contróles y en la muestra combinada para rs1233555, no se puede afirmar fehacientemente que el gen *SHH* esté involucrado en la expresión fenotípica de FLPNS en la población chilena con los resultados del presente estudio. No obstante no se puede excluir su posible participación dado el diseño de análisis y posiblemente debido al tamaño muestral utilizado.

Palabras claves: FLPNS, *SHH*, SNPs.

Introduction: Non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCLP) is a congenital malformation caused by alterations in the merger facial processes and/or palate during intrauterine life. It has been postulated that several candidate genes participate in its etiology which interact with each other plus the influence of the environment. One of these genes is *Sonic hedgehog (SHH)*, whose haploinsufficiency and mutations are involved in the holoprosencephalia syndrome in humans, which among other anomalies presents cleft lip and palate. Experimental evidence has shown that mutations in *SHH* produce phenotypes similar to NSCLP. Studies in human population, have proposed that the region distal to the long arm of chromosome 7q34 region is a candidate to contain loci associated with NSCLP. *Shh* is located in 7q36.3. Based in the aforementioned antecedents a study of mutations and additionally a study of association between polymorphisms of the gene *Shh* and NSCLP was conducted in the Chilean population.

Methodology: We analyzed 150 case-parent trios and 150 controls. We analyzed the exons and intron regions adjacent to the exons of this gene, looking for possible causal mutations using the heteroduplex method in MDE gels. In a second stage, we selected three *SHH* SNPs, rs1233556 (intrón one), rs9333613 (intrón one) and rs1233555 (intrón one) genotyping each individual in the sample, using PCR-RFLP. We analyzed the allele, genotypic and haplotypic

association with NSCLP in the sample of case-parents trios, case-controls and in the combination of both samples.

Results: We found no causal mutations in the intronic regions adjacent to exons and in the exons analyzed. In the sample of case-parents, no alleles or haplotypes were preferably transmitted from parents to affected offspring. In this sample, there was no other significant results for alleles, genotypes and haplotypes. The study of the sample case-control showed a significant result of global partnership for rs1233555 to level alleles (LRT $p = 0.028$), but without presenting risk alleles. In the case of the combined sample, a significant result was obtained also for the same SNP (rs1233555) but at genotypic level (LRT $p = 0.04228$). No particular genotype presented an increased risk for NSCLP. This sample did not show significant results at the allele, haplotype or genotype levels.

Conclusions: Given that there are significant results in the case-controls and in the combined sample for rs1233555, one cannot reliably say that the *Shh* gene is involved in the expression of NSCLP in the Chilean population with. However, we can not exclude the possible involvement of *SHH* possibly due to size of the analyzed sample.

INTRODUCCIÓN

La fisura labiopalatina no sindrómica (FLPNS), es una anomalía congénita producida por una falta de fusión de los procesos frontonasal medial, los procesos maxilares y/o laminas palatinas de los procesos maxilares, septum nasal y maxilar primario o premaxila (Murray, 2002; Helms y col., 2005; Radlanski y Renz, 2006; Chai y Maxson, 2006). Es una de las anomalías congénitas más frecuentes en el mundo y en Chile (Murray, 2002).

En la etiología genética de esta malformación, estudios experimentales en animales, demuestran que mutaciones y haploinsuficiencia de algunos genes, expresan fenotipos similares a FLPNS (Murray, 2002). Evidencias experimentales en ratón (Rice y col., 2004; Rice y col., 2006), pollo (Hu y col., 2003; MacDonald y col., 2004) y pez cebra (Brand y col., 1996; Wada y col. 2005) demuestran que factores de crecimiento están involucrados en la activación de varias vías de señalización entre el mesenquima y los epitelios de los procesos frontonales mediales y laterales, maxilar, láminas horizontales palatinas y septum nasal (Chai y Maxson, 2006). Los factores de crecimiento, Fgf10 y Bmp4, inducen la expresión de *Sonic hedgehog* (*SHH*) en el epitelio oral palatino (Rice y col., 2006; Gritti-Linde A., 2007), desde allí *SHH* se expresa en el mesenquima palatal, para controlar la expresión de su propio receptor Ptc1 y otro factor de crecimiento Bmp2 (Rice y col., 2004). *SHH* regula la señalización molecular que interviene en la migración de las células de la cresta

neural (NCCs), la inducción, diferenciación, proliferación y apoptosis celular de las estructuras que forman el labio superior, nariz y paladar (Rice y col., 2006). Además, SHH interactúa con la Proteína morfogenética ósea (Bmp) y el factor de crecimiento fibroblástico (Fgf) para modular la fusión de estos procesos craneofaciales (Zhang y col., 2002; Rice y col., 2004).

En humanos, mutaciones y haploinsuficiencia de *SHH* están asociadas con el síndrome de la holoprosencefalia (Nieuwenhuis y Hui, 2004), el cual afecta el desarrollo de las estructuras craneofaciales mediales y el desarrollo del tercio medio y superior facial (Zhang y col., 2006).

Estudios de análisis genéticos en humanos, que utilizaron métodos paramétricos (ligamiento) y no paramétricos (prueba de desequilibrio de transmisión, TDT), encontraron asociación de algunos genes con FLPNS (Schutte y Murray, 1999.). *SHH* no fue incluido en estos estudios (Gritli-Linde A., 2007). Sin embargo, Orioli et al, realizó un estudio en humanos, para determinar la relación de *SHH* y FLPNS, sus resultados no fueron contundentes (Orioli y col., 2002). A partir del año 2000, comienzan a publicarse numerosos estudios de barrido amplio del genoma (Genome Wide Scan) de cuyos resultados surgen proposiciones de nuevas regiones cromosómicas que pudiesen tener genes candidatos (Marazita y col., 2002, 2004, Moreno y col., 2004), entre estas regiones, el brazo largo del cromosoma 7, en donde se ubica *SHH* (Wyszynski y col., 2003).

Este trabajo, basado en estos argumentos, analiza los exónes y regiones intrónicas adyacentes a los exónes del gen *SHH*, tres SNPs de *SHH*, rs1233556, rs9333613 y rs1233555, se genotipificaron para cada individuo mediante PCR-RFLP. Se realizaron análisis de asociación tríos casosprogenitores, caso-control y la combinación tríos caso-progenitores-controles, a nivel de alelos, genotipos y haplotipos para determinar su posible asociación en la etiología de la FLPNS.

MARCO TEÓRICO

Fisura labiopalatina no sindrómica (FLPNS), etiología y epidemiología.

Aproximadamente entre la tercera y cuarta semana del desarrollo craneofacial en humanos, aparecen tres prominencias, el proceso frontal y los procesos maxilares, estos últimos, derivados del primer arco branquial. En una etapa posterior del desarrollo, el proceso frontal originará los procesos frontonasales laterales y los procesos frontonasales mediales (figura1), los frontonasales mediales se fusionan y se desarrollan más que los laterales, los cuales se fusionan con los procesos maxilares para formar el labio superior, la punta de la nariz y la premaxila o paladar primario (Radlanski y Renz, 2006; Chai y Maxson, 2006). Alrededor de la sexta semana, las láminas palatinas de los procesos maxilares se elevan y se fusionan entre si en la línea media con el septum nasal y el paladar primario para formar el paladar ósea secundario (figura 2). Fallas

en la unión de los procesos frontonasal medial y los procesos maxilares originan una fisura labial unilateral del lado izquierdo o derecho y cuando, además, se presentan fallas en la fusión de las láminas palatinas, el paladar primario y el septum nasal se originan las fisuras labiopalatinas uni o bilateral, ésta última es la más severa (Murray, 2002).

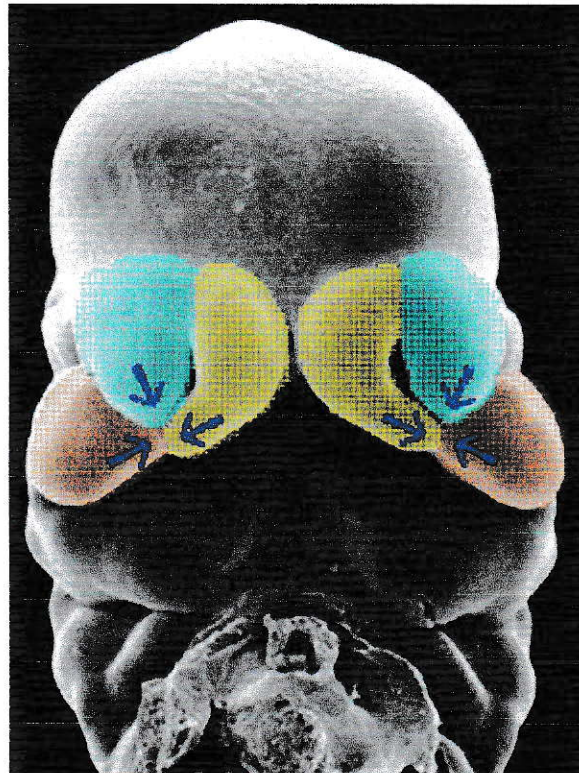


Figura 1. Formación de cara en embrión de ratón. Microfotografía de ratón, aproximadamente a los 12 dpc, obtenida de <http://www.med.unc.edu>, en donde se observan los procesos frontonasal medial (color amarillo), los nasal lateral (color azul) y maxilares (color rojo).

En el origen de estas fisuras, posiblemente las células de la cresta neural, tuvieron fallas en la migración hacia los procesos craneofaciales o cuando llegaron a sus destinos (Santagati y Rijli, 2003). Es posible que se presenten

fallas en la inducción de estos tejidos por las células de la cresta neural, así como también, en la formación del septum nasal, o es posible que se presentaran fallas posteriores en los proceso de transformación epitelio-mesenquima (Hu y col., 2003; Santagati y Rijli, 2003). Parece ser que en estos eventos participan y se interrelacionan varias vías de señalización como BMP4, FGF, FGE, MSX1 y SHH, entre otras (Haworth y col., 2006; Gritli-Linde A., 2007).

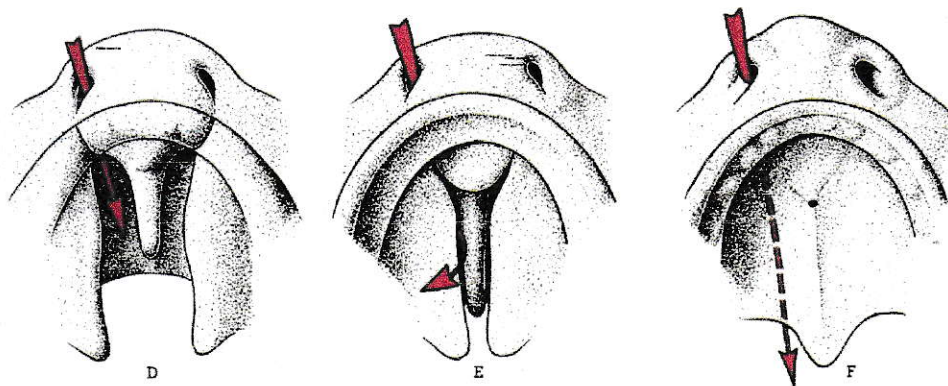


Figura 2. Formación del labio superior y el paladar en embrión de cuatro a cinco y media semanas. Dibujo de un embrión, en donde se observan como las láminas palatinas se elevan para fusionarse con el septum nasal y paladar primario para formar el paladar duro secundario. (Extraído de Carlson BM. *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. 2ª Edición. Editorial Harcourt 2000).

Cuando se presentan fisuras labiopalatinas no asociadas a un síndrome se denominan fisura labiopalatina no sindrómica (FLPNS, OMIM 119530). En su etiología existe factores genéticos y ambientales (Gritli-Linde, 2007). La FLPNS es una de las anomalías congénitas más frecuentes en el mundo (Murray,

2002). FLPNS presentan mayor frecuencia en las etnias amerindia y asiática, 3.6 y 2.1 por 1000 nacidos vivos, respectivamente (Tolarova y Cerenka, 1998; Vanderas AP, 1987). En Chile la tasa de prevalencia de FL/P se ubica en el tercer lugar entre las malformaciones congénitas (Nazer y col., 2001). En Chile la tasa promedio para la FLPNS, es 1.5 por 1000 nacidos vivos, siendo afectado los varones más que las mujeres (1.7 para varones y 1.3 para mujeres).

Palomino y col. (1997 (a)), relacionaron la composición étnica, estratificación socioeconómica y presencia de FLPNS en la población de Santiago. Estos autores encontraron que el estrato socioeconómico bajo tenía aproximadamente 40% de mezcla amerindia y una tasa de 1.8 por 1000 nacidos vivos, más alta que la tasa promedio del país. Mientras que el estrato socioeconómico alto tenía menos del 20% de mezcla amerindia y una tasa de tan solo el 0.8 por 1000 nacidos vivos. Estos hallazgos, son corroborados por Palomino y col. (1997 (b)), quienes relacionaron las instituciones que atienden la población con FLPNS, el porcentaje de mezcla indígena y las tasas de FLPNS en Chile. En la figura 3, se observa la regresión lineal en donde se relacionan esas variables. Ellos encontraron que las instituciones que atienden poblaciones de estratos socioeconómico alto, están relacionadas con poblaciones que tienen un porcentaje bajo de mezcla indígena y bajas tasas de FLPNS, por ejemplo, la "Clínica Las Condes". En el lado opuesto se ubican aquellas instituciones que atienden población de estrato socioeconómico bajo o medio, las cuales están relacionadas con poblaciones que presentan altas tasas

de FLPNS y altos porcentajes de mezcla indígena, por ejemplo el “Hospital de Arica”. Sin embargo, muy lejos de esta regresión se ubican instituciones como el “Hospital público de Rancagua” y el “Hospital de Chuquicamata” los cuales se encuentran en regiones mineras, en donde el medio ambiente es afectado por las condiciones de los procesos de explotación, lo que se podría afirmar, que factores medioambientales pueden estar involucrados en la etiología de la FLPNS.

Cuando un individuo es afectado por la FLPNS, no sólo se afecta el individuo, sino también, se afecta su entorno familiar y comunitario. Su tratamiento y rehabilitación empieza desde el nacimiento y continúa hasta los 20 a 25 años. Para ello se requiere de un equipo multidisciplinario de salud especializado, lo cual tiene costos muy altos que las familias y las comunidades de los afectados no pueden cubrir, convirtiéndose en un problema de salud pública.

SHH y el desarrollo de las estructuras del tercio medio facial.

Las estructuras faciales en mamíferos son el producto de las interacciones entre estructuras derivadas del tubo neural (Cerebro anterior), células de la cresta neural (Cresta neural craneal), arcos branquiales (Primer arco branquial, de donde se deriva el maxilar y la mandíbula) y estructuras faciales mediales (Septum nasal). (Zhang y col., 2002; Hu y col., 2003; Santagati y Rijli, 2003), estas interacciones, incluyen procesos de migración, inducción, diferenciación, crecimiento y apoptosis celular (Gritli-Linde A., 2007). En ratones,

aproximadamente a los 12 dpc, la prominencia nasal medial y los dos procesos maxilares forman el paladar primario y el labio superior. El paladar secundario se forma por fusión de las láminas palatinas del maxilar alrededor del 14 dpc (Sania y col., 2005). Fallas en estos procesos producen fenotipos similares a la fisura labio palatina (FLP) en humanos (Rice y col., 2004).

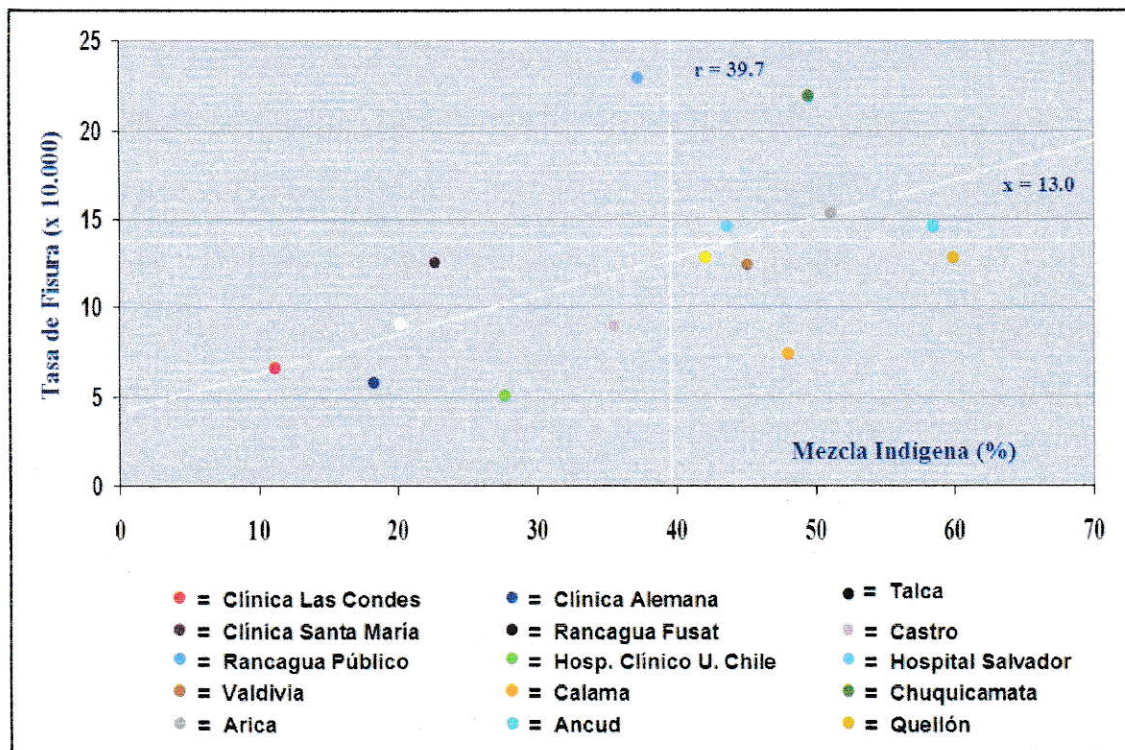


Figura 3. Frecuencia de fisura labiopalatina y miscegenación en diversas poblaciones de Chile (Palomino y col. 1997(b), ver texto).

En ratones, los eventos moleculares relacionados con la formación de las estructuras orofaciales, están bajo el estricto control de un arreglo de genes que incluye: miembros de las familias de factores de crecimiento fibroblástico (*Fgf*),

sonic hedgehog (*Shh*), proteínas morfogenéticas óseas (*Bmps*) y factor de crecimiento transformante beta (*Tgf-β*), entre otros y factores de transcripción tales como *Dlx*, *Pitx*, *Hox* y *Gli* (Zhang y col., 2002, Ricea y col., 2006, Gritti-Linde, 2007).

La señalización de factores de crecimiento recíproco entre el mesenquima y epitelio del paladar es importante para el crecimiento temprano y modelamiento de las laminas horizontales palatinas, previa a su elevación para ubicarse arriba de la lengua, se produce una señalización compuesta entre otros, por las vías de BMP, FGF y SHH (Zhang y col., 2002; Rice y col., 2004). *Fgf10* y *Bmp4* inducen la expresión de *Shh* en el epitelio oral palatino, desde allí *Shh* se expresa en el mesenquima palatal, para controlar la expresión de su propio receptor *Ptc1* y otro factor de crecimiento *Bmp2* (Rice y col., 2004).

Basados en los eventos involucrados en la formación del labio y el paladar en ratones, temporal y espacialmente, se podría dividir éstos arbitrariamente en: 1. Migración de las células de la cresta neural (NCCs) a los arcos branquiales y bolsas faríngeas. 2. Desarrollo del septum nasal y neurocráneo anterior, y 3. Transformación epitelio-mesenquima, muy relacionado con el evento inmediatamente anterior. Esta división permite facilitar el análisis de *SHH* en el proceso de desarrollo del labio superior, paladar primario y secundario.

1. Migración de las células de la cresta neural (NCCs) al primordio facial y los arcos branquiales

Las NCCs son una población de precursores multipotenciales que dan origen al empalme entre el tubo neural prospectivo y la epidermis durante los estadios tempranos del desarrollo. Sus diversos destinos incluyen varios tipos celulares entre el sistema nervioso periférico, melanocitos, células endocrinas, y muchas del tejido óseo, cartílago y tejido conectivo facial y craneal (Santagati y Rijli, 2003, Kang y Svoboda, 2005). Las NCCs que contribuyen a la cara, se originan desde el cerebro anterior, medio y posterior. Esas células de la cresta neural craneal (CNCCs) siguen un camino bien definido hacia el lado ventrolateral de la cabeza, donde ellas colonizan el mesenquima del primordio facial (denominado ectomesenquima para diferenciarlo del mesenquima que proviene del mesodermo) tales como, la prominencia frontonasal y los arcos branquiales ((BAs), también conocidos como arcos faringeos). Una vez posicionadas, las CNCCs proliferan y se diferencian en distintos elementos craneofaciales (Jeong y col., 2004).

Las células ectomesenquimales necesitan inducción posicional en un orden para generar las estructuras elaboradas de la cara. Si los mecanismos de inducción, se inician, se ejecuta un programa específico de diferenciación entre CNCCs, lo cual requiere la actividad modulada de reguladores transcripcionales. Varias familias de factores de transcripción son expresados en el

ectomesenquima, incluyendo genes tales como *Hox*, *Dlx*, *Msx*, *Hand*, *Pax*, *Prx* y *Fox* (Jeong y col., 2004, Kang y Svoboda, 2005).

Jeong y col. (2004), encontraron que la pérdida de la vía de señalización Hedgehog (Hh) en NCCs tiene un efecto profundo sobre las estructuras craneofaciales. Los defectos incluyen componentes esquelético y no esqueléticos de la cabeza, pero notablemente no afecta el sistema nervioso periférico, el cual es también derivado del NCCs. Basado en esta y otras evidencias, concluyeron que la vía de señalización Hedgehog es indispensable para la generación y migración de NCCs. Esta vía de señalización, también es esencial para las etapas tardías en el desarrollo craneofacial involucrando la posmigración de CNCCs en el primordio facial. Los componentes esqueléticos en y alrededor del paladar (procesos palatal, pre-esfenoide, palatino y pterigoide del maxilar y vomer) y en la región del oído (hueso gonial, anillo timpánico, martillo, yunque, estribo y procesos estiloides) también como las partes no esqueléticas, tales como, la lengua y los incisivos inferiores, están ausentes, sugiriendo que esas estructuras están moduladas por la vía de Hh en NCCs. Por otra parte, el proceso dentario, el cartílago de Meckel, el hueso yugal y el proceso zigomático del maxilar están presentes pero reducidos, lo cual puede reflejar una influencia directa o indirecta de la vía de señalización Hh sobre el crecimiento de BAs (Jeong y col., 2004).

Jeong y col. (2004), concluyeron que *Shh* es exclusivamente responsable para la vía de señalización en la cara previo al E12 y que esta vía de señalización regula la expresión ectomesenquimal de cinco genes *Fox* (*Foxc2*, *Foxd1*, *Foxd2*, *Foxf1* y *Foxf2*) durante el desarrollo craneofacial (Jeong y col., 2004).

2. Desarrollo del septum nasal y neurocraneo anterior.

Algunos estudios mostraron que la inactivación de *Shh* u otros componentes de la transducción de la vía de señalización causaron defectos en el patrón mediolateral de los cartílagos en la fusión en la línea media en pez cebra (Brand y col., 1996; Schilling, 1997; Kimmel y col., 1995). Similarmente en ratones, mutaciones de *Shh* que producen pérdidas de la función, causan severos defectos en el crecimiento craneal y la pérdida del crecimiento de todos los huesos craneales (Santagati y Rijli, 2003, Chiang y col., 1996). Mutaciones de *SHH* en humanos expresan el síndrome de la holoprosencefalia, acompañada por defectos craneofaciales de la línea media y el proceso frontonasal (Muenke y Beachy, 2000).

En pez cebra, *Shh* puede compartir este rol con *tiggywinkle hedgehog (twhh)*, el cual es expresado en similares patrones. Mutaciones *sonic you (syu)* en pez cebra, alteran la expresión de *Shh*. Wada y col. (2005) realizó experimentos en embriones en diferentes estadios del desarrollo con estas mutaciones, las trataron con ciclopamina (inhibidor de *Shh*) y estudiaron el patrón esquelético y la

morfogénesis. Los resultados sugieren que Shh actúa en diferentes tiempos y regiones, lo cual ayuda a explicar el espectro de los defectos de polaridad medio-lateral observada en peces, ratones y humanos en la vía de señalización de Hh. La señal Hh (Varjosalo y Taipale, 2007) (figura 4), actúa tempranamente en la esqueletogénesis en la línea media y tardíamente promueve la condrogénesis, estos orígenes múltiples de Shh induce el patrón esquelético. En pez cebra, los dos principales cartílagos: el plato etmoides y el trabeculado, originado de diferentes precursores, dependen de la señalización de Hh para su desarrollo. Alteraciones de la señalización Hh en mutantes *syu* en pez cebra o en embriones tratados con ciclopamina durante la gastrulación causa ciclopía. La vía de señalización Shh, está asociado con la fusión trabecular y la pérdida del etmoides medial, posiblemente por la ausencia de NCCS, lo cual produce la fusión trabecular en la línea media ventral y la pérdida de la condrogénesis en el neurocráneo anterior (Wada y col. 2005). Experimentos con trasplantes de células sugirieron que hay dos orígenes de Shh en este proceso, el tubo neural ventral y el ectodermo oral, lo cual fue demostrado experimentalmente con injertos celulares. Trasplantes de células del tubo neural ventral de pez cebra Wild-type en el cerebro anterior en embriones deficientes en Hh, rescatan localmente el desarrollo del neurocráneo anterior y separan el trabeculado en la línea media. También, este grupo logró con injertos ectodermales orales, rescatar la condrogénesis en el neurocráneo anterior (Wada y col., 2005). Estos resultados de Wada et al., son consistentes con experimentos en pollo, lo que sugiere, que Shh del ectodermo facial promueve el crecimiento frontonasal y

maxilar (Hu y col., 2003; MacDonald y col., 2004). Los mecanismos por los cuales SHH controla el crecimiento coordinado y la fusión de los primordios faciales son altamente conservados entre los vertebrados. El tubo neural y ectodermo oral en la línea media forma un centro organizador que controla el crecimiento esquelético y la morfogénesis. Los dos tejidos expresan SHH. Mutaciones en ratones y humanos que alteran el epitelio escamoso oral usualmente causa FLP, presumiblemente como respuesta a defectos en esos centros de señalización (Celli y col., 1999). En humanos, mutaciones en el gen *SHH* con pérdida de función, causa holoprosencefalia acompañado de anomalías faciales incluyendo ciclopía y FLP. (Nanni y col., 1999).

Estos resultados sugieren un rol para *SHH* en el movimiento de las NCCs en la línea media, como también en su diferenciación, formación y patrón del cartílago medial (septum nasal en humanos), y su rol en la generación de FLP (Celli y col., 1999; Hu y col., 2003; MacDonald y col., 2004; Wada y col., 2005).

3. Transformación epitelio-mesenquima.

El epitelio delimita el ambiente externo de las estructuras que intervienen en la formación del labio superior y paladar, mientras el mesenquima se encuentra en la parte interna de estas estructuras. La función de la barrera epitelial es parcialmente soportada por las uniones célula-célula, tales como, las uniones fuertes y desmosomas. Además, las células epiteliales normalmente tienen

polaridad basal-apical y se unen a la lámina basal por hemidesmosomas (Kang y Svoboda, 2005). En contraste, las células mesenquimales son más móviles y rodeadas por matriz extracelular. Un fenotipo de transformación desde el epitelio al mesenquima (transformación epitelio-mesenquima (EMT)), requiere una secuencia de expresión génica regulada (Kang y Svoboda, 2005).

La fusión de labio y el paladar ocurre cuando dos láminas de epitelio se fusionan y se transforman a través de EMT. Los dos tejidos tienen una pérdida de uniones célula-célula, ruptura de la lámina basal e incremento de la movilidad. Sin embargo, en el paladar, este proceso es complejo, porque, los dos procesos de superficies epiteliales, primero se unen una a otra, después las células de las superficies tienen que desprender una capa de células muertas antes del proceso de EMT (Kang y Svoboda, 2005). Experimentos *In vitro*, cuando las láminas palatinas fueron removidas del maxilar y colocadas sobre sustratos, la fusión y EMT progresó, con una confluencia mesenquimal completa a las 72 horas y se demostró que GfgR2 media la expresión del gen *SHH* en el epitelio (Kang y Svoboda, 2005).

Expresión de Shh en el epitelio fue deregulado en ratones mutados *Fgfr2b*^{-/-} y *Fgf10*^{-/-}, *In Vitro*, donde se demuestra que la proteína FGF10 recombinante, induce proliferación celular y la expresión del gen *Shh* en el epitelio palatal y estos dos eventos inducen la expresión del receptor Patched 1 (Ptc1) en el mesenquima adyacente. Esto sugiere que Shh actúa corriente abajo de la

señalización *Fgf10/Fgfr2b* y estimula la proliferación mesenquimal (Rice y col., 2004). Péptidos exógenos de *Shh* inducen la proliferación en explantes mesenquimales palatales aislados y la inactivación de *Shh* en el epitelio oral produce un fenotipo de fisura similar al producido por mutantes de *Fgfr2b*^{-/-} y *Fgf10*^{-/-}. La ausencia de *Smoothed (Smo)* en el epitelio no altero el desarrollo del paladar. Así, la señal de *Shh* a través de *Smo*, confirma que el tejido blanco de *Shh* no es el epitelio sino el mesenquima (Rice y col., 2004). *Shh* se expresó en el epitelio oral en ratones en el estadio de desarrollo E11.5 hasta E15.5, pero sólo en las áreas que habían engrosado. Desde el estadio E14.5-E15.5 su expresión se volvió restringida a la formación de las arrugas del paladar en el epitelio oral palatino, las cuales son pequeñas áreas de engrosamiento en el epitelio oral del paladar (Rice y col., 2006). Los receptores *Ptc1* y *2* se expresaron en el mesenquima adyacente al epitelio oral del paladar en E13 y 14.5. En E13 *Ptc2* también se expreso en el epitelio oral palatal. La expresión mesenquimal de *Ptc1* fue mucho más fuerte que *Ptc2*. *Smo*, el cual es requerido para la activación de la cascada de señalización intracelular, se expresó ampliamente en el mesenquima palatal. En E14.5 *Smo* se expresó en el mesenquima alrededor de la franja de fusión de MEE (Rice y col., 2006). *Gli1,2* y *3*, efectores transcripcionales de señalización de *Shh*, expresados en el mesenquima del paladar en E13, pero en E14.5 su expresión fue limitada al mesenquima adyacente al epitelio oral del paladar. *Gli1* se expresó en un patrón más amplio en el mesenquima del paladar en la región anterior en comparación a la posterior. En el hueso palatino en desarrollo, estos genes

fueron también expresados (Rice y col., 2006).

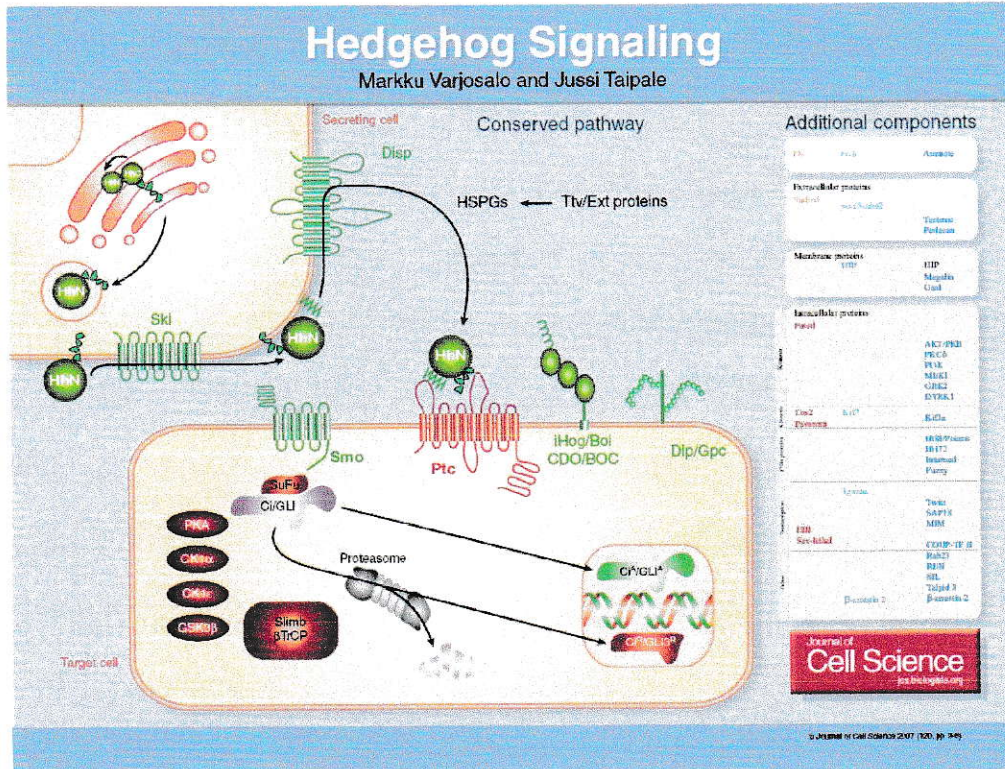


Figura 4. Vía de señalización Hh. Tomado de: Varjosalo and Taipale, 2007. J Cell Sci. 120: 3-6.

SHH esta asociado al síndrome de la holoprosencefalia.

La holoprosencefalia es una anomalía común del desarrollo del cerebro anterior y el tercio medio facial, donde los hemisferios cerebrales fracasan para separarse en mitad derecha e izquierda. Este síndrome afecta las estructuras mediales craneofaciales que intervienen en el desarrollo del labio, nariz y paladar. Estudios en humanos reportan que mutaciones y haploinsuficiencia en

el gen *SHH* producen holoprosencefalia (Nanni y col., 1999). Las malformaciones craneofaciales incluye hipotelorismo, hipoplasias del tercio mediofacial y fisuras faciales como resultado de la reprogramación molecular de un centro organizador cuya actividad controla el crecimiento externo y el patrón de las estructuras de los tercios medios y superior facial. Colectivamente estos datos revelan un mecanismo por el cual la expresividad variable del síndrome puede producirse por la disrupción de la vía de señalización del gen *SHH* (Cordero y col., 2004).

Análisis de siete mutaciones (G31R, D88V, Q100H, N115K, W117G, W117R, y E188Q) que alteran el dominio de señalización N-terminal de la proteína SHH, y muestra que dos de esas mutaciones (Q100H y E188Q), las cuales están ligadas a holoprosencefalia, producen efectos no detectables sobre el procesamiento, la unión al receptor o la señalización de SHH (Maity y col., 2005). Las cinco mutaciones restantes afectan el proceso normal de unión a Patched, produciendo grados variables en la señalización. Esos efectos incluyen introducción de un sitio de reconocimiento para una proteasa similar a Furin por la alteración G31R, resultando en un clivaje y produciendo un residuo de 11 aminoácidos en la terminación amino de SHH y consecuentemente reduciendo la potencia de la señalización. Otras dos mutaciones, W117G y W117R, causa mal plegamiento dependiente de la temperatura y retención en el retículo endoplasmático, alterando el autoprosesamiento dependiente del colesterol (Maity y col., 2005).

Molecularmente, la proteína hedgehog (HH) se comporta como una molécula de señalización intercelular, la cual es sintetizada en un precursor que sufre clivaje autocatalítico en un dominio N-terminal (SHH-N) altamente conservado y un dominio C-terminal (SHH-C) más divergente. Durante la reacción de autoprosesamiento, una molécula de colesterol es unida covalentemente a la terminación carboxílica de SHH-N. SHH-N contiene toda la actividad de señalización conocida de SHH. En contraste, SHH-C media el clivaje enzimático y la modificación del colesterol de la proteína. Ésta modificación es crucial para la actividad de generación de patrones celulares (Nanni L y col., 1999). Además, el ácido palmítico se une a la terminación amina SHH-N por una posible aciltransferasa *Rasp/skinny hedgehog (ski)* (Chamoun y col., 2001; Lee y Treisman, 2001; Amanai y Jiang, 2001; Micchelli y col., 2002). Se cree que la adición de lípidos, colesterol y ácido palmítico restringe la habilidad de SHH para moverse libremente en el ambiente extra-celular (Zeng y col., 2001; Gallet y col., 2003; Chen y col., 2004;). Si consideramos las mutaciones de *SHH* y la relación con el síndrome de la holoprosencefalia, podríamos afirmar que cuando las mutaciones se presentan tempranamente en el desarrollo del embrión, estas conducen al síndrome. Pero cuando se presentan mutaciones en *SHH* que no conducen al síndrome o hay haploinsuficiencia, es posible que las modificaciones postraduccionales de este gen produzcan posiblemente una función deficiente de SHH, afectando la función de otros genes que participarían en la expresión del fenotipo FLPNS.

Estudios poblacionales que involucran al cromosoma 7.

Marazita y col., (2002), obtienen ligamientos multipunto positivos para las regiones cromosómicas 1, 2, 3, 4, 6, 18 y 21. También en este trabajo se reportan asociaciones significativas para *loci* en los cromosomas 3, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 16, 20 y 21. Cabe destacar que, este trabajo constituye el primer reporte de un análisis de este tipo en una población de origen asiático y que incluye al cromosoma 7. Posteriormente, Wyszynski y col., (2003), realiza un estudio en dos familias sirias con un gran número de casos de FLPNS. Los resultados de ligamiento muestran que las regiones cromosómicas 3p21.2, 4q32.1, 7q34 y particularmente 17p13 constituyen regiones candidatas con fuerte evidencia de contener loci para FLPNS. En este estudio se incluye una región próxima (7q34) a la región del gen *SHH* (7q36ter). Estos hallazgos se suman a los argumentos para proponer a *SHH* como gen que participa en la etiología de la FLPNS.

Este proyecto analizó posibles variaciones en los exónes y regiones intrónicas adyacentes a los exónes del gen *SHH*. Además, se seleccionaron tres SNPs de *SHH*: rs1233556, rs9333613 y rs1233555 y se genotipificaron para cada individuo mediante PCR-RFLP. Se realizaron análisis de asociación tríos casos progenitores, caso-control y la combinación tríos caso-progenitores-contróles, a nivel de alelos, genotipos y haplotipos para determinar su posible asociación en la etiología de la FLPNS. La elección de *SHH* se basó en evidencias experimentales en animales, en estudios en humanos que proponen la región

distal del cromosoma 7, y la participación de *SHH* en el síndrome de la holoprosencefalia. Lo anterior sugiere, que *SHH* posiblemente presente relaciones funcionales en las vías moleculares que intervienen en los eventos de la morfogénesis cráneo-maxilofacial de la FLPNS (Helms y col., 1997, Wada y col., 2005, Rice y col., 2006, Gritli-Linde A. 2007). No obstante, es necesario aclarar que el propósito central fue la búsqueda de variaciones en la secuencias, tanto en los exónes como en las secuencias intrónicas adyacentes a cada exón y, por lo tanto, se excluyó el análisis de regiones regulatorias *cis* de este gen, donde también podrían ubicarse variantes que influyan en el fenotipo en estudio, ya que estos análisis constituirían un proyecto *per se*, dadas las dificultades de ubicar tales variantes en regiones regulatorias, que pueden estar a grandes distancias del gen blanco.

HIPÓTESIS

Se han propuesto numerosos genes candidatos potencialmente involucrados en la expresión de la Fisura Labiopalatina no Sindrómica, los cuales han sido identificados a través de evidencias experimentales y por analogía analizados en seres humanos. Estos análisis se han llevado a cabo mediante modelos de análisis genético, los cuales presentan ciertas limitaciones en cuanto a su capacidad de determinar taxativamente la participación de un gen candidato en la expresión de esta patología. Dadas estas limitaciones se ha propuesto una estrategia alternativa que permita dilucidar la participación de estos genes candidatos en la FLPNS, a partir del estudio de variaciones en su secuencia y

del análisis genético correspondiente. En base a los antecedentes expuestos, el presente proyecto sometió a prueba las siguientes hipótesis:

Hipótesis: Variaciones en la secuencia y/o polimorfismos de nucleótido único (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) del gen *SHH* influyen en la expresión del fenotipo Fisura Labiopalatina no Sindrómica en una muestra de la población chilena.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Identificar variaciones en la secuencia o polimorfismos de nucleótido único (SNP) del gen candidatos *SHH*, en una muestra de tríos caso-progenitores y controles del extracto socioeconómico bajo de la población chilena, las que se someterán a análisis genéticos ad-hoc, con el propósito de determinar si estas variaciones influyen en la expresión de la FLPNS.

Objetivos Específicos:

1. Identificar variantes en las secuencias exónicas e intrónicas adyacentes a los exones del gen *SHH*, utilizando técnicas que permiten un tamizado (screening) de variantes nucleótídicas de este gen.
2. Identificar aquellas variantes de la secuencia del gen *SHH* que tengan

relación con la expresión de la FLPNS, utilizando los modelos de análisis genéticos de alélos, genotipos y haplotipos (compatibles con) utilizando el diseño de tríos caso-progenitores, caso-contróles y la combinación de caso-progenitores y caso-contróles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Estudio de asociación con base familiar, que consistió en la selección de casos índice afectados con FLPNS y sus progenitores (diseño de tríos caso-progenitores). Los estudios de tríos caso-progenitores evitan la aparición de asociaciones de tipo no-causal genotipo-enfermedad que sean debidas a la estratificación genética poblacional (Cardon y Palmer 2003). Este diseño puede considerarse como un tipo especial de estudio de casos y controles, en el que los alelos no transmitidos por los progenitores a la progeñie, conforman un grupo control artificial pareado con los casos por origen étnico. En la práctica, se seleccionaron familias a través de un caso índice afectado, y a partir de ese caso se obtuvo información sobre los genotipos de los dos progenitores. Además, se seleccionó una muestra de 150 pacientes que no tenían FLPNS y pertenecieran al mismo estrato socioeconómico que los casos índices afectados con FLPNS.

Criterios de selección de la muestra

La muestra de 150 tríos caso-progenitores se obtuvo mediante una encuesta directa, tanto al probando como a sus progenitores, de entre aquellos pacientes que concurrieron en busca de rehabilitación integral al Instituto de Rehabilitación de Malformaciones y Deformaciones Máxilofaciales

(IRMADEMA), de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, al Hospital del Niño Fisurado Dr. Alfredo Gantz Mann y al Centro de Amigos del Niño Fisurado (CEANFI) localizado este último en la ciudad de Talca y los dos primeros en Santiago. Sólo se incluyó a aquellos probandos que presentaron fisura labiopalatina no sindrómica, es decir, que no presentaron ninguna otra patología asociada, ni tampoco se incluyó síndromes que presenten, entre otros aspectos, fisura labiopalatina. El término fisura labiopalatina incluye a aquellos probandos que presentaron fisura de labio, uni o bilateral, fisura de labio y compromiso del reborde alveolar, uni o bilateral y fisura de labio con reborde alveolar y hendidura palatina (paladar duro y/o blando) uni o bilateral. Los diagnósticos clínicos que establecieron que se trata de una FLPNS fueron previamente efectuados por los médicos genetistas que trabajaron en los lugares de donde se obtuvo la muestra. En el caso de CEANFI Talca los probandos recibieron tratamiento en alguno de los centros mencionados que se ubican en la ciudad de Santiago. Además, los probandos que se incluyeron en la muestra están en su gran mayoría en etapa de rehabilitación con ortodoncia por lo que el diagnóstico clínico puede, si es necesario, corroborarse en las fichas clínicas respectivas de los centros mencionados. Los tríos que constituyeron la muestra motivo de análisis, provienen tanto de reconstituciones genealógicas que el laboratorio posee en un banco de datos, como por nuevos tríos, para los cuales también se efectuaron la reconstitución genealógica correspondiente, con el fin de alcanzar el tamaño muestral propuesto. La recolección de tríos se efectuó hasta alcanzar el tamaño

muestral adecuado. Todos los individuos que se incluyeron en la muestra fueron informados tanto verbalmente como por escrito, a través de un documento de consentimiento informado, que debieron leer y firmar, por lo que toda persona que participó en esta investigación, lo hizo en forma absolutamente voluntaria. Para evitar los efectos de la estratificación poblacional de la población mixta chilena, en que se ha demostrado que existe una relación entre los estratos socioeconómico y el grado de miscegenación amerindia, los tríos seleccionados pertenecen a los niveles socioeconómicos bajo y medio-bajo, que son los que presentan el mayor componente amerindio (Valenzuela CY, 1988; Palomino y col., 1997 (a); Palomino y col., 1997 (b)). La población amerindia es de origen asiático y este grupo étnico es el que presenta las más altas tasas de incidencia y prevalencia en comparación a poblaciones de origen caucásico o negroide (Vanderas AP, 1987). Basado en estos antecedentes, la muestra analizada en el presente estudio fue seleccionada del estrato socioeconómico chileno bajo y medio bajo.

Análisis Genético-Molecular para la determinación de variantes en la secuencia del gen *SHH*

1. Extracción de DNA genómico total

A cada individuo que participó se le extrajo 5 ml de sangre venosa periférica en un tubo Vacuotainer con EDTA como anticoagulante. El DNA genómico se extrajo desde esta muestra utilizando el protocolo modificado descrito por

Maniatis (J. Sambrook, EF Fritsch, T. Maniatis. "Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2. Sec. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York 1989).

2. Método de CSGE (conformation-sensitive gel electrophoresis)

Una vez se extrajo el DNA genómico de todos los individuos, se amplificó las secuencias correspondientes a los exones y a las secuencias intrónica adyacentes a los exones del gen *SHH*, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para esta amplificación se diseñaron los partidores correspondientes en base a las secuencias descritas para el gen *SHH*, para ello se utilizó el programa en línea *Primer 3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), se utilizó como referencia las secuencias del gen *SHH*, las que se extrajeron de la base de datos *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>). Para confirmar la especificidad de cada partidor, se utilizó el programa *BLAST N* (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/blastview), seleccionando así el par de oligonucleótidos que sólo reconoció un sitio en el genoma, el que debió corresponder al gen en estudio. Con estas herramientas se diseñaron los partidores descritos en la tabla 1, en la que además se detallan las condiciones T_m de amplificación de cada segmento.

Tabla 1

Partidores para los exónes de *SHH*.

Gen	Exón	Segmento	Partidores	Tamaño (pb)	Tm
<i>SHH</i>	1	A	F: CGGGCAAGGTTATATAGGAAG R: TGGGGATAAACTGCTTGTAGG	327	60
		B	F: AAGAGGAGGCACCCCAAAAA R: GGAAGTGTTCCGGCTTCTCGTAA	275	60
	2	A	F: GGTTGCCCAGGCTAACGTGT R: GCGGTCAGACGTGGTGATGT	209	60
		B	F: AAGGACAAGTTGAACGCTTTG R: CCCAGGTTTCTTTTTCTCTTGA	341	60
	3	A	F: TTCTTTCCCTTCTCCTCACC R: GTCTCGATCACGTAGAAGACC	233	57
		B	F: TACAGCGACTTCCTCACTTCCT R: ACCCGGTTGATGAGAATGGT	374	63
		C	F: AGGGCACCATTCTCATCAACC R: CAGGAGCCAGGTGCCTATTTG	204	63
		D	F: AGAGTAGCCCTAACCGCTCCA R: CGCCTTTTCCGAGTGTCTTTT	242	63

Segmentos, partidores y TM de amplificación para las secuencias correspondientes a ocho segmentos de los tres exónes y a las secuencias intrónicas adyacentes a los exónes del gen *SHH*.

La base de datos *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>), cuenta con la información del número de exones e intrones del gen *SHH*, seleccionado para este proyecto. Es así como *SHH* tiene 3 exónes y 3 intrónes (Figura 5), con un tamaño total de transcripción de 1,576 bps.

No. Exon / Intron	Chr	Strand	Start	End	Start Phase	End Phase	Length	Sequence
5' upstream sequence								
1	ENSE00001088614	7	-1	155,297,278	155,297,728	-	0	451 GCGAGGCAGCCACGGAGGGAGAGAGCGAGCGGGGAGCCGGAGCGAGAAAGGGAAAGCCG AAGAGAGAGCGCACACGCCACACACCCGCCCGCCGCACTCGGCACCGGACCCGCACGGGGA CAGCTCGGAAGTCATCAGTTCATGGGCGAGATGCTGCTGCTGGCGAGATGTCGCTGCT AGTCTGCTCCTCCTCGCTGCTGCTGATGCTCGGGACTGGGCTGGGACCGGGACGGGGTT CGGAAAGAGGAGGCCACCCAAAAAAGCTGACCCCTTTAGCCTACAAGCACTTTATCCCCAA TGTGGCCGAGAAAGCCCTAGGCGCCAGCGGAAAGTATGAAGGGAAGATCTCCAGAAACTC CGAGCGATTAAAGGAACTACCCCAATTACAAACCCGACATCATATTTAAGGATGAAGA AAACACCCGGAGCGGACAGGCTGATGACTCAG
Intron 1-2								
2	ENSE00001088617	7	-1	155,291,751	155,292,012	0	1	5,265 gtaggaaccagagocggggggtgg ggtgggggtccccttgtcttcgag 262 AGGTGTAAGGACAAGTTGAACGCTTTGGCCATCTCGGTGATGAACAGTGGCCAGGAGTG AACTCGGGTGACCGGAGGCTGGGACAAAGATGGCCACCCTCAGAGGAGTCTCTGCAC TACGAGGCGCCGACAGTGCACATCACACCTCTGACCGGACCCGACGAAAGTACCGCATG CTGGCCCGCTGGCGGTGGAGGCGGCTTCGACTGGGTGACTACGAGTCCAAGGCACAT ATCCACTGCTCGGTGAAGACG
Intron 2-3								
3	ENSE00001148618	7	-1	155,289,182	155,291,750	1	-	2,569 gtaagctggccctggcccccgat tctttcccttctcctcaaccgag 883 AGAACTCGGTGGCGGCAAAATCGGGAGGCTGCTTCCCGGCTCGGCCACGGTGAACCTGG AGCAGGGCGGCCAACAGTGGTGAAGGACCTGAGCCCGGGGACCGCGTGGTGGCGGGG ACGACCAGGGCGGCTGCTCTACAGCGACTTCTCCTCACTTTCTGGAACCGGACGACGGCG CCAAAGAGTCTTCTACGTGATCGAGACCGGGAGCCCGGCGGAGCGCTGCTGCTCAACG CCGCGCACTGCTCTTTGTGGCGCGCACAAAGACTCGGCACCGGGGAGCCCGAGGCGT CCTCGGCTCGGGCCCGCTTCCGGGGCGCACTGGGCTCGGGCGCTGTTGCCAGCC GGTGGCCCGGCGCAGCGGTGACCTGAGTGGTGGCCGAGCTGACGGGACCGCGGCTCC TGCCCGCGCTGTGCACAGCGTGACCTAAAGCGAGGAGGCGCGGCGCTAAGCGCCCG TCACCGCCAGGGCACCACTTCTCATCAACCGGGTCTGGCCCTCGCTGCTACGGGCTCATG AGGAGCAGCTGGGCGCACCGGGGCTTCGGCCCTTCGGCTGGCGCACCGGCTCCTGG CTGCACTGGCCCGCGCGCACCGGACCGCGGCGGACAGCGGCGGGGACCGCGGGG CGGGCGGCGCAGAGTACCCCTAACCGCTCCAGTGTCTGCCAGCGCTCCGGGTGGGGGG CCACCGGGCATCCACTGTTACTCGCAGCTGCTCTAOCAAAATAGGCACCTGGCTCTGG ACAGCGAGGCGCTGCACCCGCTGGCATGGCGTCAAGTCCAGCTGAAGCGGGGGGCGG GGGAGGGGCGCGGGAGGGGGG
3' downstream sequence								
gggaggtcccccgagcggcggggcaaggttatataggaagagaaga								

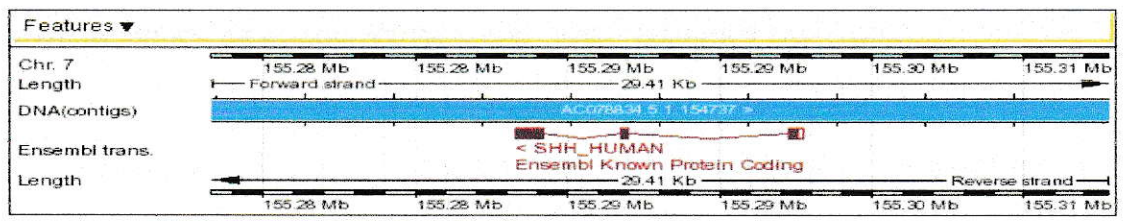


Figura 5. Gen SHH. En el panel superior: Secuencia, número y longitud de exones del gen SHH. Panel inferior: Mapa de la ubicación del gen SHH en el cromosoma siete.

Con los productos de PCR se aplicó la técnica de CSGE, que fue desarrollada como un método de análisis de heteroduplex, para el tamizado de variaciones de secuencia de grandes genes multiexónicos. Esta técnica se basa en diferencias conformacionales, en un fragmento de DNA de doble hebra, causadas por la formación de moléculas de heteroduplex (Nagamine y col., 1989). La molécula heteroduplex tiene una o más bases desapareadas

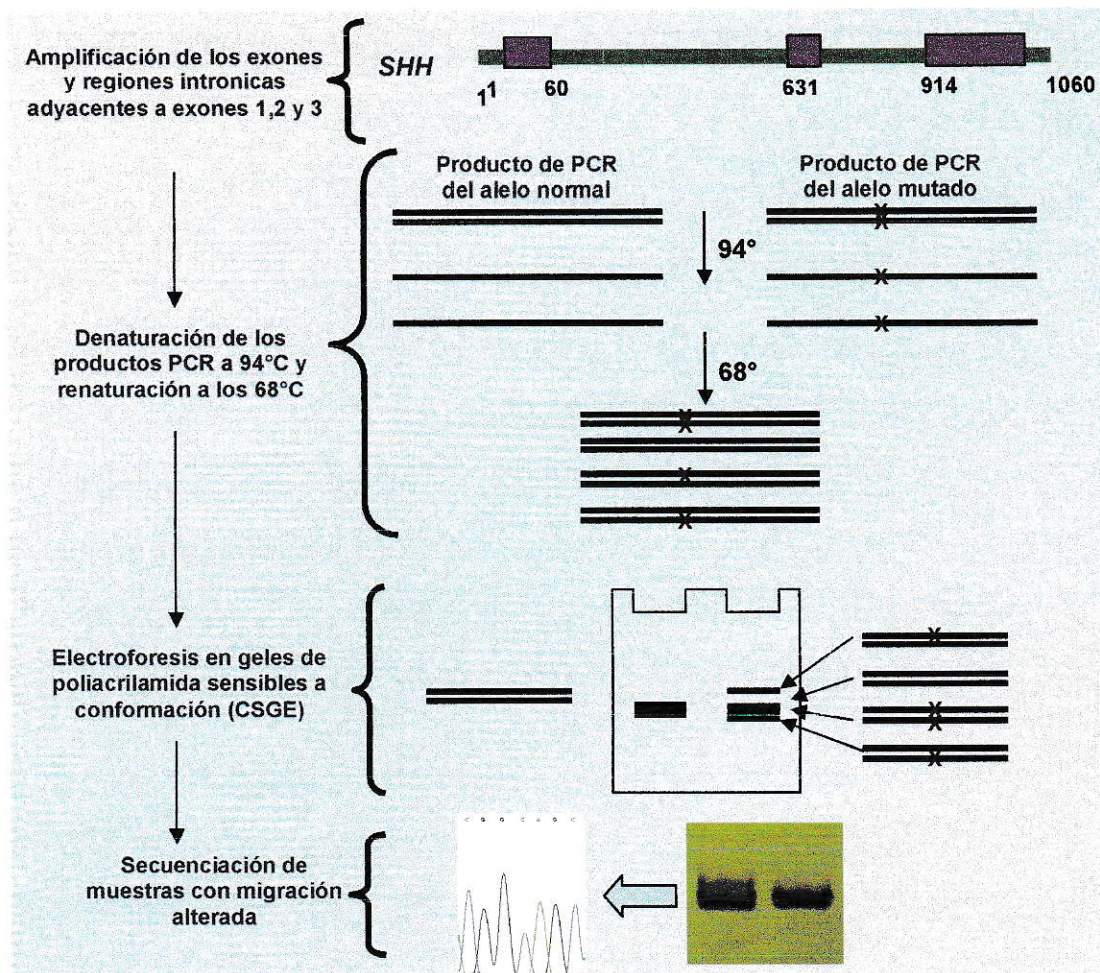


Figura 6: Esquema del principio del análisis de heteroduplex. El heteroduplex tiende a tener una movilidad electroforética retardada en relación al homoduplex. Extraído de Nataraj y col., *Electrophoresis* 1999, 20: 1177-1185.

3. Secuenciación de DNA

Los fragmentos que presentaron movilidad alterada identificados por el método de CSGE, se reamplificaron y purificaron para ser usados como plantillas en una reacción de secuenciación de DNA, con el objetivo de detectar la variación de secuencia que produjo el heteroduplex en este segmento. Aquellos casos

excepcionales, en que la técnica de CSGE mostró resultados dudosos respecto a la movilidad de un segmento, estos fueron también considerados para su secuenciación. Como el laboratorio no contó con un equipo de secuenciación automático, utilizamos los servicios de una empresa externa que posee el equipamiento y personal idóneo para llevar a cabo esta labor.

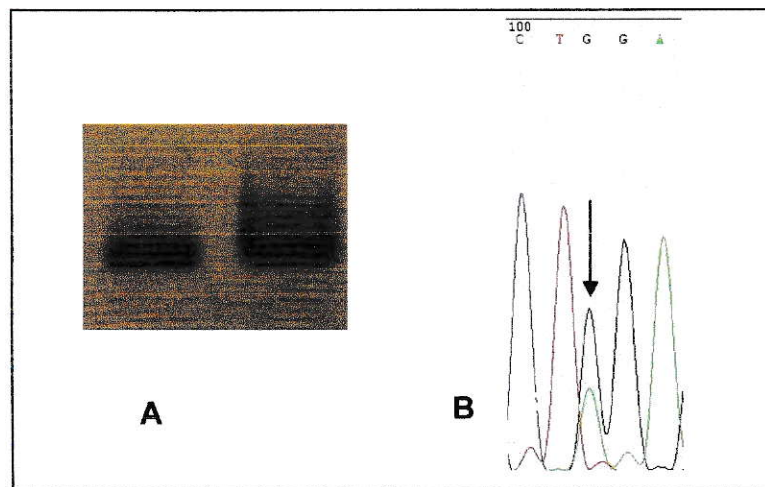


Figura 7 Gel MDE y secuenciamiento del segmento con movilidad alterada. Variante c.541G>A de MSX1. A) Gel de MDE que muestra una banda con movilidad electroforética alterada a la derecha, en comparación con la banda esperada a la izquierda. B) Secuencia del fragmento con movilidad alterada que muestra el cambio G>A. Gel facilitado por José Suazo, obtenido en su tesis doctoral, laboratorio del Dr. Rafael Blanco.

4. Identificación de variantes de los genes en estudio

Con los resultados de la secuenciación de los segmentos que tuvieron diferencias en su patrón migratorio en el análisis de heteroduplex, como se observa en la figura 6, se procedió a alinear estas secuencias con las secuencias de referencia del gen *SHH* que se encontraron en la base de datos GENATLAS, utilizando el programa computacional GenChek

(<http://www.ocimumbio.com/web/bioinformatics>) para identificar las variantes que generaron el heteroduplex. Como se mencionó anteriormente, dado que se utilizó el diseño de tríos caso-progenitores, fue posible determinar cuales de las variantes encontradas fueron transmitidas de padres a progenie afectada. Este modelo permitió además especular acerca de la posible penetrancia en el caso de que un progenitor no fuera afectado, pero que presentó la variante que cosegrega con el rasgo.

5. Análisis genético utilizando SNPs.

Al no encontrarse ninguna banda retardada en la técnica heteroduplex, como se observa en la figura 8, en donde se presenta un gel MDE para muestras tríos casos-progenitores para el gen *SHH*, fue necesario analizar tres polimorfismos de nucleótido único (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) del gen *SHH* en una muestra de 150 tríos caso-progenitores y 150 controles. Para, así determinar la asociación entre alelos, genotipos y haplotipos de estos polimorfismos con FLPNS.

Los segmentos de este gen en donde se ubicaron dichos SNPs, se amplificaron, utilizando PCR, para luego digerirlos con las enzimas de restricción correspondientes (PCR-RFLP). Los productos de PCR, fueron sometidos a digestión con endonucleasas de restricción, las cuales fueron seleccionadas según su variante polimórfica, utilizando el programa "DNA for Window", (<http://www.dna-software.co.uk/>). Posteriormente, se realizó la

electroforesis en geles de agarosa al 2,5% de estas muestras tratadas con endonucleasas. Así se obtuvieron los genotipos de todos los individuos para luego aplicar las pruebas estadísticas adecuadas.

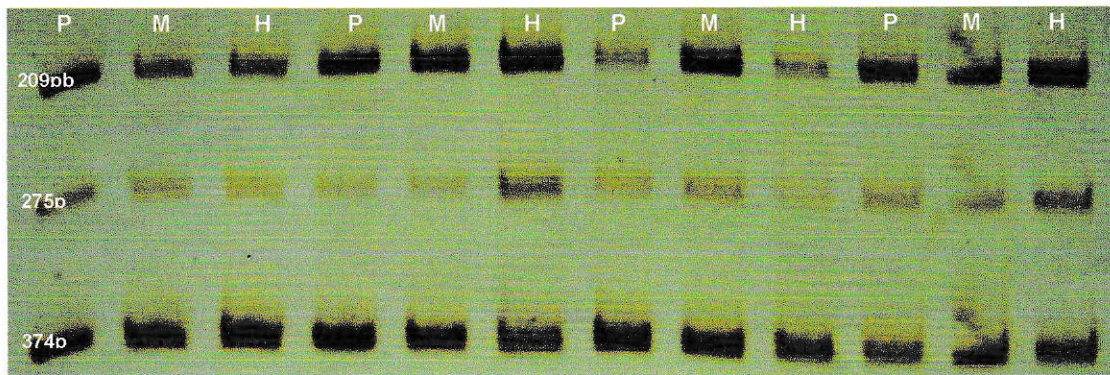


Figura 8. Gel MDE para tres segmentos del gen SHH en cuatro tríos. En cada carril se corrieron tres segmentos amplificados de *SHH* del mismo individuo. P: padre, M: madre y H: hijo- Elaborado en el Laboratorio de Genética Molecular Humana. Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 2007. No se observan segmentos con movilidad alterada.

De la base de datos del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?chooseRs=het&locusl...) se seleccionaron inicialmente dos SNPs rs9333613 (A>G) y rs1233556 (C>T), pero posteriormente se seleccionó un tercero, rs1233555 (C>T), porque la frecuencia baja del alelo del rs9333613, no se detecto en la muestra. En la tabla 2, muestra los SNPs seleccionados, su ubicación y posición en el gen, los partidores diseñados para los segmentos donde se encuentran los SNPs, el polimorfismo en los alelos, su frecuencia de heterocigocidad y la endonucleasa específica para el sitio de restricción. Para complementar la selección de los SNPs, también se utilizó la herramienta TagSNP implementada en la página web de la base de datos "Hap Map", que

determinó que polimorfismos fueron los más representativos de la variabilidad total del gen, para lo cual se utilizó como referencia una frecuencia del alelo menos representado mayor a 0.3 y un r^2 mayor a 0.8.

Teniendo en cuenta que la población mixta chilena contemporánea, presenta estratificación poblacional socioeconómica étnico-dependiente, sólo se utilizó la base de datos "Hap Map" de la población europea y asiática.

Se amplificaron las secuencias correspondientes que contenían los SNPs mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para el diseño de estos oligonucleótidos, se siguió la misma metodología utilizada para los partidores y amplificación de los segmentos del gen *SHH* para la técnica de MDE-CSGE.

TABLA 2
Características de los SNPs seleccionados para el gen *SHH*.

Gen	Región	Posición	SNPs	Partidores	Alelo	Het	Enzima
<i>SHH</i>	intron1	475279	rs1233556	F: CCTCTGCAGAAGTCACCTTGAA R: CCTCAGATAAGGATGCGACAGA	C>T	0.259	Nla III
	intron1	475153	rs9333613	F: CCCTCTTTAAATCCCATGTCC R: AGGAGGCAGGAAACACTGACTA	A>G	0.169	Ban II
	intron1	474162	rs1233555	F: AGAAAGGCCCCCAGCTCTAC R: GGACACGTTAGCCTGGGCTA	C>T	0.499	Sau3A1

Se describe la posición de cada SNP en el intron1, los partidores diseñados para su amplificación, los alelos polimórficos, la frecuencia de heterocigocidad y las endonucleasas de restricción utilizadas.

Métodos de análisis estadístico

En este estudio se consideraron dos muestras: una de tríos caso-progenitores y otra muestra de controles. Se realizaron tres análisis: un estudio de asociación con los diseños de un análisis caso-control (considerando sólo los probandos de cada trío), un análisis de tríos caso-progenitores y un análisis combinado de tríos caso-progenitores y controles.

}

Para el análisis de casos y controles, se calculó las frecuencias alélicas y genotípicas en ambas muestras, mediante proporciones simples, para los SNPs rs123556 y rs123555 del gen *SHH*. Con estas frecuencias se estimó si los genotipos de ambos grupos, se distribuyeron de acuerdo a las proporciones de Hardy-Weinberg (ver Tabla 3), utilizando el paquete estadístico STATA 8 (Stata Corp, 2003). La anterior estimación se realizó porque se ha reportado que desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg en una población, puede incrementar la posibilidad de encontrarse tanto resultados falsos positivos como falsos negativos de asociación cuando se utiliza marcadores bialélicos. Generalmente, las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg se deben a que posiblemente existe estratificación poblacional (Schaid y Jacobsen, 1999). Para establecer la posible asociación de algún SNP de *SHH* con la FLPNS, se compararon las frecuencias alélicas (ver Tabla 4), genotípicas (ver Tabla 5) y haplotípicas (ver Tabla 6) en los análisis casos-contróles utilizando la prueba de razón de máxima verosimilitud (Likelihood Ratio Test) (Butler y col., 2005). Además, para establecer la presencia de alelos, genotipos y/o haplotipos que

representen un riesgo incrementado de expresar la FLPNS, se calculó la medida de Odds Ratio (OR) con un intervalo de confianza de 95%. Para estas pruebas se utilizó el programa UNPHASED 3.0.9 <http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/personal/frank/software/unphased/> (Dudbridge F, 2003).

En la muestra de tríos casos-progenitores, con los datos obtenidos de la genotipificación de los SNPs de *SHH*, se analizó la transmisión de alelos específicos de los padres heterocigotos a sus hijos afectados. Para este análisis, se aplicó la Prueba de Desequilibrio de Transmisión (TDT, Spielman y col., 1993). Esta prueba, evalúa la transmisión de alelos desde los padres heterocigotos hacia los hijos afectados. Consiste que al seleccionar tríos familiares a través del caso índice, la asociación entre el factor genético y la enfermedad, se observa que la transmisión de alelos desde padres heterocigotos hacia sus hijos afectados se aparta del valor esperado (probabilidad de transmisión = 50%). Por tanto, si un alelo está asociado con un mayor riesgo de enfermar, éste se transmitirá más del 50% a los hijos afectados. El paquete estadístico STATA 8 (Stata Corp, 2003) tiene implementada esta prueba. La ventaja del TDT sobre el análisis de estudios clásicos de caso-control, consiste precisamente en que obvia el efecto de la estratificación poblacional, reduciendo la posibilidad de obtener resultados falsos positivos (Santos y col., 2002).

Los estudios de caso-control son sensibles a la estratificación poblacional. Los diseños de tríos caso-progenitores no son afectados por problemas de la estratificación poblacional. Sin embargo las pruebas estadísticas asociadas a este diseño pierden poder ante una baja proporción de padres heterocigotos en la muestra. Es por esta razón se han realizado análisis que combinan ambos tipos de diseño, con lo cual se podría incrementar el poder estadístico para detectar asociaciones genotipo-fenotipo. Sin embargo, hay que considerar que los estudios realizados en dos etapas (por ejemplo, un estudio de caso-control seguido de un estudio de caso-progenitores) comparten parcial o totalmente la muestra de casos, por lo que se crea una correlación de datos que no permite tratar ambos estudios de forma independiente (Martin y Kaplan 2000). No obstante, se ha descrito una forma de combinar los estudios de caso-control y los estudios de tríos caso-progenitores en un análisis integrado que permita extraer toda la información de los sujetos del estudio, incluyendo aquellos casos para los que no haya sido posible encontrar información familiar (Epstein y col., 2005). Este procedimiento de análisis combinado se ha implementado en el paquete estadístico UNPHASED.

Tamaño de la muestra

Hemos utilizado el software QUANTO (<http://hydra.usc.edu/gxe/>) (Gauderman 2003) para calcular el tamaño de muestra del estudio de tríos de caso-progenitores. Con un tamaño de 150 tríos, se alcanza un poder estadístico de 80% para detectar riesgos relativos genotípicos de 1.6 o superiores, usando

marcadores de heterocigocidad media (como los que se esperan encontrar en los genes seleccionados) y con una confianza de 95%. Para realizar el análisis de los SNPs, se adicionó un grupo de 150 controles no relacionados entre si.

RESULTADOS

De los 150 tríos caso-progenitores analizados en esta tesis, el 62,8% pertenecía a familias simplex (un afectado por familia) y un 37,2% de familias múltiplex (más de un afectado por familia). Los probando de estos tríos eran mayoritariamente varones (62,2%) y un 37,8% eran mujeres. Respecto a la severidad de las fisuras de en esta muestra, la gran mayoría (82,9%) presentaba una fisura completa, es decir, aquella que afecta al labio, reborde alveolar y paladar, en tanto que un 6,2% presentaba fisura de labio y reborde, un 9,3% sólo fisura labial y 1,6% presentó una pequeña muesca en el labio superior. En relación a la lateralidad de las fisuras en la muestra analizada, el 36,7% de los probando presentó una fisura del lado izquierdo de la cara, un 32,5% del lado derecho, en tanto que las fisuras bilaterales estuvieron representadas un 30,8%.

Utilizando la técnica CSGE en geles de MDE, se realizó un tamizaje (screening) de variantes nucleóticas de *SHH*. Se analizaron inicialmente 80 tríos (160 progenitores y 80 casos) para los ocho segmentos del gen *SHH* (1920 reacciones de PCR e igual número de análisis de CSGE). No se encontraron segmentos con movilidad alterada en los geles MDE. Esto se interpretó que no se hallaron variantes o mutaciones que fueran potencialmente causales de FLPNS. En la figura 8, se observa un gel MDE para tres segmentos

amplificados del gen *SHH* en una submuestra de pacientes con FLPNS, en donde no se observó ninguna banda retardada.

Por esta razón, se incluyó el análisis de dos SNPs: rs1233555 (C>T) y rs1233556 (C>T), los cuales se analizaron mediante PCR-RFLP en la muestra de 150 tríos caso-progenitores no relacionados y en 150 controles. Con estas muestras fue posible realizar tres tipos de análisis de asociación genotipo-enfermedad: a) un análisis de tríos caso-progenitores, b) un estudio caso-control, considerando sólo a los probandos de cada familia; y c) un tercer análisis combinando las dos muestras anteriores.

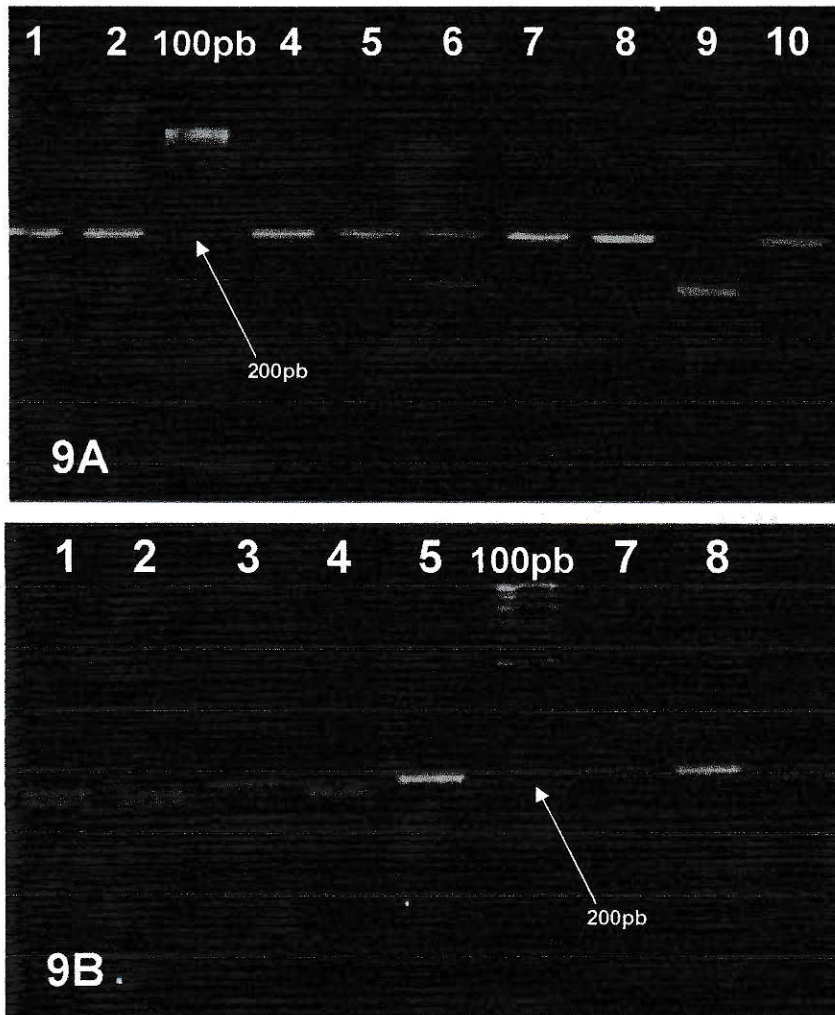
Los resultados mostraron que las muestras de casos y controles estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg, teniendo en cuenta que ningún valor fue significativo ($p < 0.05$). En la Tabla 3, se describen los valores obtenidos.

Tabla 3

Equilibrio de Hardy-Weinberg para los SNP rs1233556 y rs1233555

Equilibrio de Hardy-Weinberg		
SNP	Grupo	p
555	Caso	0.17612
	Control	0.19671
556	Caso	0.20
	Control	1.00

Para cada uno de los análisis realizados (mencionados anteriormente), se tuvo en cuenta las frecuencias de alelos, de genotipos y de haplotipos para los SNPs seleccionados del gen *SHH*.



Figuras 9A y 9B. Resultados de la acción de las endonucleasas. En el gel de agarosa de la figura 9A, se observa la acción de *Nla* III sobre amplificadas del SNP rs1233556, en el carril 6 se presenta una muestra de un paciente con genotipo CT, en el carril 9 un genotipo TT y los otros carriles tienen genotipos CC. En el gel de agarosa de la figura 9B, se observa la acción de *Sau*3A1 sobre amplificadas del SNP rs1233555, en el carril 1, 2, 4 y 9 se presentan genotipos CT y en los carriles 3, 5, 6 y 7 genotipos CC.

Para determinar estas frecuencias de los polimorfismos en cada SNP, rs1233555 (C>T) y rs1233556 (C>T), se obtuvieron previamente los segmentos

PCR-RFLP, productos de la actividad de las endonucleasas Nla III y Sau3A1 respectivamente, utilizando geles de agarosa. En la figura 9, se observan dos geles con los resultados de la acción de las endonucleasas utilizadas para estos análisis.

No se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias de los alelos C y T entre los pacientes y los controles para los SNP rs1233556 (ANOVA F-Ratio=16.2; $p=0.0000$) y rs1233555 (ANOVA F-Ratio=11.17; $p=0.000$), con una confiabilidad del 95%. Tampoco se encontró diferencias significativas entre las frecuencias de los genotipos CC, CT y TT entre los casos y controles para los mismos SNPs ($p=0.033$ y $p=0.006$ respectivamente).

En las tablas 4, 5 y 6, se presentan los resultados de los tres análisis de asociación de los SNPs del gen *SHH* y la FLPNS. Se obtuvieron los valores de Odds ratio, intervalos de confianza y los p , para alelos, genotipos y haplotipos de cada SNPs para cada uno de los análisis.

Tabla 4

Análisis de asociación entre *SHH* y FLPNS a nivel alélico

SNPs	Alelo	Odds ratio (95% IC)	PRV p-value
Muestra Trios Casos-Progenitores			
rs1233556	C	---	0.6393
	T	0.8636 (0.4526-1.648)	
rs1233555	C	---	0.5101
	T	0.8115 (0.4118-1.599)	
Muestra Casos-Controles			
rs1233556	C	---	0.4958
	T	0.8112 (0.4497-1.463)	
rs1233555	C	---	0.02878
	T	0.4728 (0.2533-0.8826)	
Muestra Combinada Trios Casos-Progenitores y Controles			
rs1233556	C	---	0.4227
	T	0.7727 (0.3961-1.507)	
rs1233555	C	---	0.4104
	T	0.7726 (0.3952-1.51)	

PRV = Prueba de razón de verosimilitud (likelihood ratio test)

Con respecto a los resultados de asociación de alelos de los SNPs rs1233556 y rs1233555 del gen *SHH* y la FLPNS, se observó para el SNP rs1233555 un valor significativo ($p = 0.02878$) en el análisis Caso-Controles, no se observó ningún otro valor significativo para los otros análisis (ver tabla 4).

Tabla 5

Análisis de asociación entre *SHH* y *FLPNS* a nivel genotípico

SNPs	Genotipo	Odds ratio (95% IC)	PRV p-value
Muestra Casos-Controles			
rs1233556	CC	---	0.4611
	CT	0.688 (0.3494-1.356)	
	TT	1.943 (0.1735-21.76)	
rs1233555	CC	---	0.0765
	CT	0.403 (0.1757-0.9247)	
	TT	0.5971 (0.0978-3.644)	
Muestra Combinada Trios Casos-Progenitores y Controles			
rs1233556	CC	---	0.6925
	CT	0.7992 (0.4035-1.583)	
	TT	0.4401 (0.0296-6.538)	
rs1233555	CC	---	0.04228
	CT	1.094 (0.5375-2.229)	
	TT	0.0 (0.0-0.0)	

PRV = Prueba de razón de verosimilitud (likelihood ratio test)

Los resultados obtenidos de la asociación de los genotipos de los SNPs rs1233556 y rs1233555 del gen *SHH* y la *FLPNS*, se observó para el SNP rs1233555 un valor significativo ($p = 0.04228$) en el análisis combinada trios caso-progenitores y controles, no se observó ningún otro valor significativo para los otros análisis (ver tabla 5).

Tabla 6

Análisis de asociación entre SHH y FLPNS a nivel haplotípica

Haplotipo	Odds ratio (95% IC)	Chisq	p-value	PRV p-value
Muestra Trios Casos-Progenitores				
CC	---	0.7767	0.3781	0.7
CT	0.8075 (0.407-1.602)	0.511	0.4747	
TC	0.8658 (0.4517-1.66)	0.2163	0.6419	
TT	0.6992 (0.2718-1.799)	0.689	0.4065	

Haplotipo	Odds ratio (95% IC)	PRV p-value
Muestra Casos-Controles		
CC	---	0.1369
CT	0.4606 (0.2459-0.8638)	
TC	0.7627 (0.4205- 1.383)	
Muestra Combinada Trios Casos-Progenitores y Controles		
CC	---	0.5173
CT	0.7759 (0.3888-1.509)	
TC	0.7742 (0.3949-1.518)	

PRV = Prueba de razón de verosimilitud (likelihood ratio test)

Para los resultados obtenidos de la asociación de haplotipos de los SNPs rs1233556 y rs1233555 del gen *SHH* y la *FLPNS*, no se presentó ningún haplotipo con un valor significativo en los diferentes análisis (ver tabla 6).

DISCUSION

Este estudio buscó identificar mutaciones causales en las regiones exónicas e intrónicas adyacentes del gen *SHH* que pudiesen estar involucradas en el fenotipo FLPNS en la población chilena.

En enfermedades complejas, como la FLPNS, hay dificultades para identificar y estudiar genes específicos expresados durante las etapas embrionarias, debido a las relaciones complejas entre la activación y silenciamiento de estos genes y el medio ambiente de los tejidos embrionarios. En pez cebra (Brand y col., 1996; Wada y col., 2005), pollo (Hu y col., 2003; MacDonald y col., 2004) y ratón (Rice y col., 2006), se ha demostrado que cuando se producen mutaciones o haploinsuficiencias en *SHH*, se altera la migración de las células de la cresta neural craneal o la inducción posicional de las células ectomesenquimales craneales, lo cual afecta los mecanismos de inducción, iniciación y ejecución de los programas específicos de diferenciación entre las CNCCs (Jeong y col., 2004; Wada y col., 2005; Rice y col., 2006). Esto requiere la actividad modulada de reguladores transcripcionales que activan varios genes. Por ejemplo, en una etapa posterior a la migración e inducción de las CNCCs, la interacción de SHH con FGF10, fue un proceso clave en la producción de la fisura labiopalatina, la transformación epitelio-mesenquima y la expresión de SHH en el epitelio del paladar (Rice y col., 2004). Otros estudios

encontraron que mutaciones y haploinsuficiencia de *SHH* han sido identificadas en el síndrome de la Holoprosencefalia (Nanni y col., 1999; Cordero y col., 2004). Sin embargo, en este trabajo no se encontraron mutaciones ni variantes polimórficas en las regiones codificantes del gen, por lo que no se pudo establecer una asociación entre *SHH* y FLPNS.

Basado en los anteriores resultados, podríamos especular, que las mutaciones o haploinsuficiencia en *SHH*, no es un requisito único para producir FLPNS. Algunos estudios ya mencionados, mostraron que factores iniciales o posteriores en la migración o inducción de las CNCCs alteran los reguladores transcripcionales, modificando la expresión de grupos de genes en células de ciertos tejidos. Los cuales intervienen en el desarrollo craneofacial y expresión del fenotipo FLPNS. Lo cual estaría acorde con nuestros resultados en relación a que no se encontraron mutaciones, ni variantes de *SHH* asociadas a FLPNS, sin embargo, los pacientes estudiados presentan la fisura labiopalatino.

Otra explicación estaría relacionada con los estudios que describen posibles interacciones de algunas vías de señalización con *SHH* en la expresión de la FLPNS. Este es el caso de *BMP4*, que induce la expresión de *SHH* a nivel del epitelio del borde medial de las láminas palatinas, permitiendo su crecimiento y fusión (Zhang y col., 2002). Mutaciones o deficiencias funcionales de estos genes que interactúan con *SHH*, podría alterar dichas relaciones y producir el fenotipo FLPNS, sin que este afectado *SHH*.

No obstante, se considera necesario analizar aquellas secuencias del gen *SHH* que no fueron estudiadas, como las regiones reguladora cis y promotora de este gen, donde también podrían ubicarse variantes que influyan en el fenotipo de la FLPNS.

Además de los resultados negativos obtenidos en el análisis molecular de la secuencia codificante, en el estudio de asociación mediante el uso de SNPs en las dos muestras descritas en materiales y métodos, sólo se observaron para rs1233555, resultados significativos a nivel de alelos en el análisis de casos y controles y a nivel de genotipos en el análisis combinado. Dado que el estudio se efectuó utilizando solamente dos SNPs, es posible que estos SNPs no sean suficientes para detectar fehacientemente un posible rol de *SHH* en la FLPNS. El aumento en el número de SNPs permitiría, en el análisis de haplotipos, determinar la asociación real de este gen con la FLPNS.

CONCLUSIONES

Este trabajo no detectó mutaciones causales de *SHH* que estén involucradas en la expresión de FLPNS en la población chilena.

Se detectó una posible asociación entre este gen y FLPNS, basado en un análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNPs), sin embargo, esta posible asociación se debe corroborar con un aumento del tamaño muestral, basado en los antecedentes de la población chilena por su composición étnica y estratificación socioeconómico.

Teniendo en cuenta las regiones analizadas del gen, es necesario incluir las regiones no estudiadas, como las regiones regulatorias *cis*, para determinar posibles polimorfismos que estén asociados con FLPNS. En el análisis con SNPs, sería recomendable aumentar el número de estos.

BIBLIOGRAFIA

Amanai K. y Jiang J. 2001. Distinct roles of Central missing and Dispatched in sending the Hedgehog signal. *Development*. 128:5119-5127.

Beaty T.H. y col. 2002. Testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design. *Gen Epid*. 22: 1-11.

Blanton S.H. y col. 2004a. Nonsyndromic cleft lip and palate: four chromosomal regions of interest. *Am J Med Genet*. 125: 28-37.

Blanton S.H. y col. 2004b Association of chromosomal regions 3p21.2, 10p13 and 16p 13.3 with nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet*. 125: 23-27.

Brand M, y col. 1996. Mutations affecting development of the midline and general body shape during zebrafish embryogenesis. *Dev*. 123: 129-142.

Butler J.M. y col. 2005. Strategies for selecting subsets of single-nucleotide polymorphisms to genotype in association studies. *BMC Genet* 6 Suppl 1:S72.

Cardon L.R. y Palmer L.J. 2003. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet*. 361: 598-604.

Celli J y col. 1999. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell*. 99: 143-153.

Chai Y. y Maxson R.E. 2006. Recent Advances in Craniofacial Morphogenesis. *Developmental Dynamics*. 235:2353–2375.

Chamoun Z. y col. 2001. Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science* 293:2080-2084.

Chen M.H. y col. 2004. Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates *Genes Dev*.18:641–659.

Chiang C. y col, 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nat*. 383: 407-413.

- Cordero D. y col. 2004. Temporal perturbations in sonic hedgehog signaling elicit the spectrum of holoprosencephaly phenotypes. *J. Clin. Invest.* 114(4): 485–494.
- Dudbridge F. 2003. Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet. Epidemiol.* 25(2):115-21.
- Epstein M.P. y col. 2005. Genetic association analysis using data from triads and unrelated subjects. *Am. J. Human. Genet.* 76:592-608.
- Gallet A. y col. 2003. Cholesterol modification of hedgehog is required for trafficking and movement, revealing an asymmetric cellular response to hedgehog. *Dev. Cell.* 4:191-204.
- Gauderman W.J. 2003. Candidate gene association analysis for a quantitative trait, using parent-offspring trios. *Genet. Epidemiol.* 25: 327-338.
- Gritli-Linde A. 2007. Molecular control of secondary palate development. *Dev Biol.* 301: 309–326.
- Haworth K.E. y col. 2006. Sonic hedgehog in the pharyngeal endoderm controls arch pattern via regulation of Fgf8 in head ectoderm. *Developmental Biology.* 10.1016/j.ydbio.2006.11.009.
- Helms J.A. y col. 1997. *Sonic hedgehog* Participates in Craniofacial Morphogenesis and Is Down-regulated by Teratogenic Doses of Retinoic Acid. *Dev Biol* 187, 25–35.
- Helms J.A. y col. 2005. New insights into craniofacial morphogenesis. *Development* 132:851–861.
- Hu D. y col. 2003. A zone of frontonasal ectoderm regulates patterning and growth in the face. *Dev.* 130: 1749-1758.
- Jeong J. y col. 2004. Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Gen and Dev.* 18: 937-951.
- Jugessur A. y col. 2003. Variants of developmental genes TGFA, TGFB3, and MSX1) and their associations with orofacial clefts: a case-parent triad analysis. *Gen. Epidemiol.* 24(3):230-239.
- Kang P. y Svoboda K.K.H. (2005). Epithelial-Mesenchymal Transformation during Craniofacial Development. *J Dent Res* 84(8):678-690.

- Kondo S y col. 2002 Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet* 32(2): 285-289.
- Kimmel C.B. y col. 1995. Stages of embryonic development in the zebrafish. *Dev Dyn.* 203: 253-310.
- Lee J.D. y Treisman J.E. 2001. Sightless has homology to transmembrane acyltransferases and is required to generate active Hedgehog protein. *Curr. Biol.* 11:1147-1152.
- Lin H.F. y col. 2005. Comparison of the power between microsatellite and single-nucleotide polymorphism markers for linkage and linkage disequilibrium mapping of an electrophysiological phenotype. *BMC Genet* .6 Suppl 1:S7.
- MacDonald M.E. y col. 2004. Upper beak truncation in chicken embryos with the *cleft primary palate* mutation is due to an epithelial defect in the frontonasal mass. *Dev Dyn.* 230, 335-349.
- Maity T. y col. 2005. Molecular mechanisms of Sonic hedgehog mutant effects in holoprosencephaly. *PNAS* 102(47) :17026-17031.
- Maniatis T. y col. 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Marazita M. y col. 2002. Genome scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate, in Chinese multiplex families. *Am J Hum Genet.* 71: 349-364.
- Marazita M. y col. 2004. Genome-scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate in consanguineous families from Turkey. *Am J Med Genet.* 126: 111-122.
- Martin E.R. y Kaplan N.L. 2000. A Monte Carlo procedure for two-stage tests with correlated data. *Genet Epidemiol* 18: 48-62.
- Micchelli C.A. y col. 2002. Rasp, a putative transmembrane acyltransferase, is required for Hedgehog signaling. *Development.* 129: 843-851.
- Moreno L. y col. 2004. Genetic analysis of candidate loci in non-syndromic cleft lip families from Antioquia-Colombia and Ohio. *Am J Med Genet.* 125: 135-144.
- Muenke M. y Beachy P.A. 2000. Genetics of ventral forebrain development and holoprosencephaly. *Curr Opin Genet Dev.* 10: 262-269.

- Murray J.C. 2002. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet* 61: 248–256.
- Murray J.C. y Schutte B.C. 2004. Cleft palate: players, pathways, and pursuits. *J. Clin. Invest.* 113, 1676–1678.
- Nagamine C.M. y col. 1989. A PCR artifact: generation of heteroduplexes. *Am J Hum Genet.* 45: 337-339.
- Nanni L. y col. 1999. The mutational spectrum of the *Sonic Hedgehog* gene in holoprocencephaly: *SHH* mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprocencephaly. *Hum. Mol. Genet.* 8: 2479-2488.
- Nataraj A. y col. 1999. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis.* 20: 1177-1185.
- Nazer J. y col. 2001. Malformaciones congénitas en Chile.: Un problema emergente (período 1995-1999). *Rev Méd Chile* 129(8): 895-904.
- Nieuwenhuis E y Hui C. 2004. Hedgehog signaling and congenital Malformations. *Clin Genet.* 67:193–208.
- Nollau P y Wagener C. 1997. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. *Clin Chem.* 43: 1114-1128.
- Orioli I.M. y col. 2002. Mutational Analysis of the Sonic Hedgehog Gene in 220 Newborns with Oral Clefts in a South American (ECLAMC) Population. *Am J Med Genet.* 108:12-15
- Palomino H.M. y col. 1997. Facial clefting and Amerindian admixture in populations of Santiago, Chile. *Am J Hum Biol.* 99: 225-232 (a).
- Palomino H. y col. 1997. Complex segregation analysis of facial clefting in Chile. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 17:57-64 (b).
- Prescott N. y col. 2000. Identification of susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a two stage genome scan of affected sib-pairs. *Hum Genet.* 106:345-350.
- Radlanski RJ y Renz H. 2006. Genes, Forces, and Forms: Mechanical Aspects of Prenatal Craniofacial Development. *Developmental Dynamics* 235:1219–1229.

- Rice R. y col. 2004. Disruption of *Fgf10/Fgfr2b*-coordinated epithelial-mesenchymal interactions causes cleft palate. *J. Clin. Invest.* 113:1692–1700
- Rice R. y col. 2006. Expression patterns of Hedgehog signalling pathway members during mouse palate development. *Gen Expr Pat.* 6:206-212
- Sania F.V. y col. 2005. Fate-mapping of the epithelial seam during palatal fusion rules out epithelial-mesenchymal transformation. *Dev. Biol.* 285: 490–495.
- Santagati F. y Rijli F.M. 2003. Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nat Rev Neurosc.* 4: 806-818
- Santos J.L. y col. 2002. Uso de tríos caso-padres en estudios epidemiológicos de asociación entre polimorfismos genéticos y enfermedades complejas. *Rev Med Chile.* 130: 1306-1315.
- Schaid D.J. y Jacobsen S.J. 1999. Biased Tests of Association: Comparisons of Allele Frequencies when Departing from Hardy-Weinberg Proportions. *Am J Epidemiol.* 149:706-11.
- Schilling T. 1997. Genetic analysis of craniofacial development in the vertebrate embryo. *BioEssays* 19: 459-468.
- Schultz R. y col. 2004. Targeted scan of fifteen regions for nonsyndromic cleft lip and palate in Filipino families. *Am J Med Genet.* 125A: 17-22.
- Schutte B.C. y Murray J.C. 1999. The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum. Mol. Genet.* 8:1853–1859.
- Spielman R.S. y col. 1993. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet.* 52: 506-16.
- Stanier P y Moore G.E. 2004. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet* 1;13 Spec No 1:R73-81. Epub 2004 Jan 13.
- Tolarova M.M. y Cervenka J. 1998. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. *Am J Med Genet* 75(2): 126-37.
- Valenzuela C.Y. 1988. On sociogenetic clines. *Ethol Sociobiol.* 9: 259-268.
- Vanderas A.P. 1987. Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. *Cleft Palate J* 24(3): 216-25

- Varjosalo M. y Taipale J. 2007. Hedgehog signaling. *J Cell Sci.* 120: 3-6.
- Wada N. y col. 2005. Hedgehog signaling is required for cranial neural crest morphogenesis and chondrogenesis at the midline in the zebrafish skull. *Dev.* 132:3977-3988.
- White W.B. y col. 1992. Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics.* 12: 301-306.
- Wyszynski D. y col. 2003. A genome-wide scan for loci predisposing to non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in two large Syrian families. *Am J Med Genet.* 123: 140-147.
- Zeiger J.S. y col. 2003. Evidence for linkage of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate to a region on chromosome 2. *Eur J Hum Genet.* 11: 835-839.
- Zhang W. y col. 2006. Cdo Functions at Multiple Points Short Article in the Sonic Hedgehog Pathway, and Cdo-Deficient Mice Accurately Model Human Holoprosencephaly. *Developmental Cell.*10:657-665.
- Zhang Z. y col. 2002. Rescue of cleft palate in Msx1-deficient mice by transgenic Bmp4 reveals a network of BMP and SHH signaling in the regulation of mammalian palatogenesis. *Dev.* 129: 4135-4146.
- Zuccherro T.M. y col. 2004. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *N Engl J Med* 19; 351(8): 769-780.