



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

“Estudio piloto: Asociación entre niveles de metilación global de ADN y riesgo de presentar fisura labiopalatina no sindrómica en una muestra chilena”

Natalia Paola Millacura Valenzuela

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

TUTOR PRINCIPAL
Dr. José Suazo Sanhueza

Adscrito a Proyecto FIOUCH – ENLACE 004/2015

Santiago - Chile

2016



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

“Estudio piloto: Asociación entre niveles de metilación global de ADN y riesgo de presentar fisura labiopalatina no sindrómica en una muestra chilena”

Natalia Paola Millacura Valenzuela

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

TUTOR PRINCIPAL
Dr. José Suazo Sanhueza

Adscrito a Proyecto FIOUCH – ENLACE 004/2015

Santiago - Chile

2016

*“Si no escalas la montaña,
jamás podrás disfrutar del paisaje”*

Pablo Neruda

AGRADECIMIENTOS

A mi papá, que con su esfuerzo y su aliento, nunca me dejó caer. A mi mamá, que siempre confió en mí y en mis capacidades; y que a través de su fe y su oración, me acompañó a pesar de la distancia.

A mis tíos, Mariana y Patricio, que me adoptaron y me quisieron como una hija más, y con los que pude contar siempre, como mis amigos.

A mis amigos, Nacho y Jorge, que siempre fueron incondicionales, quienes se convirtieron en mi familia, y me acompañaron en los momentos más duros.

A mi profesor José que me enseñó todo lo necesario para desarrollar este proyecto, y que con paciencia me apoyó en todo el proceso.

A mis compañeros de Universidad, que cada día hicieron ameno el sacrificio y el esfuerzo por superarnos cada día.

ÍNDICE

RESUMEN	5
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	7
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
METODOLOGÍA	22
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	31
FORTALEZAS Y DEBILIDADES DE ESTE ESTUDIO	35
CONCLUSIONES	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXOS	46

RESUMEN

Introducción: La fisura labiopalatina no sindrómica (FL/PNS) corresponde a la malformación congénita de mayor frecuencia que afecta al territorio máxilofacial. En Chile es un problema de Salud pública debido a la alta incidencia, el alto impacto en la calidad de vida de los pacientes, el elevado costo de su tratamiento y los pocos especialistas existentes en el país, más aún en el servicio público. En el marco de los estudios metabólicos y genéticos que tienen relación con la etiología de estas malformaciones, la investigación en torno al rol del folato, su metabolismo y el impacto en los niveles de metilación global del ADN, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la relación entre los niveles de 5-metil-citosina en ADN de origen leucocitario y el riesgo de presentar FL/PNS en una muestra de la población chilena.

Material y métodos: Se llevó a cabo un estudio piloto basado en el diseño de casos y controles. El estudio incluyó un grupo de individuos con FL/PNS provenientes de hospitales públicos de la región Metropolitana (casos, N=20); quienes presentaban alteración de labio, y podían o no presentar compromiso de reborde alveolar, paladar secundario y/o velo palatino; con presentación unilateral o bilateral. El grupo control fue constituido por individuos sanos (control, N=20), pareado por edad y género, compuesto por estudiantes de Odontología de la Universidad de Chile. El ADN genómico se obtuvo a partir de leucocitos de sangre periférica de los individuos enrolados en este estudio. Los niveles de metilación global de ADN fueron determinados mediante el uso del kit MethylFlash™ Methylated DNA Quantification (Epigentek), el cual utiliza una plataforma ELISA de escala colorimétrica. Este método utiliza anticuerpos de captura específicos para 5-metil-citosina. Los niveles fueron cuantificados y comparados entre los individuos de los grupos caso y control.

Resultados: Los niveles globales de ADN metilado fueron significativamente menores en los individuos del grupo caso en comparación con los individuos del grupo control ($p < 0,0001$).

Conclusiones: Los resultados de nuestro estudio sugieren fuertemente que existe una contribución de la disminución del ADN metilado al aumento del riesgo de desarrollar fisuras labiopalatinas no sindrómicas; esto apoya la hipótesis de que el

metabolismo del folato y su relación con la capacidad de metilación podría jugar un rol importante en la etiología de las FL/PNS. Sin embargo, estos resultados deben ser corroborados en muestras de mayor tamaño y analizando varias otras variables.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

FISURA LABIO PALATINA

Las fisuras labiopalatinas o fisuras labiales con o sin fisura palatina (FL/P) son uno de los defectos congénitos más frecuentes en humanos (Bhaskar y cols., 2011). Pueden ocurrir en conjunto con algún complejo de malformaciones, de manera que forman parte de algún síndrome, o bien como una anomalía aislada. Aquellas no sindrómicas (fisuras aisladas o con otras malformaciones que no son parte de alguna entidad sindrómica conocida) son variadas y presentan una etiología compleja (Singh S y Singh V, 2012). La evidencia sugiere que la fisura labiopalatina no sindrómica (FL/PNS) tiene un origen multifactorial donde factores genéticos y ambientales durante el período de periconcepción estarían involucrados en su etiología (Setó-Salvia y Stanier, 2014; Sabbagh y cols., 2015).

EPIDEMIOLOGÍA

Las FL/Ps son las malformaciones craneofaciales más frecuentes en el mundo. En Chile representan un problema importante debido a su prevalencia y consecuencias que afectan la calidad de vida tanto de los individuos que la presentan como a su entorno familiar (Nazer y cols., 2010). Su rehabilitación tiene un alto costo económico y su tratamiento suele completarse incluso hasta los 15 años, cuando la cirugía ortognática es requerida (Carrasco y cols., 2011).

Las fisuras orofaciales se clasifican según las estructuras anatómicas involucradas: fisuras labiales, de paladar duro y paladar blando; y éstas pueden ser unilaterales o bilaterales (Corbo y Marimón, 2001). La FL/PNS es más prevalente en varones, quienes duplican los casos respecto de las mujeres. La presentación de fisura más prevalente es la fisura labial unilateral, con el 80 a 85% de los casos (Setó-Salvia y Stanier, 2014).

La prevalencia mundial de las FL/Ps es de 0,8 por cada 1.000 recién nacidos vivos (RNV), mientras que en Chile el valor se duplica, presentándose 1,8 casos por cada 1000 RNV (Nazer y Cifuentes, 2014), donde las regiones que acumulan el

62% de los casos son la Metropolitana, V y VII (Ministerio de Salud, Chile, 2009). Esta patología es más frecuente en poblaciones de origen asiáticas y amerindias. En Chile, su incidencia presenta variaciones de naturaleza geográfica y socio-económica, pero fuertemente asociada a un componente genético amerindio, y propio de la mayoría de las poblaciones actuales que viven en el área andina de Sudamérica (Palomino y cols., 2000).

CLÍNICA

Las FL/P surgen como consecuencia de disrupciones en los distintos mecanismos embriológicos que ocurren durante el proceso de desarrollo de la región maxilofacial (Palomino y cols., 2000). La FL/P trae como consecuencia al paciente múltiples problemas en la alimentación, respiración nasal, audición, crecimiento facial, desarrollo dental, fonoarticulación, estéticos y psicológicos, cuyo grado varía en relación al compromiso labial, arcada dentaria, de la oclusión, paladar y nariz (Godoy y cols., 2010).

Numerosos síndromes pueden tener entre sus manifestaciones la FL/P, ya sea síndromes por aberraciones cromosómicas como el síndrome de Patau, así como por entidades monogénicas como el síndrome de Van der Woude (Seelan y cols., 2012). La evidencia señala que entre 65 a 70% de las FL/P que se presentan son de tipo aisladas, es decir, fisuras labiopalatinas no sindrómicas (FL/PNS) (Tolarova, 2016).

La literatura señala que las FL/PNS presentan un componente genético en su etiología ya que existe un antecedente familiar en un 20 a 30% de los casos (Ruda y cols., 2012).

Las estructuras embriológicas que tienen relación con las FL/P y que determinan su clasificación en función a la severidad son el paladar primario y el secundario. El paladar primario constituirá labio, reborde alveolar y dientes de canino a canino; el paladar secundario incluye paladar duro y paladar blando (Sadler, 2012).

La variada morfología a que pueden dar lugar las fisuras labio-alveolo-palatinas por implicar la deformidad de 4 estructuras diferentes: labio, alveolo, paladar duro y paladar blando, sumado a la posibilidad de que la alteración sea unilateral o bilateral, ha dificultado a los clínicos a establecer una nomenclatura única para las fisuras orofaciales. Una de las nomenclaturas más usada hoy en día por los clínicos es la planteada por Stark y Kernahan en 1958, la cual incluye todas las posibilidades de fisuras de paladar primario y secundario. Esta es más bien práctica y utiliza el esquema “Y”, que permite graficar el tipo de fisura y las estructuras que se ven afectadas (**Figura 1**) (Corbo y Marimón, 2001).

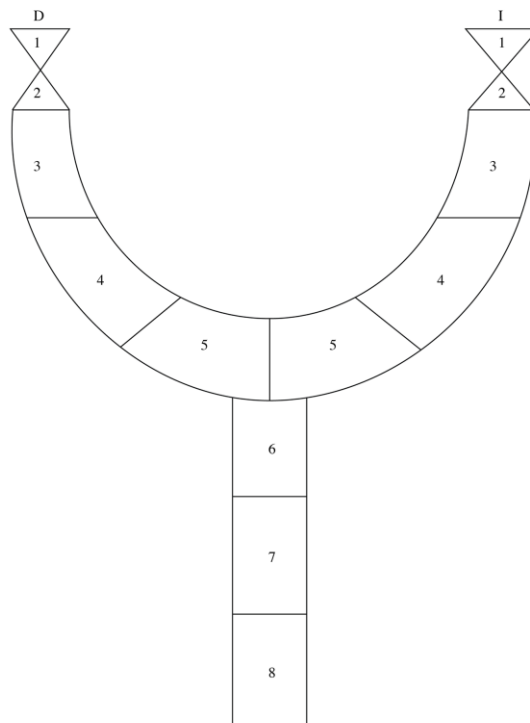


Figura 1. Esquema “Y” de Stark y Kernahan para el registro de fisuras orofaciales. D: Lado derecho; I: Lado izquierdo; 1: alas nasales; 2: pisos de las fosas nasales; 3: labios; 4: alvéolos; 5: paladar óseo entre alvéolos y agujero palatino; 6 y 7: paladar óseo detrás del agujero palatino; y 8: paladar blando. (Adaptado de Corbo y Marimón, 2001).

La Clasificación Internacional de Enfermedades en su versión n°10 (CIE-2010), clasifica a las fisuras labiopalatinas en 3 tipos de acuerdo a las estructuras anatómicas involucradas: Labiales, palatinas y labio-palatinas (ICD, 2010)

Otra clasificación internacionalmente aceptada y aplicada a la investigación respecto de la etiología de las FL/PNS es la desarrollada en el Manual Operacional del Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones congénitas (ECLAMC), en la que se presentan dos tipos de fisuras: La fisura labial con o sin fisura palatina (FL/P) y la fisura palatina (FP), la cual no tiene compromiso labial (Nazer y Cifuentes, 2014).

EMBRIOLOGÍA

La FL/P se produce por una alteración en la fusión de los tejidos que darán origen al labio superior y al paladar, durante el desarrollo embrionario. El desarrollo de estas estructuras depende de 3 procesos biológicos fundamentales: Migración de las células de la cresta neural, la transición epitelio-mesénquima (TEM) y la formación de las estructuras craneofaciales medias (Rincón y cols., 2012). Las anomalías en el tamaño y la forma de las prominencias faciales embriológicas son la base del riesgo de presentar FL/P. El fracaso en lograr el suficiente contacto y fusión entre estas prominencias generan las fisuras (Juriloff y cols., 2014).

Las células que darán origen a los tejidos orofaciales provienen de la cresta neural. Éstas corresponden a una población de células multipotenciales que son inducidas durante la gastrulación hacia el borde de la placa neural, ubicándose entre el ectoderma neural y no neural. Durante la neurulación, células de la cresta neural se especifican como células premigratorias dentro del tubo neural y se inicia la expresión de los marcadores genéticos propios de la cresta neural. Posteriormente, estas células emergen del tubo neural y se someten a una EMT, a través de la cual se crea una lámina desde el neuroepitelio que asume morfología mesenquimática y migran a diferentes partes del cuerpo. Luego de la migración, éstas se diferencian en diversos tejidos como neuronas, células de la glía del sistema nervioso periférico, melanocitos, tejido cardíaco, huesos y cartílagos

craneofaciales, y músculo liso de vasos sanguíneos importantes (Hu y cols., 2014).

En humanos, la boca primitiva inicia su formación entre los 28 y 30 días de gestación con la migración de células desde la cresta neural hacia la región anterior de la cara. En esta etapa se desarrollan los procesos maxilares superiores e inferiores a partir del primer arco faríngeo y el proceso frontonasal. Éste corresponde al límite superior del estomodeo, y en sus extremos laterales se forman engrosamientos de tejido, los cuales se conocen como placodas nasales. En la quinta semana, las placodas nasales se invaginan y dan origen a las fosas nasales; ambas placodas dan origen a una cresta de tejido que rodea cada fosa nasal y se forman los procesos nasales. Las prominencias más externas corresponden a los procesos nasales laterales y los del borde interno serán los procesos nasales medios (Sadler, 2012).

En las próximas dos semanas de desarrollo (6° y 7° semana), los procesos maxilares superiores siguen creciendo en dirección medial, de esta manera, los procesos nasales medios se comprimen hacia la línea media, posteriormente la hendidura que había entre ambos procesos desaparece y finalmente estos tejidos se fusionan. La nueva estructura formada recibe el nombre de segmento intermaxilar y en su zona posterior se dará origen al paladar primario. A pesar de lo anterior, la parte principal del paladar definitivo está constituido por dos protuberancias que provienen de los procesos maxilares superiores. Estas protuberancias reciben el nombre de crestas palatinas, las cuales se constituyen en su totalidad en la sexta semana de gestación y se ubican de manera oblicua y hacia abajo a cada lado de la lengua. Durante la séptima semana, estas crestas ascienden y se disponen de manera horizontal, por encima de la lengua, se fusionan y forman el paladar secundario. En la zona anterior, el paladar primario (componente palatino del segmento intermaxilar) se fusionará hacia posterior con el paladar secundario y constituirán lo que conocemos como paladar duro y paladar blando (Sadler, 2012).

La ausencia de fusión entre el proceso maxilar y los procesos nasales medios (durante el día 36 o 37 de gestación) genera fisuras que involucran labio y estructuras maxilares. Existen muchos fenotipos y características clínicas relacionadas con esta malformación, que difieren de acuerdo a las diferentes estructuras anatómicas involucradas. Se ha observado que las fisuras mixtas que involucran labio y paladar son las que afectan mayor extensión de tejido, y por esta razón, son consideradas como la presentación más severa, por su multidisciplinaria rehabilitación (Del Prete y cols., 2014).

Como queda expuesto previamente, el desarrollo del labio precede a la formación del paladar duro y blando, por lo que los investigadores señalan que la fisura palatina es consecuencia de la fisura labial (Setó-Salvia y Stainer, 2014). Sin embargo, hay estudios que apoyan la idea de que ambas tienen orígenes embriológicos diferentes e independientes (Khandelwal y cols., 2013). Esto se sustenta en que en ambos casos los procesos opuestos (maxilares y palatinos) adhieren a través de desmosomas para formar una lámina epitelial, la que luego desaparece por la transformación epitelio-mesénquima. Sin embargo, en el paladar secundario, este proceso está regulado por el factor TGF β -3, pero este factor no está presente en los procesos maxilares o nasales que conformarían el paladar primario. En la formación del labio participarían otros factores como Shh (Sonic hedgehog) y BMP (proteína morfogenética del hueso) (Rincón y cols., 2012).

ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

A la fecha, no se conoce completamente cuál es la etiología de las FL/P. Estudios apoyan la hipótesis de que podrían tener un origen similar a los defectos del tubo neural (DTN), pues es una patología de fusión de estructura de la línea media. Se ha observado que algunos factores ambientales como el tabaquismo, el alcoholismo materno, enfermedades metabólicas de la madre así como deficiencias nutricionales maternas, especialmente vitamina B6 y folatos, se relacionan con la etiología de estas anomalías, hechos demostrados experimentalmente en modelos animales y en observaciones en humanos (Setó-

Salvia y Stainer, 2014). En este contexto, el déficit de ácido fólico durante el período periconcepcional podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de FL/PNS (Nazer y cols., 2010). El período de periconcepción contempla un mes previo, y tres meses posteriores a la concepción (Singh S y Singh V, 2012). Se ha observado una alta prevalencia de niños con FL/PNS de madres que usaron drogas con acción antagónica del ácido fólico como la fenitoína y el fenobarbital (Kelly y cols., 2012), por lo que podrían asociarse como factor de riesgo. El consumo de fármacos del tipo corticoesteroides (Mostowska y cols., 2011), antiinflamatorios no esteroideos (en especial el naproxeno) (Hernández y cols., 2012) y anticonvulsivantes (Singh S y Singh V, 2012), durante el primer trimestre del embarazo estarían asociados a mayores prevalencias de FL/PNS, sin embargo, aún se necesitan más estudios para establecerlos como agentes causales para el desarrollo de fisuras.

El género fue el primer factor de riesgo que se ha documentado para la FL/PNS. La prevalencia de esta malformación se duplica en varones respecto de las mujeres. Sin embargo, el mecanismo que explique este riesgo diferenciado entre mujeres y varones es aún desconocido y es materia de estudio (Blanton y cols., 2011).

La identificación de los genes que contribuyen a este desorden ha sido un desafío para la ciencia, sin embargo, se han descrito variantes de susceptibilidad en varios genes, incluyendo *IRF6*, *TGFA*, *TGFB3*, *MSX1*, *CRISPLD2*, *MTHFR*, *MTHFD*, *MTR*, *MTRR*, *RFC-1*, *BHMT1*, *BHMT2* y *CBS* (Bhaskar y cols., 2011; Blanton y cols., 2011). Aunque existe evidencia sustancial para considerar que los factores genéticos contribuyen a las fisuras orofaciales, el complejo mecanismo de herencia involucrado es aún poco comprendido. La evidencia indica que la herencia no puede ser explicada mediante modelos genéticos convencionales, pues existe una amplia heterogeneidad génica con expresión extensamente variable (Bhaskar y cols., 2011).

FOLATOS y FL/PNS

La deficiencia de folatos ha sido relacionada con un número importante de defectos congénitos, por ejemplo DTN (Blanton y cols., 2011). La fortificación con ácido fólico como intervención global podría tener éxito en el aumento de la ingesta de éste entre las poblaciones de todo el mundo, especialmente en comunidades menos desarrolladas (Hertrampf y Cortés, 2004). De la misma manera, existen estudios publicados que relacionan la etiopatogenia de las fisuras orofaciales con la disminución de los folatos durante el período de periconcepción (Bhaskar y cols., 2011). A pesar de que hay evidencia que ha reportado un efecto protector del uso de ácido fólico y/o multivitamínicos a través de suplementos y el riesgo de FL/PNS en humanos, no todos los estudios que se han realizado evidencian que la suplementación con ácido fólico tenga este rol protector (Badovinac y cols., 2007). Sin embargo, se ha demostrado que la suplementación en embarazadas que presentaban alto riesgo de tener hijos con FL/PNS, podría disminuir la recurrencia de casos en la familia (Blanton y cols., 2011). La deficiencia de folatos y/o la mutación de genes involucrados en el metabolismo del folato causan defectos orofaciales en modelos animales vertebrados y en humanos (Wahl y cols., 2015). Sabido esto, se ha planteado la hipótesis de que el ácido fólico durante el periodo periconcepcional podría ejercer un rol protector contra las fisuras orofaciales (Blanton y cols., 2011).

Independientemente de lo anterior, el mecanismo subyacente mediante el cual el ácido fólico previene FL/P aún está por definirse (Blanton y cols., 2011). Chile, a pesar de las políticas públicas que incluyen la fortificación de la harina de panificación con ácido fólico desde el año 2000, no ha conseguido disminuir las altas tasas de prevalencia de FL/P (Nazer y cols., 2010).

El término *folatos* se refiere al grupo de ácido fólico y sus derivados. El ácido fólico, específicamente el ácido pteroil-L-glutámico es la forma sintética del folato. Es en esta forma como se usa industrialmente como suplemento nutricional. La especie química natural de los folatos, la cual se proporciona mediante la dieta es reducida. Se presenta generalmente en estado metilado y acompañado de varios residuos de glutamato. De esta manera, la ingesta de folatos es principalmente

poliglutamatos (predominantemente 5-metiltetrahidrofolatos, 5-metilTHF) (Ikeda y cols., 2012).

Estudios epidemiológicos señalan que el consumo de 4 mg diarios de ácido fólico durante el periodo periconcepcional reduce el riesgo de muchos defectos congénitos. Sin embargo, la presencia de altos niveles de homocisteína en sangre de madres de niños con FL/P y otros estudios que asocian el uso materno de ácido fólico y la reducción del riesgo de presentar FL/P, podrían indicar que genes involucrados en el metabolismo de los folatos y de la metionina podrían presentar variantes que además se asocian con la patogenia de las FL/P (Bhaskar y cols., 2011).

Los folatos están involucrados en la transferencia de grupos metilos hacia moléculas relacionadas con múltiples procesos biológicos. Estos grupos metilos o unidades de un carbono, son esenciales para la síntesis de nucleótidos para construcción de ADN (Lucock, 2000). Los folatos están también involucrados en el ciclo de la metionina, específicamente en la vía de la re-metilación, donde se aseguran los adecuados niveles de S-adenosilmetionina (SAM), el principal dador de grupos metilos para metilar el ADN, histonas y otras proteínas (Jones y Takai, 2001). En esta vía de re-metilación, la síntesis de SAM se produce a partir de homocisteína, la cual pasa por una reacción enzimática de dos etapas, pasando por dimetilglicina y metionina, para finalmente generar estos dadores de grupos metilos (Seelan y cols., 2012). La enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es una de las enzimas involucradas en la reacción química que genera la principal forma circulante de folatos y además participa en el metabolismo de la homocisteína. La homocisteína es un aminoácido azufrado que proviene del metabolismo de la metionina anteriormente descrita (Iacobazzi y cols., 2014). Las concentraciones de homocisteína se mantienen gracias a la re-metilación y la vía de la sulfuración; en la primera se vuelve a sintetizar metionina a partir de la homocisteína y, en la vía de transulfuración, la homocisteína es convertida en cisteína (Mandaviya y cols., 2014) (**Figura 2**).

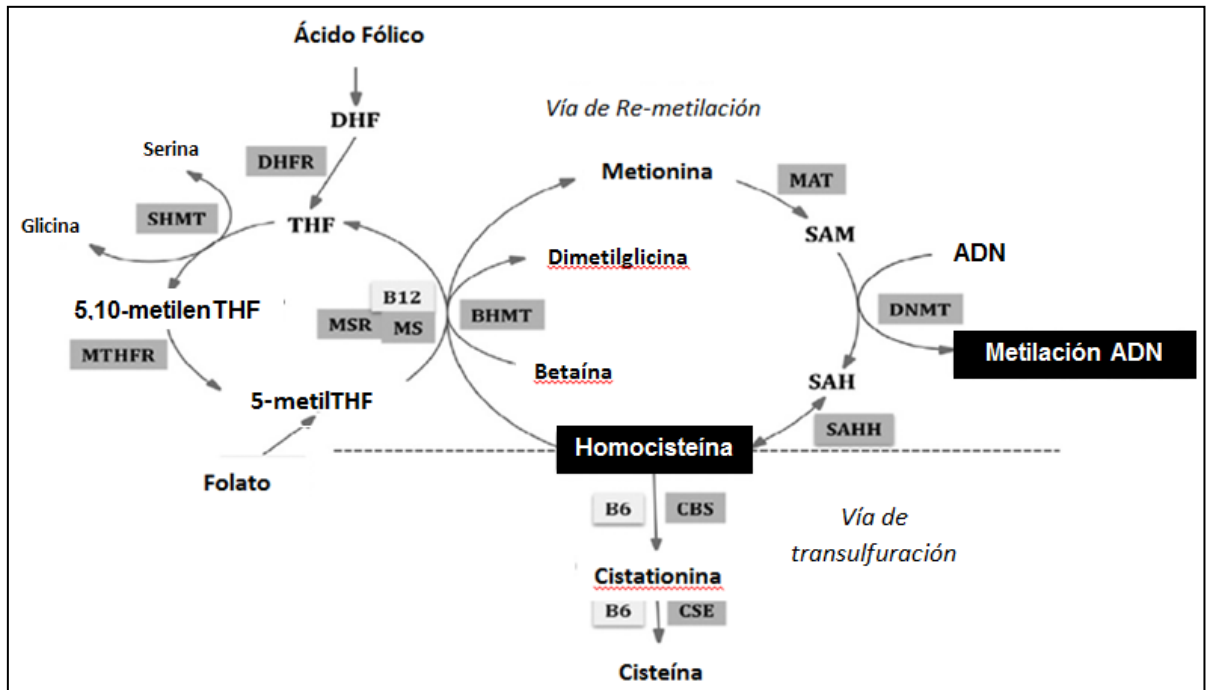


Figura 2. Metabolismo monocarbonado y síntesis de SAM. Se observan las principales enzimas y factores dietéticos involucrados en el metabolismo monocarbonado a partir de los folatos. DHFR: Dihidrofolato reductasa; SHMT: Serina hidroximetiltransferasa; MTHFR: 5,10-Metilentetrahidrofolato reductasa; MSR: Metionina sintasa reductasa; MT: Metionina sintasa; BHMT: Betaína-homocisteína metiltransferasa; MAT: Metionina adenosiltransferasa; DNMT: ADN metiltransferasa; SAHH: S-adenil-L-homocisteína hidrolasa; CBS: Cistationina β -sintasa; CSE: Cistationina γ -liasa; DHF: Dihidrofolato; SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína. La línea punteada separa la vía de la re-metilación de la vía de la transulfuración (Adaptado de Mandaviya y cols., 2014).

En la vía de re-metilación, un grupo metilo es transferido a la homocisteína desde 5-metilTHF, es por esto que los niveles de homocisteína se consideran un buen marcador de los niveles de folatos, pues están inversamente correlacionados (Iacobazzi y cols., 2014). Bajos niveles de folatos y altos niveles de homocisteína en plasma son comúnmente usados como indicadores de ineficiencia en las vías del metabolismo monocarbonado (o de grupos metilo), y son marcadores biológicos para el estrés oxidativo y el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas, aterosclerosis, enfermedad coronaria y defectos congénitos (Duncan y cols., 2013).

Existen estudios que indican que la disminución de los folatos circulantes, así como la hiperhomocisteinemia, se asociarían con un incremento de riesgo para FL/PNS. La desregulación en el metabolismo de la homocisteína podría estar atribuida a factores endógenos (polimorfismos genéticos de las enzimas involucradas en su metabolismo), o bien a factores externos, como la dieta (deficiente ingesta de ácido fólico, vitamina B6 o B12 que son cofactores dentro de la vía metabólica, ver **Figura 2**) (Iacobazzi y cols., 2014). Es por esto que altos niveles de homocisteína podrían afectar procesos importantes del desarrollo fetal, se describe que la motilidad y migración de células de la cresta neural se ven afectadas en individuos que presentan hiperhomocisteinemia (Blanton y cols., 2011).

La hiperhomocisteinemia también se observa en los individuos con fisuras. En un estudio de caso-control, se observó que hubo una mayor proporción de hiperhomocisteinemia en los casos afectados con FL/P que en los controles. Esto sugiere que la homocisteína y su acumulación podría jugar un papel importante como factor de riesgo para presentar FL/P (Kumari y cols., 2013). Altos niveles plasmáticos de homocisteína también se han observado en madres de niños con fisuras orofaciales posterior al nacimiento (Blanton y cols., 2011), por lo que se cree que la hiperhomocisteinemia también tendría rol en la interrupción de procesos celulares importantes para el desarrollo de labio y paladar (Brauer y Tierney, 2004).

Con respecto al metabolismo del ácido fólico y la principal enzima relacionada con él, el rol protector del ácido fólico sobre la FL/P se ha relacionado con los polimorfismos c.677C>T y c1298A>C de la MTHFR (Watkins y cols., 2014). Se reconocen más de 60 mutaciones que podrían afectar la eficiencia de la MTHFR y que explicarían la acumulación de homocisteína y otros residuos metabólicos. Los polimorfismos c.677C>T y c1298A>C están asociados a una reducida actividad de la enzima MTHFR. La presencia del alelo c.677T en el gen reduce la actividad enzimática hasta en un 40%, mientras que dos copias del alelo generan una deficiencia de un 70% (Iacobazzi y cols., 2014). Se ha observado que este polimorfismo del gen *MTHFR* genera una enzima que es termolábil y por eso es

considerado un factor de riesgo para presentar DTN (Van der Put y cols., 1995). Para el caso de las FL/PNS, la presencia del polimorfismo c.677C>T en las madres, le confieren un riesgo aumentado de hasta 4,6 veces para desarrollar fisuras en sus hijos. Si a esto se agrega el factor de deficiencia de ingesta de folatos en el período de periconcepción, se ha observado que este riesgo aumentaría hasta en 10 veces (Singh S y Singh V, 2012).

En síntesis, a pesar de que no hay evidencia que indique con claridad la etiología de las FL/P, se sospecha que el componente genómico relacionado con el metabolismo de folatos y homocisteína podría ser parte importante de la respuesta a esta interrogante.

MECANISMOS EPIGENÉTICOS

La epigenética es el estudio de los cambios heredados que se manifiestan en el fenotipo, o expresión génica mediante mecanismos que no alteran la secuencia de ADN (Seelan y cols., 2012).

Los estudios acerca de cómo funcionan los mecanismos epigenéticos ha sido blanco de mucho interés en el último tiempo, pues estos mecanismos tienen que ver con la relación que pudiese existir entre el medio ambiente dinámico y la regulación de la expresión génica (Van Mill y cols., 2014). Se describen múltiples mecanismos epigenéticos dentro de los que encontramos la metilación del ADN, metilación de histonas, acetilación de histonas, complejo de remodelación de cromatina ATP-dependiente, entre otros. Dependiendo del tipo de regulación, el resultado puede ser una cromatina relajada con un ADN expuesto y accesible para los factores de transcripción o bien puede resultar en una cromatina compactada, de manera que los factores de transcripción se ven imposibilitados de llegar a las regiones promotoras (Hu y cols., 2014). La metilación del ADN es uno de los mecanismos epigenéticos más conocido y es esencial para la embriogénesis y el desarrollo fetal (Van Mill y cols., 2014). La metilación del ADN corresponde a una modificación posterior a la replicación que ocurre en el quinto carbono de la citosina, predominantemente en el dinucleótido CpG, en la cual se agrega un grupo metilo proveniente de SAM (Salpea y cols., 2012). La adición de este grupo

metilo interfiere con la unión de los factores transcripción, de manera que se regula la transcripción del gen y la posterior síntesis proteica (Chowdhury y cols., 2011). Producto de esto, generalmente se produce una represión de la transcripción de los genes adyacentes (Salpea y cols., 2012). Como antes se menciona, el ácido fólico es un elemento central dentro del metabolismo de grupos metilos responsable de la producción de pirimidinas y purinas para la síntesis de ADN y para generar SAM, el cual es dador de metilos necesarios para la metilación de ADN, en una vía que también involucra a la homocisteína (Roctus y cols., 2015). Se entiende que una disminución en los dadores de metilo afecta negativamente en la metilación del ADN (Salpea y cols., 2012).

A pesar de que los patrones de metilación del ADN son tejido específico, la metilación global del ADN en leucocitos de sangre periférica constituye un marcador adecuado del estado de muchos otros tejidos (Woo y Kim, 2012). En células sanguíneas de la serie blanca la metilación puede ser influenciada por ciertos factores demográficos (edad, sexo, etnia), factores de riesgo de comportamiento (consumo de tabaco, alcohol, índice de masa corporal y hábitos dietéticos donde el consumo de folatos es lo más determinante), y polimorfismos del gen *MTHFR* (Babić Božović y cols., 2015).

Investigaciones que relacionan la metilación del ADN y aspectos dietéticos como el consumo de folatos en períodos de periconcepción han estudiado la posible habilidad de restaurar los patrones aberrantes de metilación de ADN a patrones normales mediante intervenciones nutricionales. Esto convierte a la metilación en un potencial blanco terapéutico para patologías que se relacionan con patrones alterados de metilación (Chowdhury y cols., 2011).

La metilación tiene un impacto profundo tanto en la estabilidad como en la expresión de los genes. Durante el desarrollo, el bloqueo epigenético mediante la vía de la metilación del ADN, es uno de los mecanismos más comunes para inactivar vías alternativas para la diferenciación celular (Sadler, 2012). La reducción de la metilación del ADN global podría ser un riesgo genético para que pacientes desarrollen DTN (Iacobazzi y cols., 2014). Se sospecha que podría ser

semejante para las FL/P, pues tanto la migración de las células desde la cresta neural, como la embriogénesis de estructuras orofaciales, están reguladas por mecanismos epigenéticos (Lucock, 2000; Jones y Takai, 2001).

La metilación del ADN sufre cambios durante la vida, la cual tiene su inicio en la concepción. Estudios recientes señalan que la metilación del ADN tanto global como gen-específico, presentan cambios que se relacionan con la edad de los individuos (Jones y cols., 2015). Es más, el patrón de hipometilación se observa como un proceso fisiológico normal durante el envejecimiento, sin embargo, también aparece como posible factor de riesgo que contribuiría al desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad como son el cáncer, aterosclerosis, alzheimer, desórdenes psiquiátricos y patologías de tipo autoinmune (Babić Božović y cols., 2015).

En síntesis, existe una relación entre alteraciones del metabolismo del folato (ambientales y/o genéticas) y el riesgo de FL/PNS. Además, se conoce su rol en la metilación del ADN, por lo que el propósito de este estudio es evaluar la relación que existe entre niveles globales de ADN metilado y riesgo de fisura labiopalatina no sindrómica. Para ello proponemos, un estudio piloto (con un número reducido de individuos) de análisis comparativo de casos y controles, destacando que no existen investigaciones de este tipo para el estudio de esta anomalía congénita.

HIPÓTESIS

Individuos con fisura labiopalatina no sindrómica (con o sin compromiso de paladar y/o velo palatino; unilateral o bilateral) presentan menores niveles de ADN metilado (5-metil-citosina) que los individuos sanos.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar niveles de ADN metilado de origen leucocitario y el riesgo de presentar fisura labiopalatina no asociada a síndromes en una muestra chilena.

Objetivos específicos

- Cuantificar los niveles globales de ADN metilado (5-metil-citosina) de leucocitos de individuos que presentan fisura labiopalatina no sindrómica y de individuos sanos.
- Comparar los niveles globales de ADN metilado (5-metil-citosina) de individuos con fisura labiopalatina no sindrómica e individuos sanos en la muestra total y por género.

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio retrospectivo, observacional, transversal, de tipo caso control. Este se basó en la cuantificación global de ADN metilado de origen leucocitario en individuos con fisura labiopalatina no sindrómica (en todas sus presentaciones) y en individuos sanos. Se establecieron como casos a individuos con fisura labiopalatina no sindrómica (con compromiso labial y/o de reborde y/o de paladar y/o velo palatino) mientras que los controles fueron individuos sanos, sin antecedentes familiares de fisura labiopalatina.

POBLACIÓN OBJETIVO Y MUESTRA

El estudio incluyó una muestra total de 40 sujetos voluntarios, 20 varones y 20 mujeres. Los sujetos del grupo caso fueron seleccionados a partir de bancos de ADN de estudios previos. De ellos, fueron seleccionados veinte, quienes presentaron fisura labiopalatina en cualquiera de sus formas (fisura labial o fisura de labio y paladar, con o sin compromiso de velo palatino), y otros 20 fueron sujetos sanos que no presentaron antecedentes familiares de fisura labiopalatina directos o de segunda generación.

Las muestras biológicas de los sujetos casos fueron extraídas de bancos de ADN de estudios previos a partir de una muestra total de 165 sujetos con FL/P (FONDECYT 1061078, años 2006 - 2010; y 1109015, años 2009 - 2012), las cuales se encontraban almacenadas en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile a 4°C, y contaban con el respectivo consentimiento informado. Las muestras de sangre fueron tomadas en un período comprendido entre los años 2008 y 2011.

El número de la muestra (muestra por conveniencia) fue determinado en función de la capacidad del kit a utilizar, el cual presentaba capacidad para 40 determinaciones, con sus respectivos duplicados y los controles negativos y positivos (96 determinaciones en total).

Para el grupo caso se incluyeron 10 varones y 10 mujeres de edades entre 18 y 30 años, los cuales tenían FL/P en sus diferentes presentaciones, como se

observa en la **tabla 1**. Esta distribución se corresponde con la muestra total a partir de la cual fueron seleccionados los sujetos del grupo caso.

Tabla 1: Distribución y frecuencia (%) de los tipos de fisuras observadas en individuos del grupo caso tanto en varones como en mujeres.

Grupo caso	Tipos de Fisuras labiopalatinas				
	Labial	Labio y reborde alveolar	Labiopalatinas con paladar secundario*	Unilaterales	Bilaterales
Varones	0 (0)	2 (20)	8 (80)	7 (54)	3 (43)
Mujeres	1 (10)	4 (40)	5 (50)	6 (46)	4 (47)
Total	1 (5)	6 (30)	13 (65)	13 (65)	7 (35)

*Con o sin compromiso velo palatino.

Los sujetos controles fueron estudiantes de Odontología de la Universidad de Chile, cuya selección se realizó en función de las edades del grupo de sujetos casos. Las muestras de sangre del grupo control se tomaron en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile por el mismo operador, en el período comprendido entre los meses mayo y julio de 2016 (3 meses). Fueron seleccionados 10 varones y 10 mujeres de la misma edad que los sujetos casos.

El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile conforme a los principios de ética y bioseguridad (ANEXO 1). Cada individuo firmó un documento de consentimiento informado para poder participar en el estudio. Tanto el consentimiento informado, así como el uso de las muestras almacenadas fueron aprobados por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (ANEXO 2) en el contexto del proyecto FIOUCH-Enlace 004/2015.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

a. Criterios de inclusión:

La muestra incluyó sujetos varones y mujeres de edades entre 18 y 30 años. Participaron sujetos que presentaron fisura labiopalatina no sindrómica (con

compromiso de labio y/o reborde alveolar y/o paladar secundario, con o sin velo palatino afectado) y sujetos sanos sin antecedentes familiares de fisura labiopalatina directos o de segunda generación. Todos consintieron su participación en el estudio a través de la firma de un documento que estipula su consentimiento informado (ver ANEXO 3).

b. Criterios de exclusión:

Fueron excluidos de la muestra, casos que presentaban síndromes u otras anomalías de origen genético. De los sujetos del grupo control fueron excluidos quienes tuvieran antecedentes familiares de fisura labiopalatina o de cualquier malformación orofacial.

PROCEDIMIENTOS

Obtención de las muestras

Las muestras de ADN de los casos ya se encontraban disponibles y se hallaban almacenadas por lo que sólo se tomaron muestras de sangre venosa de 5 mL a los sujetos controles. Las muestras fueron tomadas por un único examinador y fueron usados tubos con EDTA como anticoagulante.

Las muestras fueron tratadas inmediatamente para la purificación de su ADN a partir de los leucocitos mediante la técnica descrita por Chomczynski y Sacchi (1987).

Cuantificación de la metilación global de ADN

La proporción global de ADN metilado (5-metil-citosina) fue medida usando el kit *MethylFlash™ Methylated DNA Quantification* (Epigentek) de acuerdo con las indicaciones del fabricante, utilizando 100 ng de ADN. Este método se basa en el uso de anticuerpos de captura específicos para 5-metil-citosina, que luego es cuantificada colorimétricamente en una placa ELISA, mediante la lectura de su absorbancia por un espectrofotómetro. Los niveles de ADN metilado son proporcionales a la absorbancia obtenida. La lectura en el espectrofotómetro fue realizada a 450 nm.

Para la cuantificación absoluta de niveles de 5-mC se utilizó una curva de estandarización creada a partir de soluciones (incluida en el kit) con niveles de 5-mC conocidos y sus valores de absorbancia (DO). Mediante una regresión lineal de esta curva en cuatro de sus puntos, se obtuvo una constante (DO/ng) que permitió obtener una cuantificación absoluta de los niveles de metilación a través de la siguiente fórmula:

$$5\text{-mC}(\text{ng}) = \frac{\text{DO}_{(x)} - \text{DO}_{(\text{Control negativo})}}{\text{Constante}(\text{DO/ng}) \times 2}$$

donde x es la absorbancia obtenida de la lectura de cada muestra. Los resultados obtenidos fueron expresados en ng de 5-metil-citosina. Tanto el control negativo como el positivo fueron soluciones contenidas en el kit previamente descrito.

Análisis de datos:

Se realizó un análisis estadístico descriptivo de las edades de la muestra (variable de tipo cuantitativa, continua e independiente) en base a promedios y desviaciones estándar, y de la distribución de los tipos de fisura (variable cuantitativa, categórica e independiente) que presentó la muestra en base a frecuencias. Previamente al análisis comparativo de los niveles de 5-mC (variable cuantitativa, continua y dependiente), se realizó la prueba de *Shapiro Wilk* para determinar si ésta presenta una distribución normal. El análisis comparativo de los niveles de 5-mC entre casos y controles, por sexo (variable cualitativa, categórica e independiente), por severidad (variable cualitativa, continua e independiente), y por extensión de tejido afectado (unilateral y bilateral; variable cualitativa, continua e independiente). En aquellos que presentaron distribución normal, se aplicó la prueba *t de Student* para comparar promedios y desviaciones estándar. En aquellos datos que no presentaron distribución normal, se compararon medianas y rangos intercuartílicos mediante la prueba de sumas de rangos de *Wilcoxon* para muestras pareadas. Se aceptaron diferencias estadísticas con un nivel de significación menor a 0,05 ($p < 0,05$). Todas las pruebas mencionadas se realizaron utilizando el software *STATA v 12*.

RESULTADOS

Análisis descriptivo:

Este estudio incluyó un total de 40 sujetos, de los cuales 20 correspondieron a individuos que presentaron FL/PNS (casos), y 20 fueron sujetos sanos sin antecedentes familiares de fisuras orofaciales (controles). A su vez tanto el grupo de los casos como el grupo control están constituidos por 10 varones y 10 mujeres. En el grupo de los casos el promedio de las edades fue **21,5** años ($\pm 3,98$ años), mientras que en los controles, el promedio fue **21,5** años ($\pm 3,97$ años). Entre estos grupos la diferencia del promedio de sus edades no es significativa ($p > 0,05$) como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2: **Descripción de las edades de los grupos casos y controles.**

Grupo	Promedios Edad*	Desviación Estándar*	Valor p
Casos	21,5	3,98	0,5
Controles	21,5	3,97	

*Edad expresada en años.

Determinación de niveles de 5-metil-citosina (5-mC) para los grupos caso y control:

La mediana de los niveles de 5-mC en el grupo caso alcanzó un valor de **0,63** ng mientras que para los controles este valor fue de **1,58** ng. Al utilizar la prueba de *Wilcoxon* se determinó que la diferencia de estos valores entre ambos grupos fue estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) (Figura 3).

Los valores de 5-metil-citosina obtenidos se alejan significativamente de lo esperado para una distribución normal tanto en el grupo caso como en el grupo control, de acuerdo a lo obtenido en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk ($p = 0,019$ y $p = 0,024$, respectivamente) es por este motivo que los valores fueron expresados en medianas y rangos intercuartílicos (RIC) para su comparación (Figura 3).

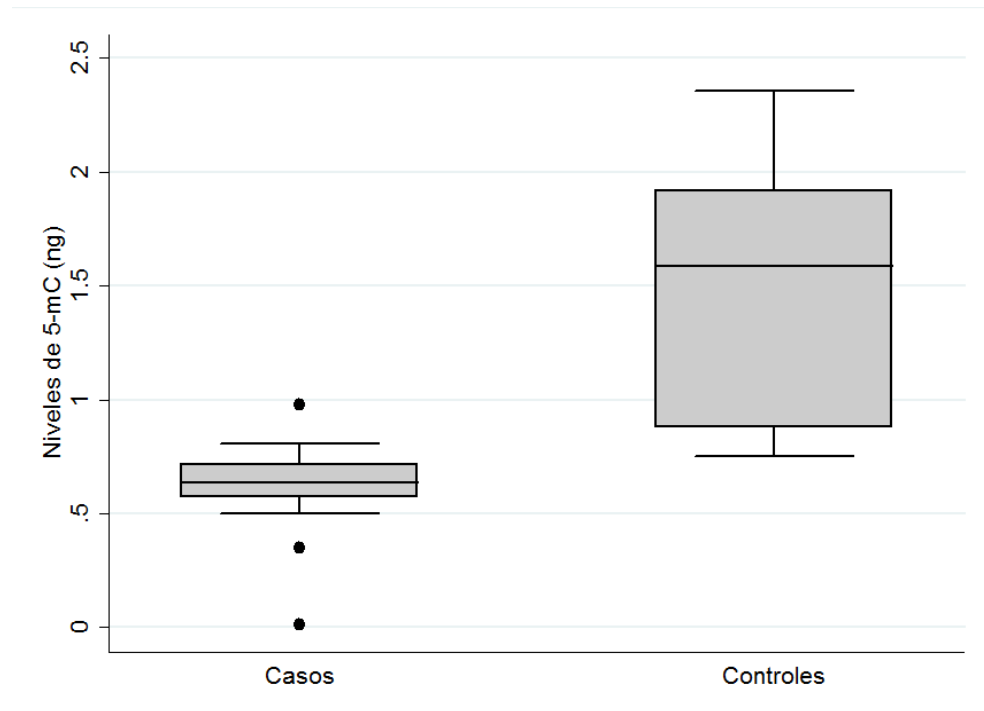


Figura 3: **Niveles globales (mediana) de 5-mC (ng) en el grupo caso y el grupo control.** La mediana observada en el grupo caso fue de **0,63** ng, y el RIC fue 0,14. En el grupo control la mediana observada fue **1,58** ng, y el RIC fue 1,04. $z=-4,89$; $p<0,0001$.

Determinación de niveles de 5-metil-citosina por género.

Varones (grupo caso y control):

El promedio de los niveles de 5-mC observado en los varones pertenecientes al grupo caso fue **0,63** ng ($\pm 0,10$ ng) mientras que el promedio observado en el grupo control fue de **1,22** ng ($\pm 0,46$ ng). Los resultados obtenidos muestran que, al igual que lo observado para la muestra total, existen diferencias estadísticamente significativas en los varones que pertenecen al grupo caso y control ($p = 0,0004$; figura 4).

Los niveles de 5-mC en varones responden a una distribución normal de acuerdo a la prueba de Shapiro-Wilk ($p=0,434$ en casos; $p=0,053$ en controles). Por ello es que los datos fueron expresados como promedios \pm desviación estándar (Figura 4) y para la comparación de datos se utilizó la prueba *t de Student*.

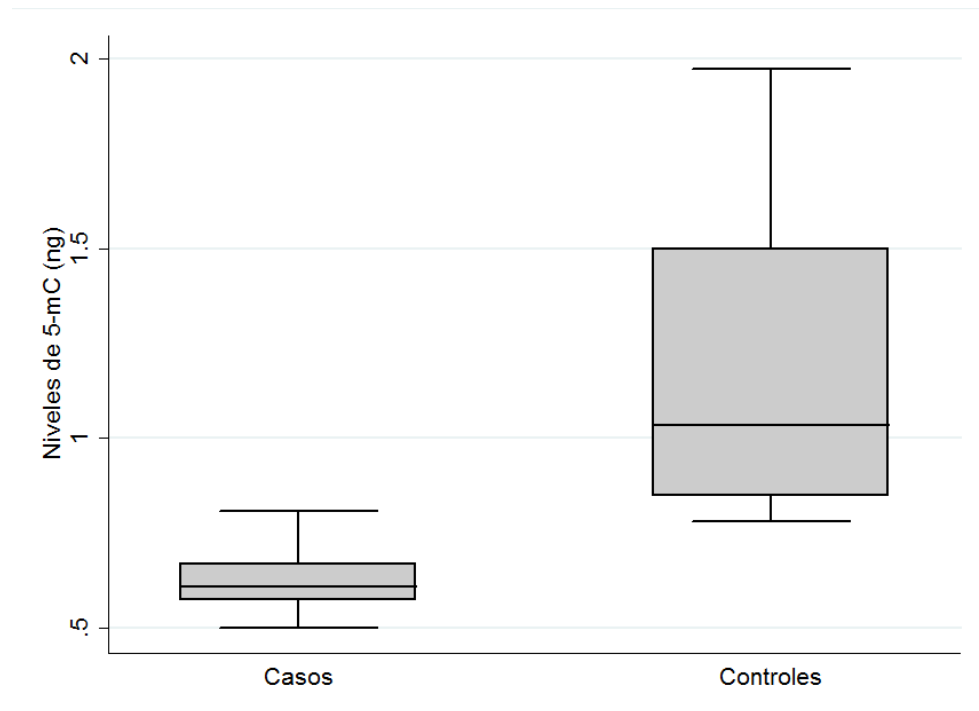


Figura 4: **Determinación de niveles (promedio) de 5-mC (ng) en varones pertenecientes al grupo caso o control.** El promedio de los niveles de 5-mC en el grupo caso fue **0,63 ng** ($\pm 0,10$ ng); en el grupo control el promedio fue **1,22 ng** ($\pm 0,46$ ng). $p=0,0004$.

Mujeres (grupo caso y control):

La mediana observada en mujeres del grupo caso fue de **0,65 ng**; y en el grupo control fue de **1,84 ng**. La prueba no paramétrica de Wilcoxon señala que hay una diferencia estadística significativa entre ambos grupos ($p=0,0007$).

En mujeres los resultados de la medición de 5-mC presentaron distribución normal en el grupo caso, y no normal en el grupo control ($p=0,21$ y $p=0,02$, respectivamente), por este motivo se llevó un análisis no paramétrico y los valores fueron expresados en medianas y RIC (Figura 5).

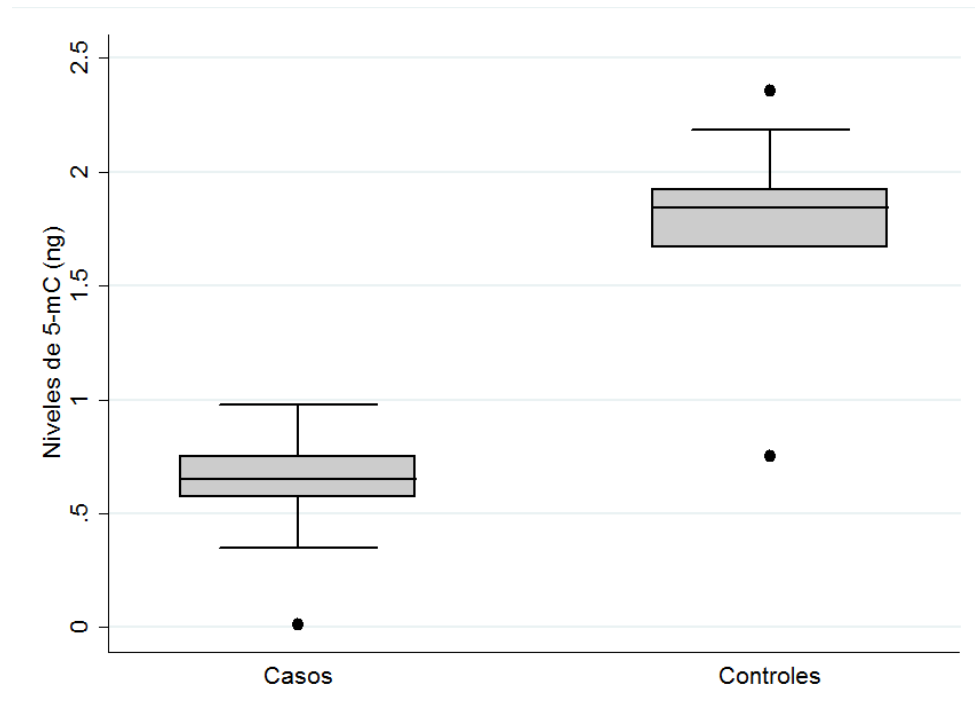


Figura 5: **Niveles globales (mediana) de 5-metil-citosina (ng) en mujeres pertenecientes al grupo caso y control.** La mediana observada en el grupo caso fue de **0,65** ng, y el RIC fue 0,18. En el grupo control la mediana observada fue **1,84** ng, y el RIC fue 0,25. $z = -4,89$; $p = 0,0007$.

Determinación de niveles de 5-metil-citosina por severidad (grupo caso).

La mediana observada en sujetos que presentaban FL/P con compromiso de labio y reborde en el grupo caso fue de **0,68** ng; y en aquellos sujetos que además presentaban compromiso de paladar duro y/o velo palatino, la mediana fue de **0,58** ng (**Tabla 3**). La prueba no paramétrica de Wilcoxon señala que hay una diferencia estadística significativa entre ambos niveles de severidad de acuerdo a los tejidos comprometidos ($p = 0,035$).

Tabla 3: Comparación de niveles globales (mediana) de 5-metil-citosina (ng) de acuerdo a nivel de severidad, pertenecientes al grupo caso.

Severidad	Mediana	RIC	Valor z <i>Wilcoxon</i> *	Valor p
Labio y reborde alveolar	0,68	0,14	2,1	0,035
Labio, reborde y paladar secundario	0,59	0,14		

*Prueba no paramétrica de *Wilcoxon*.

Determinación de niveles de 5-metil-citosina por extensión de tejido afectado (grupo caso).

La mediana observada en sujetos que presentaban FL/P unilateral en el grupo caso fue de **0,66** ng; y en aquellos sujetos que presentaban compromiso bilateral, la mediana fue de **0,61** ng (**Tabla 4**). La prueba no paramétrica de *Wilcoxon* señala que no hay una diferencia estadística significativa entre ambos grupos ($p=0,165$).

Tabla 4: Comparación de niveles globales (mediana) de 5-metil-citosina (ng) de acuerdo a nivel de severidad, pertenecientes al grupo caso.

Extensión de tejido afectado	Mediana	RIC	Valor z <i>Wilcoxon</i> *	Valor p
Unilateral	0,66	0,21	1,39	0,165
Bilateral	0,61	0,14		

*Prueba no paramétrica de *Wilcoxon*.

DISCUSIÓN

Con el objetivo de dilucidar la etiología de las FL/PNS, se ha puesto atención a la interacción genético-ambiental relacionada a los dadores de metilo como el folato, especialmente en el metabolismo monocarbonado. Dada la importancia de estos dadores de metilo necesarios para la metilación del ADN, esta investigación tuvo como objetivo analizar los niveles globales de metilación de ADN y riesgo de presentar FL/PNS en una muestra de individuos Chilenos con FL/PNS e individuos sanos.

Usando una muestra de 20 casos chilenos de FL/PNS y 20 controles (pareados por edad y sexo), las mediciones de metilación total de ADN muestran que los individuos afectados presentan valores significativamente menores que los controles (**Figura 3**). Esto nos permite sugerir que bajos niveles de metilación del ADN confieren un incremento de riesgo para FL/PNS en esta muestra de la población Chilena. Considerando que el género fue el primer factor de riesgo evidente que se ha documentado para la FL/PNS, donde los individuos varones presentan hasta el doble de probabilidades de presentar FL/PNS (Blanton y cols., 2011), se tomó en cuenta parear los grupos para esta variable y además, realizar un análisis independiente para cada género. Además, se parearon por edad, ya que la evidencia señala que tanto el envejecimiento como el desarrollo de los individuos afecta de manera directa la metilación del ADN (Jones y cols., 2015). Como se observó tanto para varones (**Figura 4**) como para mujeres (**Figura 5**), el grupo caso mostró niveles significativamente menores de 5-mC que el grupo control. En el análisis de acuerdo a la severidad de FL/P, la presentación más severa de la anomalía presentó niveles de metilación menores que aquellos que presentaban FL/P con menor compromiso de tejidos (**Tabla 3**).

Por ello es posible sugerir que la deficiencia en la metilación de ADN es un factor de riesgo para FL/PNS en forma independiente del género de los individuos, y que además los menores niveles globales de 5-mC podrían sugerir una influencia sobre el nivel de severidad en el desarrollo de las FL/P.

La explicación de estos bajos niveles de metilación global en los individuos con FL/PNS podría tener origen en los niveles de folatos y/o en su metabolismo, dado que estos son precursores del principal dador de grupos metilos (SAM), que es esencial para llevar a cabo la metilación de ADN (Mandaviya y cols., 2014). Bajos niveles de metilación global de ADN pueden deberse a deficiencias en cualquiera de las vías metabólicas que aportan los dadores de metilo. En ese contexto, la baja ingesta de folatos propiamente tales, baja ingesta de cofactores que participan en el metabolismo monocarbonado (vitaminas B12, B6, colina, betaína, etc), deficiencias enzimáticas dentro de las vías metabólicas relacionadas con la síntesis de dadores de metilo (MTHFR, MTHFD, MTR, MTRR, RFC-1, BHMT1, BHMT2 y CBS) y agentes antagonistas de estas vías metabólicas (como el ácido valproico, utilizado como anticonvulsivante y para tratar trastornos del ánimo) podrían explicar el menor grado de metilación global de ADN de los individuos que presentan FL/PNS (Van Mill y cols., 2014).

A pesar de que los resultados son consistentes y las diferencias son considerablemente significativas entre los individuos de los grupos caso y control, estos deben ser interpretados con cierta cautela, pues no existe conocimiento certero acerca de la dieta de las madres de la muestra durante el período de periconcepción, por lo tanto la variable dieta materna no está controlada. Pero como antecedente a considerar, los individuos del grupo caso de la muestra estudiada nacieron entre los años 1980 y 1992; y por otro lado, los individuos del grupo control nacieron entre los años 1987 y 1999, por lo tanto ambos grupos de estudio nacieron antes de la implementación de la política de fortificación de harinas de panificación con ácido fólico que se llevó a cabo a partir de enero de 2000 (Hertrampf y Cortés, 2004). Por lo tanto, ambos grupos presentan diferencias nutricionales a nivel individual y la dieta de las madres no fue influenciada por las políticas públicas pues se implementaron después del nacimiento de los individuos analizados.

Respecto a otros factores que podrían incidir en la ingesta de ácido fólico, Kelly y cols. (2012) estudiaron factores que pudieran tener influencia en la baja ingesta de folatos durante el embarazo y que tuvieran relación con el desarrollo de FL/PNS.

Aquellos que tuvieron significancia estadística fueron la baja edad materna, el bajo nivel educacional, bajos ingresos económicos y dado lo anterior, el bajo nivel socioeconómico (Kelly y cols., 2012). El presente estudio presenta una muestra heterogénea, donde los sujetos del grupo caso fueron seleccionados desde la red de hospitales públicos de Santiago, mientras que los del grupo control fueron seleccionados entre los estudiantes de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. El nivel socioeconómico diferenciado entre ambos grupos puede haber influenciado la ingesta de ácido fólico durante el embarazo. En este contexto, futuros estudios que involucren medir la ingesta de ácido fólico durante el embarazo mediante el uso de instrumentos objetivos, son necesarios para evaluar su impacto en los niveles de metilación de ADN, además de incluir el nivel socioeconómico como otra variable más dentro del estudio, de manera de descartar ese factor de riesgo para la baja ingesta de folatos a través de la dieta.

A partir de la premisa que la muestra presenta diferencias nutricionales respecto a la ingesta de folatos, el estudio genómico permite conocer el escenario metabólico que pudiese explicar las diferencias de metilación entre los individuos de los grupos caso y control.

Con respecto a la metilación del ADN, ésta puede ser medida en 3 niveles: global, a nivel genoma completo y respecto de un gen en específico. Entendemos la metilación medida a nivel global como el contenido total de 5-mC (Mandaviya y cols., 2014); a nivel genoma completo, cuando se mide la metilación a nivel de secuencias repetidas no codificantes ricas en dinucleótidos CpG que se encuentran a lo largo de todo el genoma (Jones y cols., 2015), y a nivel gen específico cuando se establecen los niveles de citosinas ubicadas en genes específicos o en sus zonas promotoras (Mandaviya y cols., 2014).

A la fecha no hay estudios que relacionen los niveles globales de metilación de ADN con la etiología de la FL/PNS, sin embargo, se ha observado que la hipometilación global del ADN podría contribuir a la inestabilidad cromosómica, alterar la expresión génica, alterar la diferenciación celular y la apoptosis durante la embriogénesis (Chowdhury y cols., 2011), por lo que se ha asociado como factor de riesgo para desarrollar enfermedades degenerativas como el alzheimer,

diabetes mellitus tipo II, cáncer, aterosclerosis, desórdenes psiquiátricos y patologías autoinmunes, además de alteraciones congénitas de tipo cardíacas, defectos del tubo neural y alteraciones cromosómicas como el síndrome de Down (Babić Božović y cols., 2015).

La enzima MTHFR está involucrada en la reacción química que genera la principal forma circulante de folatos a partir de la dieta, la cual es una de las reacciones centrales del metabolismo monocarbonado (Iacobazzi y cols., 2014). Se conocen múltiples mutaciones en el gen *MTHFR* que podrían afectar la eficiencia de la enzima. Los polimorfismos c.677C>T y c1298A>C están asociados a una actividad enzimática reducida, y se sabe que la presencia del alelo c.677T podría reducir la actividad enzimática hasta en 40%, mientras que dos copias del alelo generan una deficiencia de un 70% (Iacobazzi y cols., 2014). La ineficiencia de la enzima podría alterar los niveles de metilación global del ADN, por su función en síntesis de SAM, el principal dador de metilos necesarios para la metilación del ADN (Mandayiva y cols., 2014).

Considerando la importancia de la presencia alélica T en el polimorfismo c.677T para el gen *MTHFR*, decidimos complementar los resultados con el genotipo de la muestra, para poder determinar si la presencia de este polimorfismo pudiera ser responsable de una función diferenciada de la enzima MTHFR, alterando los niveles de dadores de metilo y si esto estaría influenciando los resultados. Es así que, en el contexto de otro trabajo de tesis de nuestro laboratorio (datos no publicados) se observó que la frecuencia del alelo T no era significativamente mayor en individuos del grupo caso en comparación a los individuos del grupo control ($p=0,678$). A pesar que la muestra es reducida, al menos en ella la diferencia en la metilación global del ADN no se debería a la actividad deficiente de la enzima MTHFR. Resultados similares fueron observados por Wang y cols. (2016) en un meta-análisis publicado recientemente, que incluyó 10 estudios que relacionaban el polimorfismo c.677C>T con niveles de metilación de ADN.

Debilidades y fortalezas de este estudio

A la fecha, la evidencia está limitada respecto a estudios que examinan la relación entre la ingesta de ácido fólico y el riesgo de desarrollar FL/PNS. Desde una perspectiva científica, los estudios clínicos randomizados son los ideales para establecer causalidad (Manterola y Otzen, 2014). Sin embargo, para llevar a cabo este tipo de investigación, una gran muestra es necesaria para pesquisar casos nuevos, pues la prevalencia de la FL/PNS en Chile es 1,8 casos por cada 1000 RNV (Ministerio de Salud, Chile, 2009). Además, desde el punto de vista ético, no es válido exponer a individuos a factores de riesgo que propician el desarrollo de ésta y otras patologías, como es el caso de la baja ingesta de folatos en el período de periconcepción, lo que ha sido evidenciado en otras investigaciones, ya que es factor de riesgo también para desarrollar DTN (Rohtus y cols., 2015). Debido a lo anterior, es que se llevó a cabo un estudio piloto con una muestra de individuos reducida, y se prefirió un estudio de tipo retrospectivo, de casos y controles.

La etnicidad ha sido reportada como un factor que tiene relación no sólo con la prevalencia de FL/PNS, sino que también se ha descrito que poblaciones de diferentes orígenes étnicos presentan patrones diferentes de metilación global de ADN (Babić Božović y cols., 2015). Palomino y cols. (1997) observaron que el componente amerindio se correlacionaba positivamente con mayores prevalencias de FL/PNS en la población Chilena y que esto podría explicarse desde la sociogenética (Palomino y cols., 1997). Entendemos la sociogenética como el estudio de factores genéticos que han sido condicionados o determinados por la estructura social de las poblaciones. Los estudios sociogenéticos se basan en investigar la interacción entre lo social y las estructuras genéticas de las poblaciones (Valenzuela, 2011).

Investigaciones sociogenéticas de larga data señalan que la población Chilena, está marcadamente estratificada desde el punto de vista genético, donde el genoma ha sido influenciado por factores sociales, étnicos y culturales. Se ha observado que individuos de estratos socioeconómicos diferentes presentan patrones genómicos distintos (Valenzuela, 2011). El componente caucásico de la población chilena es producto de la llegada de los españoles y el amerindio es

propio de la población nativa que tenía Chile en la época de la conquista, y al parecer estos componentes étnicos, si bien se han ido mezclando con los años, aún mantienen una estructura diferenciada respecto a estratos socioeconómicos hasta la fecha. Valenzuela (2011) observó que el grupo sanguíneo O era significativamente más prevalente en estratos socioeconómicos bajos, mientras que los grupos A y B eran más propios de estratos socioeconómicos altos, lo que a su vez se corresponde con el componente amerindio y caucásico, respectivamente (Valenzuela, 2011). Lo mismo ocurre con la FL/PNS, cuya prevalencia también presenta un patrón diferenciado de acuerdo al nivel socioeconómico: la evidencia señala que tanto el ingreso familiar como el estrato socioeconómico son factores de riesgo para desarrollar FL/PNS (Kelly y cols., 2012).

Sin embargo, la asociación entre etnia amerindia y alta incidencia de FL/PNS no solo podría explicarse desde el punto de vista genético. El componente socioeconómico jugaría un rol importante: bajos niveles socioeconómicos podrían implicar menores cuidados de la madre durante el embarazo (como una dieta deficiente o la exposición a pesticidas), y susceptibilidad de exposición a factores teratogénicos (como consumo materno de tabaco y alcohol gestacional), podrían ser responsables de la alta incidencia de FL/PNS en hospitales públicos. Dentro del mismo análisis, otro de los factores que tiene relación con la alta prevalencia de FL/PNS y el bajo nivel socioeconómico es la edad materna. Palomino y cols. (1997) señalan que esto no se observa de igual manera en centros de atención privados, donde la edad de las madres tiende a ser mayor que lo que se observa en hospitales públicos debido a una mejor planificación familiar (Palomino y cols., 1997). En el presente estudio, el componente étnico no estuvo controlado, y la muestra presenta heterogeneidad respecto al estrato socioeconómico. Para futuros estudios sería de real importancia tener este factor controlado, dado el impacto que podría tener por su aporte en la etnicidad como en factores que se relacionan con el período de periconcepción como lo son la dieta, el consumo de tabaco y alcohol, y la edad materna.

El desarrollo y envejecimiento constituyen factores que modifican la metilación global de ADN. De hecho, las mayores variaciones en los niveles de metilación global de ADN ocurre durante el primer año de vida. La evidencia señala que posteriormente, en la adultez, estos niveles se mantienen estables, y los tejidos que presentan menores variaciones a medida que aumenta la edad son las células presentes en la sangre y en tejido cerebral. En humanos, el momento que permite ver reflejada la metilación global de ADN en sangre periférica de manera idónea es en el nacimiento, pues es el momento más cercano a la periconcepción (Jones y cols., 2015). En este trabajo, a pesar de que las muestras de sangre no fueron tomadas al momento del nacimiento, los controles fueron pareados por edad de manera que este factor estuviera controlado.

Parece ser que el componente genómico/metabólico relacionado con los folatos tendría rol significativo en el desarrollo de FL/PNS, pues ya se han realizado múltiples investigaciones que buscan relacionar el consumo de ácido fólico/folatos periconcepcional y el riesgo de FL/PNS bajo la premisa de que la dieta sería el pilar fundamental de la etiología de las fisuras, y si bien varios de ellos han reportado una asociación estadísticamente significativa, no todos evidencian que la suplementación con ácido fólico tenga un rol protector contra las fisuras orofaciales (Badovinac y cols., 2007). Además, no se han observado cambios significativos en la prevalencia de las fisuras en la población luego de la fortificación de las harinas de panificación con ácido fólico (Blanton y cols., 2011). Es por esto que se han buscado respuestas en el marco del estudio del metabolismo del folato, y en ese contexto se ha observado que la presencia del polimorfismo c.677C>T del gen *MTHFR* en madres confiere un riesgo mayor de presentar FL/PNS que se ve aumentado hasta en 4,6 veces (Singh S y Singh V, 2012).

No obstante, la revisión sistemática publicada por Wang (2016) señaló que no hay relación entre el polimorfismo c.677T>C y menores niveles de metilación global en sujetos con FL/P, lo cual también apoya nuestras observaciones. Sin embargo, más investigación es pertinente, considerando que son múltiples los genes que han sido relacionados con el desarrollo de la FL/PNS, y muchos participan en el metabolismo de los folatos que pudiesen tener impacto en la metilación global del

ADN. Si bien es cierto que *MTHFR* es uno de los genes más importantes y central para la generación de dadores universales de grupos metilo necesarios para la metilación del ADN, alteraciones en otros genes y deficiencias de cofactores (tanto dietarias como metabólicas) que participan en el metabolismo de los folatos podrían explicar la diferencia en los niveles de metilación de ADN entre casos y controles.

Con respecto a los procedimientos que se llevaron a cabo, es importante señalar que el ADN medido globalmente es realizado mediante la cuantificación del porcentaje de 5-mC (Mandaviya y cols., 2014). Este método ha sido utilizado ampliamente en estudios epidemiológicos, utilizando cromatografía física de alta eficacia, cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, o mediante electroforesis capilar de alto rendimiento. Estos métodos son altamente cuantitativos y reproducibles, sin embargo, grandes cantidades de ADN son necesarias para obtener resultados confiables (Woo y Kim, 2012). Es por esto que se realizó la medición de niveles de 5-mC mediante el uso de anticuerpos de captura específicos para 5-mC que fueron posteriormente cuantificados en una plataforma ELISA de escala colorimétrica, el cual es más eficiente respecto a los otros descritos.

En síntesis, los resultados obtenidos permiten una aproximación para dilucidar la relación de la metilación del ADN con el riesgo de presentar FL/PNS y su severidad. Sin embargo, son necesarias investigaciones adicionales que permitan aclarar si la alteración a nivel epigenético se da a nivel gen específico, posiblemente en genes involucrados en las fisuras orofaciales, para así buscar marcadores de riesgo tempranos, que permitan establecer mecanismos de prevención en etapas susceptibles, como es la del período de periconcepción y la gestación. Y además, se requiere considerar otras variables que tendrían relación con las causas de menores niveles de 5-mC, como son el nivel socioeconómico y la
dieta.

CONCLUSIONES

Luego de las pruebas y análisis realizados en esta investigación, se acepta la hipótesis planteada: los individuos que presentan fisura labiopalatina de tipo no sindrómica presentan menores niveles de metilación global de ADN (5-metilcitosina) que los individuos sanos.

Los niveles disminuidos de metilación global de ADN del grupo caso, se observan tanto en mujeres como en varones indistintamente.

Los resultados de nuestro estudio sugieren fuertemente que existe una contribución de la disminución del ADN metilado al aumento del riesgo de desarrollar fisuras labiopalatinas no sindrómicas y que además podría contribuir a la severidad de esta anomalía. Sin embargo, esta relación también podría explicarse por efectos de otras variables que no fueron consideradas en este estudio.

En la muestra de individuos analizada, la presencia del alelo T en el polimorfismo c.677C>T del gen *MTHFR* no explica los menores niveles de metilación, pues no hay diferencias significativas de la frecuencia del alelo entre casos y controles.

A pesar de que los resultados son claros, hay varios factores que no fueron controlados, además del reducido tamaño de la muestra. Es por eso que se necesita replicar nuestros resultados en muestras donde se controlen otras variables, como por ejemplo, los antecedentes dietéticos, el componente amerindio de la muestra, estrato socioeconómico y varios de los genes relacionados con el metabolismo del folato que son plausibles de ser parte de la etiología de las fisuras labiopalatinas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Babić Božović I, Stanković A, Živković M, Vraneković J, Kapović M, Brajenović-Milić B (2015). Altered LINE-1 Methylation in Mothers of Children with Down Syndrome. *PLoS ONE* 10(5): e0127423.

Badovinac RL, Werler M, Williams P, Kelsey KT y Hayes C (2007). Folic Acid-Containing Supplement Consumption during Pregnancy and Risk for Oral Clefts: A Meta-Analysis. *Birth Defects Res (Part A)* 79:8–15

Bhaskar L, Murthy J y Babu GV (2011). Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and orofacial clefts. *Arch Oral Biol* 56:723-737.

Bianchi F, Calzolari E, Ciulli L, Cordier S, Gualandi F, Pierini A, et al. (2000). Environment and genetics in the etiology of cleft lip and palate with reference to role of folic acid. *Epidemiol Prev* 24(1):21-27.

Blanton SH, Henry RR, Yuan Q, Mulliken JB, Stal S, Finell RH, et al. (2011). Folate Pathway and Nonsyndromic Cleft Lip and Palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 91:50-60.

Brauer PR y Tierney BJ (2004). Consequences of elevated homocysteine during embryonic development and possible modes of action. *Curr Pharm Des* 10:2719–2732.

Carrasco L, Merino A y Faraggi M (2011). Rinoseptoplastía en pacientes fisurados. *Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello* 71:171-178.

Chomczynski P y Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156-159.

Chowdhury S, Cleves M, MacLeod S, James SJ, Zhao W y Charlotte A (2011). Maternal DNA Hypomethylation and Congenital Heart Defects. *Birth Defects Res (Part A)* 91:69–76

- Corbo MT y Marimón ME (2001). Labio y paladar fisurados. Aspectos generales que se deben conocer en la atención primaria de salud. *Rev Cubana Med Gen Integr* 17(4):379-85
- Del Prete S, D'urso A, Tolevski Meshkova D y Coppotelli E (2014). Cleft lip and palate: a review of the literature. *Orthodontics* 5(12): WMC004783
- Duncan T, Reed M y Nijhout HF (2013). A Population Model of Folate-Mediated One-Carbon Metabolism. *Nutrients* 5: 2457-2474
- Eyheramendy S, Martinez F, Manevy F, Vial C y Repetto G (2015). Genetic structure characterization of Chileans reflects historical immigration patterns. *Nat Commun* 6:6472
- Godoy E, Godoy A, Godoy F, Monasterio L y Suazo G (2010). Manejo del paciente con fisura labio-palatina en Arica: Experiencia de 15 años. *Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello* 70:133-138.
- Hernandez R, Werler M, Romitti P, Sun L y Anderka M (2012). Nonsteroidal antiinflammatory drug use among women and the risk of birth defects. *Am J Obstet Gynecol* 206(228):1-8
- Hertrampf E y Cortés F (2004). Folic Acid Fortification of Wheat Flour: Chile. *Nutr rev* 62(6):S44-S48.
- Hu N, Strobl-Mazzulla PH y Bronner ME (2014). Epigenetic regulation in neural crest development. *Dev Biol* 396:159-168.
- Iacobazzi V, Infantino V, Castegna A y Andria G (2014). Hyperhomocysteinemia: Related genetic diseases and congenital defects, abnormal DNA methylation and newborn screening issues. *Mol Genet Metab* 113:27-33.
- Ikeda S, Koyama H, Sugimoto M y Kume S (2012). Roles of One-Carbon metabolism in preimplantation period- Effects on short-term development and long-term programming. *J Reprod Dev* 58(1):38-43.

International statistical classification of diseases and related health problems (ICD) 10° revision, edición 2010. Publicado por la Organización Mundial de la Salud, disponible en www.who.int, consultado en Noviembre 2016

Jones MJ, Goodman SJ y Kobor MS (2015). Review: DNA methylation and healthy human aging. *Aging cell* :1-9.

Jones P y Takai D (2001). The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. *Epigenetics* 293(10):1068-1070.

Juriloff DM, Harris M, Mager DL y Gagnier L (2014). Epigenetic Mechanism Causes Wnt9b Deficiency and Nonsyndromic Cleft Lip and Palate in the A/WySn Mouse Strain. *Birth Defects Res (Part A)* 100:772–788

Kelly D, O'Dowd T y Reulbach U (2012). Use of folic acid supplements and risk of cleft lip and palate in infants: a population-based cohort study. *Br J Gen Pract* :e466-e472

Khandelwal K, Bokhoven HV, Roscioli T, Carels CEL y Zhou H (2013). Genomic Approaches for Studying Craniofacial Disorders. *Am J Med Genet (Part C Seminars in Medical Genetics)* 163C:218–231

Kumari P, Ali A, Sukla KK, Singh SK y Raman R (2013). Lower incidence of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in females: Is Homocysteine a factor? *J Biosci* (38):21-26.

Lucock M (2000). Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes. *Mol Genet Metab* 71:121-138.

Mandaviya PR, Stolk L y Heil SG (2014). Homocysteine and DNA methylation: A review of animal and human literature. *Mol Genet Metab* 113:243-252.

Manterola C y Otzen T (2014). Estudios observacionales: los diseños utilizados con mayor frecuencia en investigación clínica. *Int J. Morphol* 32(2):634-645.

Melnyk S, Pogribna M, Pogribny I, Yi P y James S (2001). Measurement of plasma and intracellular S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine utilizing

coulometric electrochemical detection: Alterations with plasma homocysteine and pyridoxal 5'-phosphate concentrations. *Clin Chem* 46(2):265-272.

Ministerio de Salud (2009). *Guía Clínica: FISURA LABIOPALATINA*, Santiago de Chile.

Montenegro MA y Rojas M (2005). Aspectos moleculares en la formación de la cara y del paladar. *Int. J. Morphol* 23(2):185-194

Mostowska A, Hozyasz K, Wojcicka K, Lianeri M y Jagodzinski P (2011). Polymorphisms of Stress-Related Genes and the Risk of Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate. *Birth Defects Res (Part A)* 91:948-955.

Nazer J, Hubner M, Catalán J y Cifuentes L (2001). Incidencia de labio leporino y paladar hendido en la Maternidad del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y en las maternidades chilenas participantes en el Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas (ECLAMC) período 1991-1999. *Rev med Chile* 129(3):285-293

Nazer J, Ramirez M y Cifuentes L (2010). 38 Años de vigilancia epidemiológica de labio leporino y paladar hendido en la maternidad del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. *Rev Med Chil* 138:567-572.

Nazer J, Cifuentes L (2014). Prevalence of congenital malformations at birth in Chilean maternity hospitals. *Rev Med Chil* 142:1150–1156.

Palomino HM, Palomino H, Cauvi D, Barton S y Chakraborty AR (1997). Facial Clefting and Amerindian Admixture in Populations of Santiago, Chile. *Am J Hum Biol* 9:225–232

Palomino H, Guzman E y Blanco R (2000). Recurrencia familiar de labio leporino con o sin fisura velopalatina de origen no sindrómico en poblaciones de Chile. *Rev med Chil* 128:286-293.

Rincón RJ, Suazo J y Blanco R (2012). Molecular analysis of Sonic hedgehog (Shh) in the etiology of nonsyndromic cleft lip and palate in Chilean case-parent trios. *Rev Fac Odontol Univ Antioq* 24(1):110-120.

Rochtus A, Izzi B, Vangeel E, Louwette S, Wittevrongel C, Lambrechts D y cols. (2015). DNA methylation analysis of Homeobox genes implicates HOXB7 hypomethylation as risk factor for neural tube defects. *Epigenetics* 10(1):92-101.

Ruda J, Krakovitz P y Rose A (2012). A review of the evaluation and management of velopharyngeal insufficiency in children. *Otolaryngol Clin North Am* 45:653-669.

Sabbagh HJ, Hassan MHA, Innes NPT, Elkodary HM, Little J y Mossey PA (2015). Passive Smoking in the Etiology of Non-Syndromic Orofacial Clefts: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 10(3): e0116963.

Sadler T (2012). *Langman Embriología Médica. 12ª ed.* Barcelona: Wolters Kluwer. 275p.

Salpea P, Russanova VR, Hirai TH, Sourlingas TG, Sekeri-Pataryas KE, Romero R y cols. (2012). Postnatal development- and age-related changes in DNA-methylation patterns in the human genome. *Nucleic Acids Res* 40(14):6477–6494.

Seelan RS, Mukhopadhyay P, Pisano MM y Greene RM (2012). Developmental Epigenetics of the Murine Secondary Palate. *IJAR J* 53(3-4):240-252

Setó-Salvia N y Stanier P (2014). European Genetics of cleft lip and/or cleft palate: Association with other common anomalies. *J Med Genet* 57:381-393

Singh S y Singh V (2012). A comprehensive review of the genetic basis of cleft lip and palate. *J Oral Maxillofac Pathol* 16(1):64-72

Stolk L, Bouwland-Both MI, Van Mill NH, Verbiest MMPJ, Eilers PHC, Zhu H y cols. (2013). Epigenetic Profiles in Children with a Neural Tube Defect; A Case-Control Study in Two Populations. *PloS One* 8(11):e78462.

Tolarova M (2016). Global issues related to cleft lip and palate: prevention and treatment need to team together. *Indian J Dent Res (serial online)* 27:455-456.

Valenzuela CY (2011). Human Sociogenetics. *Biol Res* 44:393-404

Van der Put NM, SteegersTheunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, Van den Heuvel LP y cols. (1995). Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 346:1070–1

Van Mill NH, Bouwland-Both MI, Stolk L, Verbiest MMPJ, Hofman A, Jaddoe VVW y cols. (2014). Determinants of maternal pregnancy one-carbon metabolism and newborn human DNA methylation profile. *Reproduction* 148:581–592.

Wahl SE, Kennedy AE, Wyatt BH, Moore AD, Pridgen DE, Cherry AM y cols. (2015). The role of folate metabolism in orofacial development and clefting. *Dev Biol* 405(1):108–122.

Wang L, Shanguan S, Chang S, Yu X, Wang Z, Lu X, et al. (2016). Determining the Association between *Methylenetetrahydrofolate Reductase* (MTHFR) Gene Polymorphisms and Genomic DNA Methylation Level: A Meta-Analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 106(8):667-674.

Watkins SE, Meyer RE, Strauss RP y Aylsworth AS (2014). Classification, Epidemiology, and Genetics of Orofacial Cleft. *Clin Plast Surg* 41(2):149-163.

Woo HD y Kim J (2012). Global DNA Hypomethylation in Peripheral Blood Leukocytes as a Biomarker for Cancer Risk: A Meta-Analysis. *PloS One* 7(4):e34615.

ANEXO 1



Comité Institucional de Bioseguridad
Administración Conjunta Campus Norte
FDO N°65

Santiago, 16 de Noviembre de 2015.

C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación FIOUCH ENLACE - DIFO 2015, titulado "Metabolismo del Folato y Metilación del DNA: Su Posible rol en la Etiología de la Fibrosis Labiopalatina No Síndrómica en Chile". El Investigador Responsable de este proyecto es el Dr. José Suazo Sangueza, Académico del Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas.

Los ensayos propuestos a realizar con los sujetos se realizarán en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Odontología, cuyo Investigador y personal técnico que colaborará se encuentran debidamente entrenados en estas áreas.

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

Se extiende el presente certificado a solicitud del Dr. Suazo para ser presentado a la Dirección de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Dr. Mario Chiong
Secretario

Dra. Carla Lozano M.
Presidenta

ANEXO 2



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS



ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO

FECHA: 12 de enero de 2016.

PROYECTO: “METABOLISMO DEL FOLATO Y METILACIÓN DEL DNA: SU POSIBLE ROL EN LA ETIOLOGÍA DE LA FISURA LABIOPALATINA NO SINDRÓMICA EN CHILE”.

INVESTIGADOR RESPONSABLE: DR. JOSÉ SUAZO SANHUEZA.

INSTITUCIÓN: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN FIOUCH ENLACE – DIFO 2015, INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS. FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNIVERSIDAD DE CHILE.

Con fecha 12 de enero de 2016, el proyecto ha sido analizado a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de la Guía Internacional de Ética para la Investigación Biomédica que involucra sujetos humanos CIOMS 1992, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de la información proporcionada en el texto del proyecto el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores o mínimos.

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión modificada de fecha 12 de enero de 2016.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS



12 ENE. 2016

**INTEGRANTES DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN
EN SERES HUMANOS**

NOMBRE	CARGO	RELACION CON LA INSTITUCION
Dr. Manuel Oyarzún	Presidente	Sí
Dr. Hugo Amigo	Miembro	Sí
Dra. Lucía Cifuentes	Miembro	Sí
Prof. Ma. Julieta González	Miembro	Sí
Sra. Claudia Marshall	Miembro	No
Dr. Miguel O' Ryan	Miembro Suplente	Sí

Santiago, 12 de enero de 2016.


Prof. Gina Raineri B.
 Secretaria Ejecutiva CEISH

GRB/lom.
 C.C.: - jsuazo@odontologia.uchile.cl
 - Proyecto N° 210-2015
 - Archivo ACTA AP-177

ANEXO 3



Versión 3 12/01/2016



**Consentimiento Informado Para Participación en Proyecto de Investigación
Dirigido a Adultos Sanos (Controles)**

Título del Protocolo: METABOLISMO DEL FOLATO Y METILACIÓN DEL DNA:
SU POSIBLE ROL EN LA ETIOLOGÍA DE LA FISURA
LABIOPALATINA NO SINDRÓMICA EN CHILE

PATROCINANTE: Concurso FIOUCH-Enlace, Facultad de Odontología,
Universidad de Chile

Nombre del Investigador principal: Dr. José Suazo Sanhueza

R.U.T.: 13.033.606-K

Institución: Instituto de Investigación en Ciencias Odontológica,
Facultad de Odontología, Universidad de Chile – Sergio
Livingstone 943 – Independencia, Santiago.

Teléfonos: 29781758

Nombre del Participante:

.....

Este documento de Consentimiento Informado se aplicará a casos de fisura labiopalatina no
sindrómica, sus padres o tutores, y consta de dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted).
 - Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar).
- Ud. recibirá una copia completa del Documento de Consentimiento Informado.

Mi nombre es José Suazo Sanhueza y soy académico de la Facultad de Odontología de la
Universidad de Chile. Estoy realizando una investigación cuyo objetivo es conocer las causas
genéticas de este problema de nacimiento conocido como fisura labiopalatina (o labio leporino), en
otras palabras, averiguar cuál es el origen hereditario de esta enfermedad.

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

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

Versión 3 12/01/2016



12 ENE. 2016

Justificación de la Investigación

En Chile nacen muchos niños y niñas con labio leporino o fisura labiopalatina. El problema es que aun no sabemos totalmente porque aparece. Lo que sabemos es que muchas veces se observa en familias, por lo que lo creemos que es una malformación hereditaria. Por eso este estudio buscara uno de los factores hereditarios o genes que pueden participar en este problema de nacimiento.

Objetivo de la Investigación

Esta investigación tiene por objetivo conocer las causas genéticas de este problema de nacimiento conocido como fisura labiopalatina (o labio leporino), en otras palabras, averiguar cuál es el origen hereditario de esta enfermedad. Específicamente buscaremos, por una parte factores genéticos (o genes) que participan en el aprovechamiento de un nutriente conocido como ácido fólico, que es muy importante para que se forme correctamente el labio superior y el paladar. Además, queremos confirmar si los pacientes con fisura labiopalatina tienen un porcentaje menor de una modificación de su material genético (o ADN) si lo comparamos con personas no afectadas. Para ello necesitamos una muestra de su ADN. Este estudio incluirá a un grupo de al menos 100 familias con hijos personas afectadas. Dado que siempre en este tipo de estudios necesitamos un grupo de personas sanas como punto de comparación, es que lo estamos invitando a participar, que en este caso serán entre 10 y 15 personas.

Beneficio de la Investigación.

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

Tipo de Intervención y Procedimiento.

Si Ud. acepta participar en este estudio se les realizará una encuesta para recopilar información básica de contacto (nombre, domicilio, teléfono de contacto) y sobre su familia (como si hay casos de este problema o similares) y se les solicitará, sólo por una vez, una pequeña muestra de sangre que se tomará desde el brazo. El total de la muestra que se le extraerá será de aproximadamente 10 ml (lo que equivale a algo así como una cuchara sopera). De esta muestra se extraerá el material genético que será analizado en nuestro laboratorio.

Las muestras obtenidas y la información de su material genético serán usadas única y exclusivamente para el propósito de esta investigación y no se harán otros estudios genéticos. Las muestras serán almacenadas por un máximo de 15 años, en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, bajo la responsabilidad del Dr. José Suazo.

Si en el futuro son usadas para propósitos diferentes a los de esta investigación médica, se le contactará para solicitar que nos autorice a usarla firmando un nuevo consentimiento.

Riesgo de la Investigación.

La toma de una muestra de sangre tiene riesgos mínimos para su salud, tales como dolor en el sitio de punción, hematomas (moretones) y rara vez infección en el sitio de punción. Para evitar este tipo de molestia la persona que extraerá la muestra tiene experiencia en el procedimiento. Por ello los riesgos para usted son mínimos.

Criterios para selección de los participantes en el estudio

Los criterios de inclusión serán: ser chileno, mayor de 18 años, sin fisura labiopalatina (fisura de labio con o sin fisura de paladar).

Los criterios de exclusión serán: chilenos o extranjeros con historia familiar de labio leporino u otras malformaciones congénitas importantes.

Versión 3 12/01/2016



12 ENE. 2016

Confidencialidad y difusión de datos.

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

Aclaraciones

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

Otros Derechos del participante

En caso de duda sobre sus derechos debe comunicarse con el Presidente del "Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos", Dr. Manuel Oyarzún G., Teléfono: 2-978.9536, Email: comiteceish@med.uchile.cl, cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia.

Versión 3 12/01/2016



12 ENE. 2016

Carta de Consentimiento Informado (Mayores de 18 años)

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

1. He leído y comprendido la información anteriormente entregada y que mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
2. He sido informado(a) y comprendo la necesidad y fines de ser atendido.
3. Tengo conocimiento del procedimiento a realizar.
4. Conozco los beneficios de participar en la Investigación
5. El procedimiento no tiene riesgo alguno para mi salud.
6. Además de esta información que he recibido, seré informado(a) en cada momento y al requerimiento de la evolución de mi proceso, de manera verbal y/o escrita si fuera necesaria y al criterio del investigador.
7. Autorizo a usar mi caso para investigación y para ser usado como material audiovisual en clases, protegiendo mi identidad
8. En caso de cualquier duda puede comunicarse con el Dr. José Suazo Sanhueza a los números 29781758 o 56679342 o dirigirse a el Presidente del "Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos", Dr. Manuel Oyarzún G., Teléfono: 2-978.9536, Email: comiteceish@med.uchile.cl, cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia.

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

Nombre del Paciente, Padre Tutor: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Sección a llenar por el Investigador Principal

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

Nombre del Investigador Principal: _____

Firma: _____

Fecha: _____

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

Firma: _____

Fecha: _____