



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS  
ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**“Estudio de asociación entre el polimorfismo c.677C>T del gen de la enzima  
5,10-metilentetrahidrofolato reductasa y la fisura labiopalatina no sindrómica  
en Chile”**

**Cristian Adolfo Ramírez Chau**

**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 EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS  
ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**“Estudio de asociación entre el polimorfismo c.677C>T del gen de la enzima  
5,10-metilentetrahidrofolato reductasa y la fisura labiopalatina no sindrómica  
en Chile”**

**Cristian Adolfo Ramírez Chau**

**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**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mi tutor Prof. Dr. José Suazo Sanhueza por su paciencia, buena voluntad y dedicación durante todo el tiempo en que se ha llevado a cabo la investigación.

A todos los docentes, funcionarios y compañeros que me guiaron, ayudaron o dieron algún consejo durante todos los años que he estado en la facultad.

A mi familia y amigos, especialmente a mis dos hermanos, Jorge y Javier que siempre han estado ahí cuando he necesitado. A mi madre que, a pesar de no poder acompañarme en estos momentos, sé que todo en parte, es gracias a ella.

Finalmente, a mi polola, Catalina Galleguillos por su amor y apoyo incondicional durante los últimos 5 años.

.

## ÍNDICE

-Introducción.....	1
-Marco Teórico.....	3
Fisuras Orofaciales.....	3
Embriología de labio superior y paladar.....	4
Epidemiología.....	7
Etiología.....	8
Diseños de estudios para mapeo de genes candidatos en la FL/PNS.....	9
Propuesta de estudio de asociación: rol del gen de la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa ( <i>MTHFR</i> ) en la expresión de la FL/PNS en la población chilena.....	9
-Hipótesis y Objetivos.....	14
-Materiales y Métodos.....	15
Grupo de estudio.....	15
Procesamiento y análisis.....	16
-Resultados.....	17
-Discusión.....	20
-Conclusiones.....	24
-Referencias Bibliográficas.....	25
-Anexos.....	31

## RESUMEN

Introducción: La fisura labiopalatina no sindrómica (FL/PNS) es una malformación congénita de alta prevalencia a nivel mundial. Su etiología es multifactorial, en ella intervienen factores ambientales y hereditarios. Es considerada una patología de herencia compleja en la que participarían varios genes interactuantes. En ese escenario, cualquiera de los genes que codifican para las proteínas participantes en el desarrollo del labio superior y paladar, podría constituir un gen candidato para la FL/PNS. Los folatos son moléculas fundamentales para el desarrollo de estructuras cráneo-faciales. En relación a ellos, un gen atractivo de estudiar es el que codifica para la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) que cataliza la reacción de conversión de 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, la cuál es la forma primaria circulante de los folatos. Un polimorfismo común de un solo nucleótido (SNP) de este gen es el c.677C>T que produce alteraciones en el metabolismo del folato y ha sido asociado con el riesgo de FL/PNS. En esta tesis se propuso, por primera vez en Chile, evaluar si existe asociación entre el polimorfismo c.677C>T de *MTHFR* y la expresión de FL/PNS.

Materiales y Métodos: Se utilizaron muestras de 165 casos de FL/PNS y 291 controles. Además de 121 tríos-casos progenitores (que comparten la muestra de casos). La variante c.677C>T de *MTHFR* fue genotipificada en una plataforma de PCR en tiempo real. En la muestra de casos y controles se estimó el Odds Ratio (OR) para comparar las frecuencias alélicas y genotípicas. En la muestra de tríos-casos progenitores, se aplicó el test de desequilibrio de transmisión (TDT) para evaluar el patrón diferencial de transmisión de los alelos de progenitores a la progenie. Dado que las muestras de ambas etapas no son independientes, se obtuvo un OR combinado junto a una prueba de homogeneidad.

Resultados: Se observó un OR no significativo (1,28; IC 95%: 0,97-1,70,  $p=0,067$ ) para el alelo de riesgo T en la muestra de casos y controles. En los tríos se encontró una transmisión preferencial del alelo de riesgo T (OR 1,69; IC 95%:1,18-2,44,

$p=0,0041$ ). El análisis combinado arrojó un resultado significativo (OR:1,41; IC 95%:1,14-1,75;  $p=0,0015$ ) y la prueba de homogeneidad un resultado no significativo (0,2314).

Conclusiones: Mediante la determinación del OR combinado, y a pesar de que se detectaron resultados espurios de asociación en el estudio de casos y controles, se puede concluir que la presencia del alelo T es un factor de riesgo en la ocurrencia de FL/PNS en Chile.

## INTRODUCCIÓN

La fisura labiopalatina no sindrómica (FL/PNS) es una de las malformaciones congénitas más frecuentes en el mundo (Bender, 2000). En general, las fisuras orofaciales tienen un gran impacto en salud pública por los costos de rehabilitación a corto y largo plazo, así como también por los costos emocionales y psicológicos para los pacientes y sus familias (Pan y cols, 2010a). Los pacientes afectados presentan dificultades en su alimentación, problemas de inserción social, del habla y la audición, los que pueden ser corregidos con cirugías, tratamientos dentales, fonoaudiológicos e intervenciones psicosociales (Pan y cols, 2010b). Estos tratamientos se inician en los primeros meses de vida y dependiendo de la severidad clínica de la lesión, pueden prolongarse hasta más allá de los dieciocho años de edad (Bender, 2000).

A pesar de los buenos resultados que se pueden obtener cuando se logra tratar oportunamente, se ha visto que los individuos con FL/PNS presentan retraso cognitivo y psicosocial durante la infancia (Frebourg y cols, 2006). Además, menor esperanza de vida por tener mayor riesgo de presentar distintos tipos de cáncer y desórdenes psiquiátricos durante la vida adulta (Christensen y cols, 2004). Por ello, estudiar la etiología genética de la FL/PNS puede contribuir a mejorar el asesoramiento genético enfocado en la prevención y pronóstico, especialmente en los casos donde se observe agregación familiar (Frebourg y cols, 2006).

Es ampliamente aceptado que los folatos son componentes clave en el desarrollo de estructuras cráneo-faciales (Hernández, 2000). Se ha reportado que madres que usan suplementos que lo contienen, disminuirían la incidencia de FL/PNS en la descendencia (Schutte y Murray, 1999; Hernández, 2000). Sin embargo, existen estudios que han obtenido resultados variables o contradictorios (Frosst, 1995; Van der Put, 1998; Johnson y Little, 2008). Por lo anterior, variaciones individuales en genes implicados en el metabolismo del folato, podrían afectar la susceptibilidad individual a presentar FL/PNS (Zhao, 2014). En este contexto, 5,10-Metilenedrahidrofolato reductasa (MTFHR) es una enzima clave en el metabolismo

del folato, al estar involucrado en la metilación de moléculas que participan en múltiples funciones biológicas y la regulación de la expresión génica durante la migración y diferenciación celular, en especial en el desarrollo embrionario temprano (Ly y cols, 2012). Por lo que es particularmente atractiva de estudiar al presentar polimorfismos funcionales como el c.677C>T (p.Ala222Val) que da como resultado una enzima termolábil con disminución de su actividad enzimática (Pereira y cols, 2004).

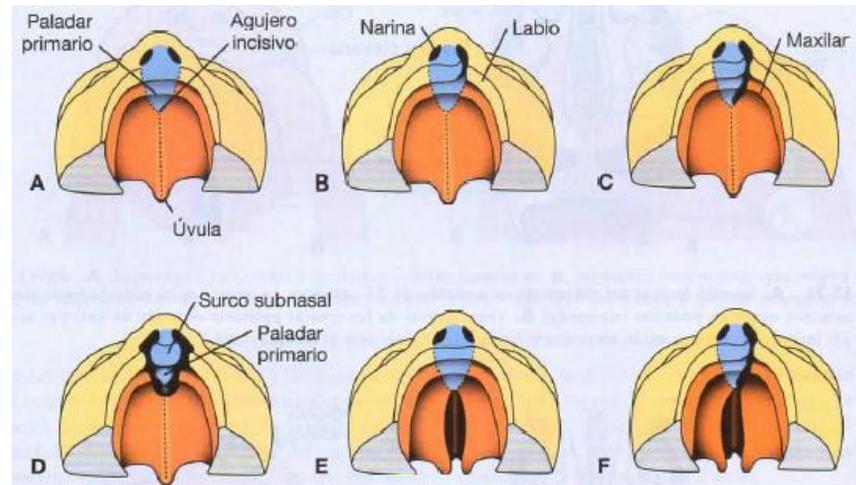
En la presente tesis se propuso estudiar si existe asociación entre el polimorfismo c.677C>T del gen *MTHFR* y la expresión de la fisura labiopalatina no sindrómica en Chile. Para este propósito se realizó genotipificación por PCR en tiempo real y con los resultados obtenidos se evaluó asociación mediante dos diseños complementarios de estudio: casos y controles y tríos caso-progenitores.

## MARCO TEÓRICO

### Fisuras Orofaciales

Las fisuras orofaciales se clasifican en dos grupos, la fisura labiopalatina (fisura de labio con o sin fisura de paladar o FL/P) y fisura palatina sola (FP). Para cada una de ellas encontramos manifestaciones asociadas a síndromes o formas aisladas con otras anomalías que no comprenden parte de algún síndrome clínico (fisuras no sindrómicas) (Cobourne, 2004). Se estima que las fisuras no sindrómicas corresponden aproximadamente al 70% de las fisuras orofaciales. Por otro lado, en las formas sindrómicas se reconocen más de 300 síndromes en que está presente una fisura orofacial (Gorlin y cols, 1990).

La fisura labiopalatina no sindrómica (FL/PNS) es una malformación congénita con una amplia variación en su expresión clínica (**Figura 1**), que va de pequeñas muescas en el labio superior hasta fisuras que comprometen el labio superior, reborde alveolar, paladar duro y blando (Schutte y Murray, 1999). FL/PNS es, por tanto, una malformación orofacial sin ninguna otra anomalía estructural o del desarrollo (Lidral y cols, 2008) y que se considera una entidad diferente de las fisuras palatinas tanto en su origen embriológico como en sus factores de riesgo (Jugessur y cols, 2009).



**Figura 1:** Vista ventral de paladar, labio y nariz, con distintas expresiones de FL/NPS. A: normal, B: fisura unilateral de labio y paladar primario, C: fisura unilateral labial y palatina que se extiende hasta el agujero incisivo, D: fisura bilateral de labio y paladar primario, E: fisura palatina sola, F: fisura de labio y paladar completa. (Extraído de Langman, 2009).

### Embriología del labio superior y paladar

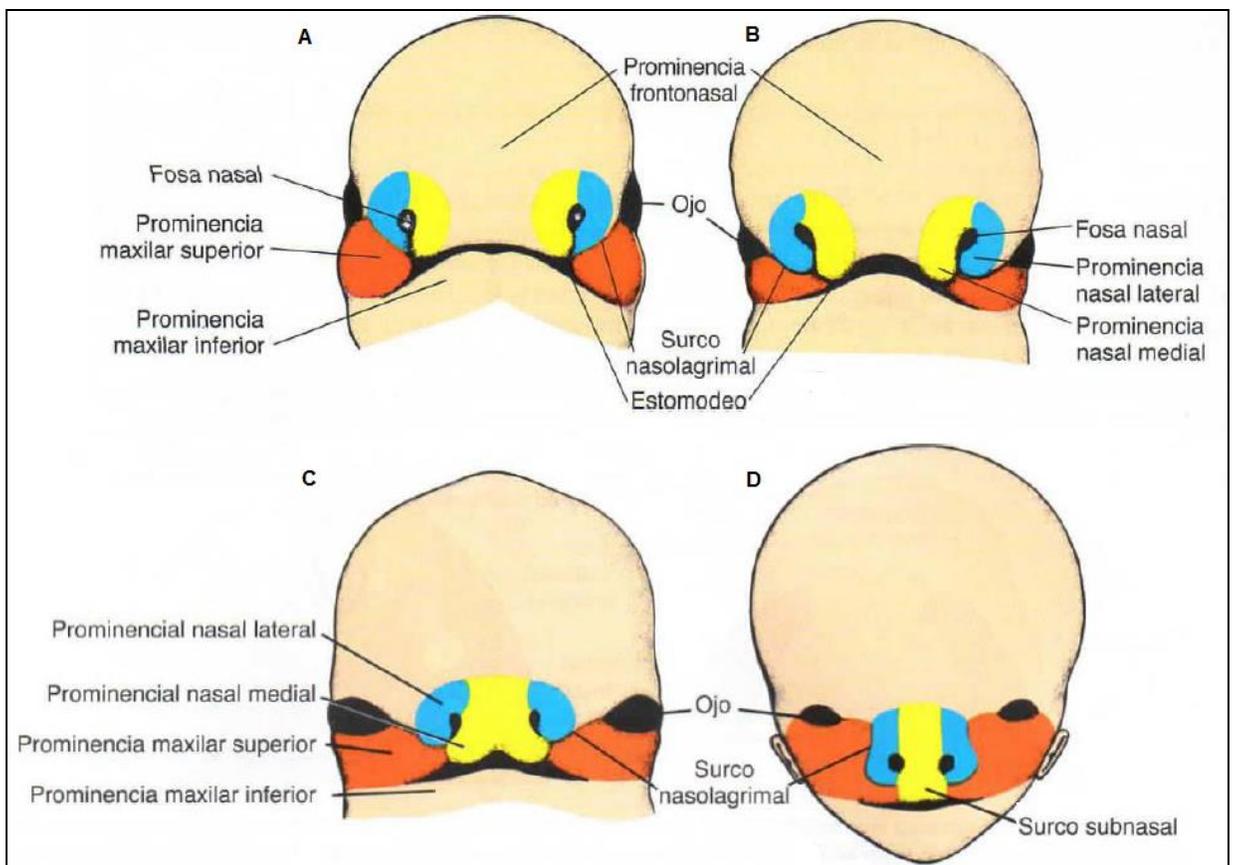
El desarrollo del labio superior y paladar comprende una serie de eventos complejos que requieren una estrecha coordinación genética, que involucra migración celular, crecimiento, diferenciación y apoptosis (Mossey y cols, 2009).

En humanos, estos eventos comienzan durante la tercera semana de gestación, en donde las células de la cresta neural migran hacia el primer arco faríngeo, para originar los cinco procesos o prominencias faciales (uno frontonasal, dos maxilares y dos mandibulares) (**Figura 2**). De la prominencia frontonasal se originará la frente y la nariz, de las prominencias maxilares se formará el estomodeo lateral (boca primitiva) y de las prominencias mandibulares se formará la mandíbula, el labio inferior y la parte inferior de la mejilla (Bender, 2000).

Entre la sexta y séptima semana, la proliferación de las prominencias maxilares resultará en la fusión de las prominencias nasales mediales con las laterales (ambas provenientes de la prominencia frontonasal) para formar la nariz lateral y mejillas.

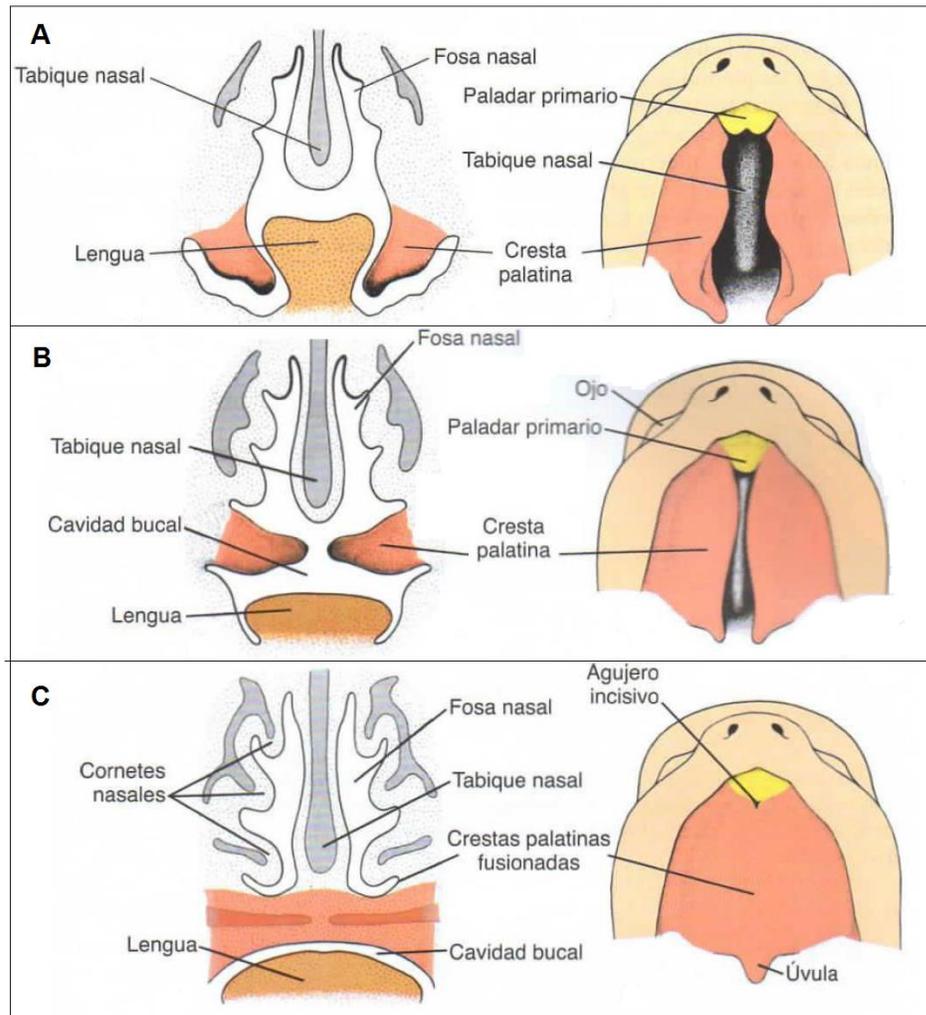
El labio superior se forma durante éste período por el movimiento lateral de las prominencias maxilares que luego se fusionan con las prominencias nasales mediales (Bender, 2000) (**Figura 2 C y D**).

El desarrollo del paladar primario (desde reborde alveolar hasta foramen incisivo) se inicia durante la quinta semana de gestación, derivado de la fusión de las estructuras que conforman el labio superior. Su formación comienza con el crecimiento del segmento intermaxilar del maxilar, tejido derivado de las prominencias maxilares que ya se han fusionado con las prominencias nasales mediales. Los segmentos nasales mediales contribuyen a la formación del filtrum del labio superior y el componente óseo del paladar primario que incluye a los cuatro dientes incisivos maxilares (premaxila) (Gorlin y cols, 1990).



**Figura 2:** Formación de la cara. A: Embrión de 5 semanas, B: Embrión de 6 semanas, C: Embrión de 7 semanas, D: Embrión de 10 semanas. (Extraído de Langman, 2009).

El paladar secundario incluye el tejido que se extiende desde el foramen incisivo hacia la parte posterior del paladar. Su formación se inicia durante la sexta semana, una vez constituido el paladar primario, con el desarrollo de las láminas palatinas (**Figura 3A**). Estas láminas emergen desde la cara interna de las prominencias maxilares, las que inicialmente crecen en forma vertical. Durante la séptima y octava semana, las láminas palatinas se elongan y horizontalizan (**Figura 3B**). Cuando estas placas crecen horizontalmente hasta una determinada posición y hacen contacto, procesos de transición epitelio-mesenquimática y apoptosis en los bordes mediales de cada lado, producen su fusión en la línea media. La fusión del paladar duro se completa durante la décima semana (**figura 3C**). La formación del paladar blando y la úvula culminan en la duodécima semana con la exitosa fusión de centros de crecimiento secundario (Bender, 2000).



**Figura 3:** Desarrollo embrionario de paladar secundario. A: 6 semanas y media, B: 7 semanas y media, C: 10 semanas (Extraído de Langman, 2009).

Teniendo en cuenta estos antecedentes embriológicos, una fisura de labio y/o de paladar primario es el resultado de fallas en la fusión de los procesos nasales laterales y mediales, en la prominencia frontonasal y/o en las prominencias maxilares. Por su parte, fallas en la elevación, contacto, adhesión y fusión de las láminas palatinas resulta en fisuras de paladar (Marazita y Money, 2004). Por lo que, cualquier perturbación de origen genético o ambiental en esas etapas puede llevar a una falla en el mecanismo de cierre en la línea media generando fisuras orofaciales (Rahimov y cols, 2008).

## **Epidemiología**

La FL/PNS se observa a nivel mundial aproximadamente en 1 de cada 700 recién nacidos vivos, con variaciones dependiendo del origen étnico de los padres, origen geográfico, sexo y nivel socioeconómico (Bender, 2000). Por lo anterior, la distribución de la FL/PNS no es homogénea, observando los valores más altos en Asia y América Latina (1/500). Por otro lado, en África (1/2500) y en Europa (1/1000) se han registrado las tasas de prevalencia más bajas (Mossey, 2012).

En Chile la población urbana contemporánea, proviene principalmente de la mezcla entre amerindios (de origen asiático) y españoles (de origen caucásico) (Rothhammer y cols, 1968). En Santiago se pueden observar las cifras más altas de prevalencia de FL/PNS en los estratos socioeconómicos bajos (1,8 por 1000 nacidos vivos), que presentan la mayor proporción de genes amerindios, mientras que, en los estratos socioeconómicos altos las tasas de esta malformación son las más bajas (0,8 por 1000 nacidos vivos), estratos que presentan el menor grado de mezcla amerindia, lo que genera estratificación poblacional por origen étnico (Palomino y cols, 1997).

## **Etiología**

La etiología de la FL/PNS es considerada multifactorial, causada por factores ambientales y hereditarios (Schutte y Murray, 1999).

En el embarazo, las primeras semanas son consideradas el periodo más sensible en la etiología de esta malformación. En etapas tempranas, la interacción con sustancias teratógenas pueden llevar a alteraciones en la embriogénesis. Se han asociado, en mayor o menor medida, a un incremento del riesgo de FL/PNS el consumo de tabaco, alcohol, bajo consumo de ácido fólico, bajos niveles sanguíneos de zinc, obesidad, eventos estresantes y fiebre durante el embarazo (Molina, 2013).

Tanto las evidencias experimentales en modelos animales como los análisis genéticos en humanos, permiten concluir que la FL/PNS constituye una patología de herencia compleja, postulándose que en su etiología genética participarían varios genes interactuantes (Jugessur y Murray, 2005). Sin embargo, aún no se ha logrado determinar con certeza cuántos y cuáles son estos genes candidatos y cuál es su peso relativo en la expresión de esta malformación. Es por esta razón que, al observar las historias genealógicas, el fenotipo FL/PNS no se transmite de acuerdo con alguno de los patrones convencionales de herencia mendeliana (Murray, 2002).

Para explicar la forma en que se hereda este rasgo se ha propuesto un modelo de herencia en el que participarían varios genes mayores interactuantes, el que se conoce como modelo oligogénico de herencia y que es el que actualmente presenta mayor aceptación (Farral y Holder, 1992; Mitchell y Risch, 1992). Como ya ha sido mencionado, el desarrollo del labio superior y paladar ocurre como resultado de complejos procesos de interacción, migración, diferenciación y muerte celular, los que son controlados por numerosas proteínas estructurales y regulatorias. En este escenario, cualquiera de los genes que codifican para las proteínas participantes en dichos procesos, podría constituir un gen candidato para FL/PNS (Gaspar y cols, 2002).

## **Diseños de estudios para mapeo de genes candidatos en la FL/PNS.**

Un enfoque comúnmente utilizado para el mapeo (o detección) de genes candidatos en rasgos complejos, son los estudios de asociación de base poblacional como el diseño de casos y controles, en el que se buscan diferencias en las frecuencias de alelos de variantes genéticas polimórficas entre individuos afectados (casos no relacionados) y no afectados (controles no relacionados). Si bien este diseño es ampliamente utilizado por la factibilidad de reclutar individuos, presenta la desventaja de generar resultados de asociación, tanto falsos positivos como falsos negativos (asociaciones espurias), cuando los casos no están pareados correctamente con los controles, ya sea por tener distinta composición genética o la población presenta estratificación por etnicidad (Santos y cols, 2002). Por lo tanto, evidencias de asociación entre una variante genética y una enfermedad en estudios caso-control deben ser confirmados por métodos alternativos (Kazeem y Farrall, 2005).

En este contexto, algunos autores han propuesto realizar estudios de asociación complementarios a los de casos y controles, usando diseños en base familiar, como el de tríos-caso progenitores, para proveer protección contra asociaciones espurias causadas por la estratificación poblacional (Spielman y cols, 1993; Santos y cols, 2002). En este tipo de estudios se evalúa la presencia de una transmisión preferencial de un alelo de una variante genética desde progenitores a progenie afectada. Con los alelos no transmitidos de progenitores a progenie, se conforma un grupo control (“pseudo-control”) pareado perfectamente con los casos por origen étnico, evitando con ello los problemas de estratificación poblacional (Santos y cols, 2002).

**Propuesta de estudio de asociación: rol del gen de la 5,10-metilentetrahidrofolato-reductasa (*MTHFR*) en la expresión de la FL/PNS en la población chilena.**

Durante el embarazo, los requerimientos de folato aumentan para satisfacer las necesidades del desarrollo embrionario y fetal. Este es activamente transportado al feto, lo que ha sido demostrado por las concentraciones sanguíneas observadas en el cordón umbilical, que se encuentran en estrecha relación con los niveles circulantes en la sangre materna (Safi y cols, 2012).

Los folatos pertenecen al complejo de la vitamina B. Muchos alimentos como los vegetales de hojas verdes, legumbres y cereales son ricos en folatos, sin embargo, pierden rápidamente su actividad durante su almacenamiento y procesamiento. El ácido fólico es la forma sintética monoglutámica del folato, la que, en comparación a los folatos naturales es altamente estable (meses e incluso años de almacenamiento). Por lo anterior, el ácido fólico, es la molécula de elección para la fortificación de alimentos y suplementos farmacológicos (Ly y cols, 2012).

Estudios han revelado que las madres que usan multivitamínicos que contienen ácido fólico, antes del embarazo y/o durante el primer trimestre de gestación, presentan un menor riesgo de que sus hijos presenten FL/PNS comparado a las mujeres que no lo usaron (Schutte y Murray, 1999; Hernández, 2000). Sin embargo, esto aún es controversial debido a que otros estudios no han reportado este efecto beneficioso (Frosst, 1995; Van der Put, 1998; Johnson y Little, 2008).

Apoyando lo anterior, existen reportes en humanos y animales que respaldan una relación entre el uso de antagonistas del ácido fólico como metotrexato, aminopterina y anticonvulsivos durante el embarazo y mayor riesgo de FL/PNS en la descendencia (Hernández, 2000).

Los folatos están involucrados en la transferencia de grupos metilos a moléculas involucradas en múltiples funciones biológicas (**Figura 4**). Los grupos metilo son esenciales para la síntesis de nucleótidos usados en replicación y reparación de ADN. Además, están involucrados en el ciclo de la metionina asegurando niveles apropiados de S-adenosilmetionina (SAM), el principal dador de grupos metilo para el ADN, histonas y metilación de otras proteínas para modular sus funciones.



Como antes se menciona, la identificación de factores de riesgo genéticos para la FL/PNS ha sido objeto de estudio en los últimos años, la que está enfocada en la búsqueda de mutaciones codificantes potencialmente causales (Jugessur y cols, 2009).

En relación a los folatos, se tiene conocimiento de alrededor de 50 genes que codifican proteínas que participan en su transporte, metabolismo, ciclo de metilación, DNA y transferencia de grupos metilos y síntesis de nucleótidos; en donde en muchos de ellos se conocen polimorfismos de riesgo para FL/PNS (Bhaskar, 2011).

En este contexto, un gen atractivo para estudiar es el que codifica para la enzima 5,10-Metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*), clave en este metabolismo. Esta enzima cataliza la reacción de conversión de 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, la cuál es la forma primaria circulante de los folatos (Frosst y cols, 1995).

Un polimorfismo común de un solo nucleótido (SNP) de este gen es el c.677C>T (rs1801133) (Mills y cols, 2008), el cual resulta en un cambio de alanina por valina en el codón 222 (p.Ala222Val) y es responsable de alterar la actividad de la enzima y generar su termolabilidad, lo que se manifiesta como una leve a moderada hiperhomocisteinemia (Pereira y cols, 2004).

En un reciente meta-análisis, Zhao y cols (2014) evaluaron en poblaciones asiáticas si existe asociación entre el polimorfismo c.677C>T de *MTHFR* y un mayor riesgo de FL/PNS, concluyendo que esta asociación existía. Luo y cols (2012) en sus resultados sugieren que podría existir asociación entre el genotipo de esta variante y FL/PNS en la población de origen caucásico. Un meta-análisis posterior (Pan y cols, 2013) confirma que c.677C>T se encuentra involucrado en el desarrollo de esta malformación.

En la literatura se pueden encontrar dos estudios previos que incluyen población chilena en su muestra, que son parte del Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas (ECLAMC). En ellos, la población chilena fue agrupada con otros sujetos sudamericanos, no encontrando asociación entre esta variante y FL/PNS (Vieira y cols, 2005, 2008).

En la presente tesis se estudió, por primera vez exclusivamente con individuos chilenos, si existe asociación entre el polimorfismo c.677C>T del gen *MTHFR* y la expresión de la fisura labiopalatina no sindrómica en nuestro país. Para este propósito se realizó genotipificación por PCR en tiempo real para determinar las distintas frecuencias alélicas del polimorfismo c.677C>T en una población chilena. Con los resultados obtenidos se evaluó asociación mediante dos diseños complementarios de estudio: casos-controles y tríos caso-progenitores. Dado que estas muestras no son independientes, compartiendo parcialmente la población de casos, se genera una correlación entre sus resultados (Martin y Kaplan, 2000). Es por ello que además se propuso un análisis de asociación que combina los resultados de ambos diseños.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis

El polimorfismo c.677C>T del gen *MTHFR* está asociado con el riesgo de fisura labiopalatina no sindrómica en Chile.

### Objetivo general

Evaluar la asociación entre el polimorfismo c.677C>T del gen *MTHFR* y el riesgo de fisura labiopalatina no sindrómica en Chile usando dos diseños complementarios de estudio.

### Objetivos específicos

1. Determinar mediante genotipificación por PCR en tiempo real la frecuencia del polimorfismo c.677C>T del gen *MTHFR* en individuos chilenos con FL/PNS, sus progenitores y un grupo control.
2. Evaluar la asociación entre el polimorfismo c.677C>T del gen *MTHFR* y FL/PNS en la muestra de casos y controles chilenos.
3. Evaluar asociación entre el polimorfismo c.677C>T del gen *MTHFR* y FL/PNS en la muestra de tríos-caso progenitores chilenos.
4. Evaluar la asociación combinada de ambas muestras entre el polimorfismo c.677C>T del gen *MTHFR* y FL/PNS en la población chilena.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Grupos de estudio

El grupo de estudio se obtuvo de las bases de datos y de ADN de 2 proyectos financiados por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT, números 1061078 y 11090105). La muestra de FL/PNS consistió en 165 casos no relacionados entre sí (35% mujeres) con un rango de edad entre 0 y 31 años. De ellos un 92% de los pacientes presentaba fisura labiopalatina y solo el 8% fisura labial. Además, un 69% de los pacientes no tenía historia familiar de fisura orofacial. Los casos fueron reclutados entre los años 2008 y 2011 después de entrevistar en profundidad al menos a 3 miembros de cada familia para reconstruir la historia familiar. Se realizó una cuidadosa anamnesis para evaluar el uso de sustancias teratogénicas tales como fenitoína, warfarina y etanol durante el embarazo. Se excluyeron los casos sindrómicos o por anomalías cromosómicas.

Los pacientes provenían de los siguientes centros: Unidad de malformaciones cráneo-faciales de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Servicio Dental del Hospital Roberto del Río, Policlínico de Fisurados del Hospital Exequiel González Cortés, Servicio Maxilofacial del Hospital San Borja-Arriaran y del Servicio Maxilofacial del Hospital Sótero del Río.

Además, para una proporción de los casos se dispuso de muestras de ambos progenitores conformando una muestra de 121 tríos-casos progenitores que será incluida en el análisis. El grupo control consistió de 291 individuos chilenos, el que se obtuvo de dadores de sangre del Hospital San José sin historia familiar de fisuras orofaciales. Entre ellos un 45% fueron mujeres (proporción no diferente de la descrita para los casos,  $p=0,201$ ) y de edades que van entre los 18 y 60 años.

Todos los individuos participantes o su representante legal han leído y firmado un documento de consentimiento informado y el uso de las muestras para este estudio fue autorizado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (se adjunta acta de aprobación en Anexo).

### **Procesamiento y análisis.**

Para obtener el ADN genómico se utilizaron leucocitos de sangre periférica, empleando el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987).

La variante c.677C>T del gen *MTHFR* fue genotipificada con ensayos de discriminación alélica usando sondas Taqman (Applied Biosystems, C\_1202883\_20) en una plataforma de PCR en tiempo real (StepOne, Applied Biosystems). Las frecuencias alélicas para estos marcadores fueron estimadas utilizando tanto los genotipos parentales como de los casos y controles. La presencia del equilibrio de Hardy-Weinberg se evaluó en la muestra de controles y de progenitores a través de la prueba de chi-cuadrado usando el paquete estadístico STATA 8.0. Para comparar las frecuencias alélicas entre casos y controles se calculó la estadística de Odds ratio (OR) con un intervalo de confianza de 95%.

Para evaluar el patrón diferencial de la transmisión de los alelos de progenitores a progenie afectada en la muestra de tríos-casos progenitores se empleó el test de desequilibrio de transmisión (TDT), implementado en el paquete STATA 8.0.

Como antes se menciona, la muestra de casos y controles y de tríos-caso progenitores comparten parcialmente la población de casos, por lo que no se pueden considerar independientes, generando una correlación entre ellas (Martin y Kaplan, 2000). Por ello fue necesario realizar un análisis adicional que implica el cálculo de un OR combinado para ambas muestras, además de una prueba de homogeneidad de los resultados de ambos estudios. Ambos análisis se llevaron a cabo usando las fórmulas descritas por Kazeem y Farrall (2005).

## RESULTADOS

En la primera parte de la investigación, para los casos y controles las frecuencias alélicas y genotípicas para la muestra total se describen en la **Tabla 1**. El alelo de riesgo T se observó en una mayor frecuencia en los casos en comparación a los controles, sin embargo, esta diferencia no fue significativa (OR: 1,28 IC: 95%, 0,97-1,70,  $p=0,067$ ). Para los genotipos tampoco se obtuvieron resultados significativos. El genotipo TT fue mayormente encontrado en los individuos afectados con un OR de 1,72 (IC 95%: 0,99-2,96,  $p=0,052$ ).

**Tabla 1.** Asociación entre alelos y genotipos para el polimorfismo c.677C>T de *MTHFR* y FL/PNS en la población chilena total estudiada en los casos y controles.

<b>Muestra Total</b>	<i>Frecuencia en Casos (n=165)</i>	<i>Frecuencia en Controles (n=291)</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p value</i>
<b>Alelos</b>				
C	167 (0,506)	331 (0,568)		
T	163 (0,494)	251 (0,432)	1,28 (0,97-1,70)	0,067
<b>Genotipos</b>				
CC	44 (0,267)	90 (0,309)		
CT	79 (0,479)	151 (0,519)	1,07 (0,68-1,68)	0,769
TT	42 (0,254)	50 (0,172)	1,72 (0,99-2,96)	0,052

OR: Odds Ratio con 95% de intervalo de confianza.

Al separar por género la muestra de casos y controles no se obtuvieron resultados significativos (**Tablas 2 y 3**). En las mujeres se observó una frecuencia levemente mayor del alelo T con un OR de 1,37 (IC 95%: 0,88-2,14,  $p=0,159$ ) y el genotipo TT con OR: 2,04 (IC 95%: 0,84-4,92,  $p=0,113$ ) (**Tabla 2**). En los hombres se observó para el alelo T un OR 1,22 (IC 95%: 0,87-1,72,  $p=0,241$ ) y el genotipo TT OR de 1,53 (IC 95%: 0,76-3,08,  $p=0,228$ ) (**Tabla 3**).

**Tabla 2.** Asociación entre alelos y genotipos para el polimorfismo c.677C>T de *MTHFR* y FL/PNS en las mujeres de la población chilena estudiada en los casos y controles.

<b>Mujeres</b>	<i>Frecuencia en Casos (n=58)</i>	<i>Frecuencia en Controles (n=120)</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p value</i>
<b>Alelos</b>				
C	59 (0,509)	141 (0,587)		
T	57 (0,491)	99 (0,413)	1,37 (0,88-2,14)	0,159
<b>Genotipos</b>				
CC	17 (0,293)	39 (0,325)		
CT	25 (0,431)	63 (0,525)	0,91 (0,44-1,89)	0,802
TT	16 (0,276)	18 (0,150)	2,04 (0,84-4,92)	0,113

OR: Odds Ratio con 95% de intervalo de confianza.

**Tabla 3.** Asociación entre alelos y genotipos para el polimorfismo c.677C>T de *MTHFR* y FL/PNS en los hombres de la población chilena estudiada en los casos y controles.

<b>Hombres</b>	<i>Frecuencia en Casos (n=107)</i>	<i>Frecuencia en Controles (n=171)</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p value</i>
<b>Alelos</b>				
C	108 (0,505)	190 (0,444)		
T	106 (0,495)	152 (0,556)	1,22 (0,87-1,72)	0,241
<b>Genotipos</b>				
CC	27 (0,252)	51 (0,298)		
CT	54 (0,505)	88 (0,515)	1,15 (0,65-2,06)	0,616
TT	26 (0,243)	32 (0,187)	1,53 (0,76- 3,08)	0,228

OR: Odds Ratio con 95% de intervalo de confianza.

En la segunda etapa, de tríos-caso progenitores (**Tabla 4**), los genotipos parentales fueron distribuidos en concordancia al equilibrio de Hardy-Weinberg. El Análisis TDT muestra que el alelo T se transmitió significativamente en mayor medida desde los padres heterocigotos (78 transmitidos/46 no transmitidos) con un OR de 1,69 (IC 95%, 1,18-2,44,  $p=0,0041$ ).

**Tabla 4.** Evaluación del patrón diferencial con que se transmiten los alelos de progenitores a progenie afectada en la muestra de tríos-casos progenitores con el test de desequilibrio de transmisión (TDT).

<b>TDT</b>	<i>OR (95% IC)</i>	<i>p value</i>
Transmitidos / No Transmitidos 78 / 46	1,69 (1,18-2,44)	0,0041

OR: Odds Ratio con 95% de intervalo de confianza.

Como las muestras de los casos y controles y tríos caso-progenitores no son independientes al compartir parcialmente la población de casos, se calculó un OR combinado cuyo resultado fue significativo (OR: 1,41, IC 95%:1,14-1,75;  $p=0,0015$ ) (**Tabla 5**). Finalmente, la prueba de homogeneidad para los resultados de ambos estudios no fue significativa  $p=0,2314$ .

**Tabla 5.** Análisis combinado de los casos y controles, y tríos-caso progenitores para asociar el polimorfismo c.677C>T de MTHFR y FL/PNS en la población chilena.

<b>Etapa de estudio</b>	<i>OR (95% IC)</i>	<i>p value</i>
Casos y Controles	1,28 (0,97-1,70)	0,067
Tríos-Casos Progenitores	1,69 (1,18- 2,44)	0,0041
Estudio Combinado	1,41 (1,14-1,75)	0,0015

*p value* para el test de homogeneidad para OR: 0,2314.

OR: Odds Ratio con 95% de intervalo de confianza.

## DISCUSIÓN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la asociación entre el polimorfismo c.677C>T del gen *MTHFR* y el riesgo de FL/PNS en una población chilena usando dos diseños complementarios de estudio en dos etapas, la primera de casos y controles, y la segunda utilizando la muestra de tríos-casos progenitores.

En la primera etapa, al analizar la población total de la investigación (**Tabla 1**), se observó que el alelo de riesgo T se encontraba en mayor frecuencia en los casos en comparación a los controles, sin embargo, los resultados no fueron significativos por un leve margen ( $p=0,067$ ). Situación similar se observó al realizar el análisis a nivel de genotipos para la combinatoria TT ( $p=0,052$ ).

En relación al género de los individuos, es ampliamente aceptado que FL/PNS es más frecuente en hombres, llegando a ser en una proporción 2:1 en poblaciones blancas (Mossey, 2009). Sin embargo, esto no se pudo establecer debido a que al separar la muestra por género no hubo asociación significativa a nivel de alelos ni genotipos (**Tablas 2 y 3**).

Si contrastamos estos resultados con otros estudios, en meta-análisis multiétnicos de Luo y cols (2012) y Pan y cols (2013), se obtuvieron resultados similares a nivel de genotipos (TT) con OR de 1,22 (IC 95%, 0,97-1,55) y de 1,21 (IC 95%, 0,97-1,53) respectivamente. Por otro lado, Zhao y cols (2014) obtuvieron asociaciones significativas para el alelo T y genotipo TT con un riesgo aumentado de FL/PNS en poblaciones asiáticas. Dos trabajos del Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas (ECLAMC) han analizado población sudamericana en conjunto con un bajo número de sujetos chilenos en sus estudios no encontrando asociación entre el polimorfismo c.677C>T de *MTHFR* y FL/PNS (Vieira, 2005, 2008).

Como ya se mencionó, el diseño de estudio de casos y controles presenta la desventaja de poder generar resultados tanto falsos positivos como negativos (resultados espurios) ya sea por la composición genética de la población o por estratificación por etnicidad (Santos y cols, 2002). En Chile por las características ya mencionadas de nuestra población contemporánea se puede generar este fenómeno, por lo que las diferencias observadas entre los resultados obtenidos en esta investigación y otros estudios consultados podrían ser un claro ejemplo de la heterogeneidad genética en las distintas poblaciones en la expresión de FL/PNS y la presencia del polimorfismo.

En la segunda etapa para confirmar los resultados obtenidos con los casos y controles se utilizó el diseño de tríos-casos progenitores. Este diseño no es afectado por la estratificación poblacional debido a que con los alelos no transmitidos de los progenitores a la progenie se conforma un grupo control (“pseudo-control”) pareado perfectamente con los casos por origen étnico (Santos y cols, 2012).

El análisis TDT mostró que el alelo T constituye un factor de riesgo de FL/PNS en la población chilena ( $p=0,0041$ ) (**Tabla 4**). La mayoría de los estudios de tríos reportan que en la descendencia el polimorfismo c.677C>T de *MTHFR* no es factor de riesgo para FL/PNS, a excepción de 2 reportes (Zhu y cols, 2010; de Aguiar y cols, 2015), lo que puede nuevamente reflejar el fenómeno de heterogeneidad genética. En nuestro conocimiento, no existen revisiones sistemáticas evaluando esas variables con dicho diseño.

Como los resultados obtenidos en ambas etapas no son independientes entre sí y comparten parcialmente la población se casos, se decidió realizar un análisis combinado (Martin y Kaplan, 2000).

El análisis combinado presentó un OR: 1,41 ( $p=0,0015$ ) lo que muestra un riesgo aumentado de FL/PNS en la descendencia que presenta el alelo T. Este resultado obtenido por las fórmulas de Kazeem y Farrall (2005) al integrar ambos estudios, nos da un *p value* aproximadamente 3 veces más significativo comparado al obtenido en el estudio de tríos y está respaldado por el resultado no significativo del test de homogeneidad ( $p=0,2314$ ) (**Tabla 5**), que establece que lo obtenido en ambos estudios por separado (casos-control y tríos) es comparable.

Desde enero del año 2000, en Chile se estableció la fortificación obligatoria de la harina de trigo con ácido fólico que tuvo como consecuencia una disminución aproximadamente de un 50% de las patologías relacionadas a los defectos del tubo neural, sin lograr cambios en la prevalencia de FL/PNS (Nazer y Cifuentes, 2014). Por lo anterior, la edad de los individuos participantes no interferiría con los resultados de la presente investigación al considerar que existen individuos que nacieron antes de esta medida. Por lo tanto, la disponibilidad de ácido fólico en Chile no sería el principal responsable de FL/PNS y su causa estaría relacionada al metabolismo de este, lo que está en concordancia con los resultados obtenidos.

El mismo grupo de investigación desde donde surge el presente estudio, en un reporte previo, evaluó si existía asociación entre c.677C>T de *MTHFR* y un incremento del riesgo de presentar espina bífida, en una muestra de Chilenos nacidos en el periodo post fortificación de la harina de trigo con ácido fólico (Pardo y cols, 2014). Dicho estudio no encontró asociación entre estas variables, lo que difiere con lo encontrado en este estudio para FL/PNS. Por ello se puede inferir que los defectos del tubo neural post fortificación probablemente no tengan relación con el metabolismo del folato, pero las fisuras orofaciales si lo tengan (al menos en relación al rol que la *MTHFR* podría jugar).

Finalmente, no se debe olvidar que FL/PNS es una patología de etiología multifactorial, en la que intervienen factores ambientales y hereditarios, y entre los

involucrados con el ácido fólico se conocen más de 50 genes con polimorfismos de riesgo que podrían contribuir a que se presente esta patología, por lo que el polimorfismo c.677C>T de *MTHFR* es solo uno de muchos factores que podrían contribuir a que se exprese esta patología.

## CONCLUSIONES

-En la muestra de casos y controles, no se obtuvieron resultados significativos probablemente debido al fenómeno de estratificación poblacional.

-En la muestra de tríos-caso progenitores, con el análisis TDT, podemos concluir que el alelo T al estar presente en los progenitores, es factor de riesgo de FL/PNS al transmitirse en mayor proporción a la descendencia.

-Mediante la determinación del OR combinado, y a pesar de que se detectaron resultados espurios de asociación en el estudio de casos y control, se puede concluir que la presencia del alelo T de c.677C>T de *MTHFR* es un factor de riesgo en la aparición de FL/PNS en Chile.

-

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- de Aguiar PK, Coletta RD, de Oliveira AM et al (2015). rs1801133C>T polymorphism in MTHFR is a risk factor for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Brazilian population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 103: 292–298.
- Bender PL. (2000). Genetics of cleft lip and palate. *J Pediatr Nurs* 15: 242-249.
- Bhaskar LV, Murthy J, Venkatesh Babu G (2011). Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and orofacial clefts. *Arch Oral Biol* 56: 723–737
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Christensen K, Juel K, HerskindAM, Murray JC. (2004). Long term follow up study of survival associated with cleft lip and palate at birth. *BMJ* 328:1405.
- Cobourne MT (2004). The complex genetics of cleft lip and palate. *Eur J Orthod.* 2004; 26(1): 7-16.
- Farral M, Holder S (1992). Familial recurrence - pattern analysis of cleft lip with or without cleft palate. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 270-7.
- Frebourg T, Oliveira C, Hochain P, Karam R, Manouvrier S, Graziadio C. y cols (2006). Cleft lip/palate and CDH1/E-cadherin mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *J Med Genet* 43:138–142.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA y cols. (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* 10: 111–113.

- Gaspar DA, Matioli SR, Pavanello RC, Araújo BC, André M, Steman S y cols (2002). Evidence that BCL3 plays a role in the etiology of nonsyndromic oral clefts in Brazilian families. *Genet Epidemiol* 2002; 23: 364-374.
- Gorlin RJ, Cohen MM, Levin LS.(1990) Syndromes of the head and neck. 3rd edition. New York: Oxford University press 1990.
- Hernández D, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA (2000). Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *New England journal of medicine* 343: 1608-1614
- Johnson CY, Little J. (2008). Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging?. *Int J Epidemiol* 37:1041–1058.
- Jugessur A, Farlie PG, Kilpatrick N. (2009) The genetics of isolated orofacial clefts: From genotypes to subphenotypes. *Oral Dis.* 2009; 15(7): 437-453.
- Jugessur A, Murray JC (2005). Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev* 15: 270–278.
- Kazeem G., Farrall M. (2005). Integrating Case-Control and TDT Studies. *Annals of Human Genetics* 2005 69,329–335.
- Langman S. (2009) Embriología Médica. 11va Edición. Editorial Médica Panamericana 2009.
- Lidral AC, Moreno LM, Bullard SA. (2008) Genetic Factors and Orofacial Clefting.. *Semin Orthod.* 2008; 14(2): 103-114.

- Luo Y, Cheng Y, Wang W, Gao X, Chen Q. (2012). Association between MTHFR Polymorphisms and Orofacial Clefts Risk: A Meta-Analysis. *Birth Defects Research (Part A)* 94:237–244 (2012).
- Ly A, H Lesley, Crowell J, Kim Y. (2012) Folate and DNA Methylation. *Antioxidants & Redox signaling, Volume 17, Number 2, 2012.*
- Marazita ML, Mooney MP. (2004). Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and cleft palate. *Clin Plast Surg* 2004; 31: 125-140.
- Martin E.R., Kaplan N.L. (2000). A Monte Carlo Procedure for Two-Stage Tests With Correlated Data. *Genetic Epidemiology* 18:48-62 (2000).
- Mills JL, Molloy AM, Parle-McDermott A, Troendle JF, Brody LC, et al. (2008) Folate-related gene polymorphisms as risk factors for cleft lip and cleft palate. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 82: 636–643.
- Mitchell L, Risch N (1992). Mode of inheritance of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: A reanalysis. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 323-332.
- Molina-Solana R, M Yañez R, Iglesias A, Mendoza A, Solano E. (2013). Current concepts on the effect of environmental factors on cleft lip and palate. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2013; 42: 177–184
- Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. (2009). Cleft lip and palate. *Lancet* 374:1773–1785.
- Mossey PA, Modell B (2012) Epidemiology of oral clefts 2012: an international perspective. *Front Oral Biol* 16: 1–18.
- Murray JC.(2002). Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet*

2002; 61: 248-256.

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

-Pan Y, Ma J, Zhang W, Wang Y, Wang Y, Zhang H. y cols(2010a). Replication of two novel susceptibility loci for nonsyndromic. *Oral Dis.* 2011 Apr;17(3):304-8.

-Pan Y, Ma J, Zhang W, Du Y, Niu Y, Wang M y cols (2010b). IRF6 polymorphisms are associated with nonsyndromic orofacial clefts in a Chinese Han population. *Am J Med Genet Part A* 152A:2505–2511.

-Pan X, Wang P, Yin X, Liu X. (2013). Association between Maternal MTHFR Polymorphisms and Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in Offspring, A Meta-Analysis Based on 15 Case-Control Studies. *International Journal of Fertility and Sterility Vol 8, No 4, Jan-Mar 2015, Pages: 463-480.*

-Palomino HM, Palomino H, Cauvi D, Barton S, Chakraborty R. (1997) Facial clefting and Amerindian admixture in populations of Santiago, Chile. *Am J Hum Biol* 1997; 99: 225-232 orofacial clefts in a Chinese population. *Oral Dis* 17:304–308.

-Pardo R, Suazo J, Castillo S et al (2014). Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms as risk factors for myelomeningocele. *Rev Med Chil* 142: 587–592.

-Pereira AC, Schettert IT, Morandini Filho AA, Guerra-Shinohara EM, Krieger JE. (2004). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T gene variant modulates the homocysteine folate correlation in a mild folate-deficient population. *Clin Chim Acta* 340:99–105.

-Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M y cols (2008). Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated

with cleft lip. *Nat Genet* 40:1341–1347.

-Rothhammer F, Lasserre E, Blanco R, Covarrubias E, Dixon M.(1968). Microevolution in human Chilean populations. IV. Shovel shape, mesial-palatal version and other dental traits in Pewenche Indians. *Z Morphol Anthropol* 1968; 60: 162-169.

-Safi J, Joyeux L, Chalouhi G. E.(2012). Periconceptional Folate Deficiency and implications in Neural Tube Defects. *J Pregnancy*. 2012; 2012: 295083.

-Santos JL, Perez F, Carrasco E, Albala C.(2002). Uso de tríos caso-padres en estudios epidemiológicos de asociación entre polimorfismos genéticos y enfermedades complejas. *Rev Med Chile* 2002; 130: 1307-1315.

-Schutte BC, Murray JC (1999). The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet* 8: 1853–1859.

-Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. (1993). Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 52:506–16.

-Stover Patrick (2011). Polymorphisms in 1-Carbon Metabolism, Epigenetics and Folate-Related Pathologies. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2011;4:293–305.

-Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, et al. (1998). A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *American journal of human genetics* 62: 1044.

-Vieira AR, Murray JC, Trembath D (2005). Studies of reduced folate carrier 1 (RFC1) A80G and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphisms with neural tube and orofacial cleft defects. *Am J Med Genet A*

135: 220–223.

-Vieira AR, Cooper ME, Marazita ML, Castilla EE, Orioli IM (2008). Reduced folate carrier 1 (RFC1) is associated with cleft of the lip only. *Braz J Med Biol Res* 41: 689–693

-Zhao M, Ren Y, Shen L, Zhang Y, Zhou B. (2014). Association between MTHFR C677T and A1298C Polymorphisms and NSCL/P Risk in Asians: A Meta-Analysis. *PLOS ONE* | [www.plosone.org](http://www.plosone.org) 1 February 2014 | Volume 9 | Issue 3 | e88242.

-Zhu J, Hao L, Li S et al (2010). MTHFR, TGFB3, and TGFA polymorphisms and their association with the risk of non-syndromic cleft lip and cleft palate in China. *Am J Med Genet A* 152A: 291–298.

## ANEXOS



**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

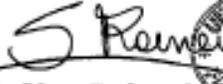


12 ENE. 2016

**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



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.



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.



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](mailto: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.



12 ENE. 2018

### 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: \_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD DE CHILE

Comité de Bioseguridad  
Administración Conjunta Campus Norte



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 Fisura 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