

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**FISURAS OROFACIALES EN CHILE: ASOCIACIÓN ENTRE NIVELES DE
METILACIÓN GLOBAL DEL ADN Y VARIANTES GENÉTICAS PRESENTES EN
*MTHFR, SLC19A1 Y TCN2***

GABRIELA ANDREA CÁCERES ROJAS

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN GENÉTICA

Director de Tesis

Ph. D. José Lorenzo Suazo Sanhueza.

2020

Escuela de Postgrado

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

Gabriela Andrea Cáceres Rojas

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Genética en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 18 de marzo de 2020

Ph. D. José Lorenzo Suazo Sanhueza

Director de Tesis

Laboratorio de Biología Celular y Molecular

Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas

Facultad de Odontología

Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Ph. D. Patricio Alejandro Olguín Aguilera

Presidente Comisión

Ph. D. José Luis Santos Martín

Ph. D. Marcia Carolina Manterola Zúñiga

Ph. D. Isabel Verónica Castro Masso

DEDICATORIA

*A mi familia y mi amor: Viviana, Fernando, Susana, Eliecer y Jake
Pero en especial a quien, sin quererlo ni saberlo, me guio hacia este camino
A mi hermana, Daniela Cáceres Rojas*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos aquellos que me apoyaron durante el desarrollo de mi magister y esta tesis

Primero a quienes creyeron en mí y me permitieron entrar a este programa ya que ha sido una maravillosa experiencia. En especial a la Dra. Lucía Cifuentes, quien fue mi tutora académica durante este proceso y me guio de la mejor forma posible, tanto académicamente como personalmente.

En segunda instancia al Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas en la Facultad de Odontología, especialmente a mi director de tesis Ph. D. José Suazo, quien me recibió, escuchó mis inquietudes y expectativas e hizo lo posible por incorporarlas para el desarrollo de esta investigación. También a su lab manager TM. Andrea Recabarren, quien me acogió y con paciencia me enseñó el quehacer del laboratorio. A ambos les tengo infinito aprecio y me siento realmente afortunada de haber realizado este proceso en su laboratorio.

También quiero dar las gracias a quienes me recibieron en el Laboratorio de Programación y Epigenética Perinatal del Centro de Investigaciones Médicas de la Pontificia Universidad Católica: Ph. D. Bernardo Krause y su equipo. Ellos me abrieron las puertas de su laboratorio, me enseñaron a realizar la técnica de pirosecuenciación y siempre estuvieron dispuestos a resolver cualquier problema que llegué a tener, esto fue fundamental para el desarrollo de esta tesis.

Finalmente, quiero agradecer enormemente a todos aquellos que me dieron palabras de aliento durante este tiempo, a mis amigos y en especial a mi familia: Viviana Rojas, Fernando Cáceres, Daniela Cáceres y mi amor Eliecer Zamorano. Con todos ellos sacrifiqué tiempo, pero entendieron mis motivos e independiente de cómo fueron los tiempos siempre estuvieron y han estado apoyándome, conteniéndome en los momentos críticos y alentándome a seguir.

Infinitas gracias a todos ustedes

ÍNDICE

MATERIAS

	pág.
1. Resumen.....	12
2. Abstract.....	13
3. Introducción.....	14
3.1. Fisuras orofaciales.....	14
3.2. Embriología.....	15
3.3. Epidemiología.....	15
3.4. Etiología de las FOFNSs.....	16
3.4.1. Factores de riesgo genéticos.....	16
3.4.2. Factores de riesgo ambientales.....	16
3.5. Metabolismo del folato / un carbono.....	17
3.6. Modificaciones epigenéticas.....	19
3.7. Elemento Nucleotídico Largo Intercalado 1 (LINE-1).....	19
3.8. Variantes genotípicas y su asociación con la metilación del ADN.....	21
3.9. Metilentetrahidrofolato reductasa (<i>MTHFR</i>).....	22
3.10. Transportador de folato reducido (<i>SLC19A1</i>).....	22
3.11. Transcobalamina II (<i>TCN2</i>).....	23
3.12. Folatos y FOFs en Chile.....	3
4. Hipótesis.....	24
5. Objetivos.....	24
5.1. Objetivo General.....	24
5.2. Objetivos Específicos.....	24
6. Metodología.....	25
6.1. Tamaño muestral y diseño de estudio.....	25
6.2. Selección, reclutamiento y toma de muestra de pacientes y grupo control.....	25
6.3. Cuantificación del porcentaje de metilación de LINE-1 en muestras de pacientes con fisuras orofaciales y grupo control.....	26

6.3.1. Modificación con bisulfito de citosinas no metiladas.....	26
6.3.2. Protocolo de PCR para amplificar LINE-1.....	26
6.3.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	27
6.3.4. Cuantificación mediante pirosecuenciación de puntos susceptibles de metilación en la secuencia LINE-1.....	27
6.4. Genotipificación de genes <i>MTHFR</i> , <i>SLC19A1</i> y <i>TCN2</i> de pacientes con fisuras orofaciales y grupo control.....	28
6.5. Análisis estadístico.....	29
7. Resultados.....	30
7.1. OE1: Cuantificar el nivel de metilación de LINE-1 en pacientes chilenos con fisuras orofaciales no sindrómicas y en un grupo control.....	30
7.2. OE2: Evaluar la asociación entre el nivel de metilación en LINE-1 y la aparición de fisuras orofaciales no sindrómicas en una población chilena.....	31
7.3. OE3: Establecer el grado de asociación entre el genotipo de <i>MTHFR</i> , <i>SLC19A1</i> y <i>TCN2</i> involucrados en el metabolismo del folato/un- carbono con los niveles de metilación en pacientes chilenos con fisuras orofaciales y en un grupo control.....	34
8. Discusión.....	36
9. Conclusión.....	43
10. Referencias.....	44
11. Anexos.....	52
11.1. Anexo 1: Acta de aprobación de protocolo de investigación por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.....	52
11.2. Anexo 2: Consentimiento informado usado para casos.....	54
11.3. Anexo 3: Consentimiento Informado usado para controles.....	59
11.4. Anexo 4: Características de los primers de PCR para amplificar LINE-1.....	63
11.5. Anexo 5: Preparación de la estación de trabajo al vacío.....	65
11.6. Anexo 6: Protocolo usado en la estación de trabajo al vacío.....	66
11.7. Anexo 7: Ensayo de islas CpG configurado en PyroMark.....	68
11.8. Anexo 8: resultados de test aplicados (U de Mann Whitney y T de Student) punto por punto.....	69

11.9. Anexo 9: Presentación formato póster en congreso IADR 2019.....	70
11.10. Anexo 10: Publicación en revista International Journal of Molecular Sciences.....	71
11.11. Anexo 11: Publicación en revisión para revista Epigenomics.....	72

FIGURAS

	pág.
1. Representación de las distintas manifestaciones clínicas de las fisuras orofaciales.....	14
2. Esquema simplificado del metabolismo de un-carbono en mamíferos.....	18
3. Sitios de integración de LINE-1 a lo largo del genoma humano.....	20
4. Componentes de la estación de trabajo al vacío de PyroMark Q96.....	65
5. Herramienta de trabajo levantada en un ángulo de más de 90°.....	66

TABLAS

	pág.
1. Características por grupo de las 190 muestras óptimas para análisis.....	30
2. Asociación entre promedios de metilación de LINE-1 y FOFNS en Chile.....	32
3. Asociación entre niveles de metilación de LINE-1 distribuido en terciles y FOFNS en Chile.....	33
4. Análisis de interacción entre niveles de metilación de LINE-1, riesgo de FOFNS y genotipo de variantes de <i>MTHFR</i> , <i>SLC19A1</i> y <i>TCN2</i>	35
5. Asociación entre metilación punto por punto de LINE-1 y FOFNS en Chile.....	69

ABREVIATURAS

5,10-MTHF	: 5,10 metilen tetrahidrofolato
5-me-THF	: 5 metil tetrahidrofolato
95% IC	: Intervalo de confianza del 95%
A	: Adenina
ADN	: Ácido Desoxirribonucleico
ARN	: Ácido Ribonucleico
ASP	: Antisense Transcript Promoter (Promotor de transcrito antisentido)
BTUCH	: Biobanco de tejidos de la Universidad de Chile
C	: Citosina
CNV	: Copy Number Variation
CpG	: Citosina-fosfato-Guanina
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
DNMT	: DNA Methyltransferase (ADN Metiltransferasa)
dNTP	: Deoxynucleotide Triphosphate (Desoxirribonucleótidos trifosfato)
ECLAMC	: Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas
FL	: Fisura labial
FL/P	: Fisura labial con o sin paladar
FL/PNS	: Fisura labial con o sin paladar no sindrómica
FLP	: Fisura Labiopalatina
FOF	: Fisura Orofacial
FOFNS	: Fisura Orofacial No Sindrómica
FONDECYT	: Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico
FP	: Fisura palatina

G	:	Guanina
LINE	:	Long Interspersed Nuclear Elements
LINE-1	:	Long Interspersed Nuclear Element 1
MAF	:	Minor allele frequency (Frecuencia de alelo menor)
MS	:	Methionine synthase (Metionina sintasa)
MTHFD1	:	Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase (Metilentetrahidrofolato deshidrogenasa)
MTHFR	:	Methylenetetrahydrofolate Reductase (Metilentetrahidrofolato reductasa)
ng	:	Nanogramo
NSOFC	:	Non Syndromic Orofacial Cleft
OFC	:	Orofacial Cleft
OR	:	Odds Ratio
ORF	:	Open Reading Frame (Marco de lectura abierto)
pág.	:	Página
pb	:	par de base
PCR	:	Polimerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
RNA	:	Ribonucleic Acid
RNV	:	Recién nacido vivo
SAH	:	S-Adenosil-L-Homocisteína
SAM	:	S-Adenosil-Metionina
SHMT	:	Serine Hydroxymethyltransferase (Serina Hidroximetiltransferasa)
SINE	:	Short Interspersed Nuclear Elements
SLC19A1	:	Solute Carrier Family 19 Member 1 (Familia de transportadores solubles 19 miembro 1)
SNP	:	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de un solo nucleótido)
T	:	Timina

- TCN2** : Transcobalamin II (Transcobalamina II)
- TGFb** : Transforming Growth Factor Beta (Factor de crecimiento transformante beta)
- THF** : Tetrahidrofolato
- tRNA** : Ácido ribonucleico de transferencia
- uL** : Microlitro
- V** : Voltios

1. RESUMEN

En la etiología de las fisuras orofaciales no sindrómicas (FOFNS) el metabolismo de los folatos jugaría un importante rol, en donde se han reportado asociaciones con variantes hipofuncionales de genes de este metabolismo sumado a que el bajo consumo materno de esos micronutrientes es uno de los factores ambientales más importantes. Esta vitamina es crucial para la síntesis y metilación del ADN. En Chile, a pesar del aumento del consumo de folatos, no ha disminuido la tasa de FOFs. En el presente estudio se evaluó el riesgo de FOFNS en Chile asociado a niveles bajos de metilación global del ADN. Para ello se evaluaron 95 casos y 95 controles pareados por sexo y edad donde se cuantificó mediante pirosecuenciación los niveles de metilación de LINE-1 (marcador de metilación global del ADN) en células de la mucosa oral. Además, se evaluó la asociación de los niveles de metilación de LINE-1 con las variantes de los genes del metabolismo del folato *MTHFR*, *SLC19A1* y *TCN2*. Los resultados muestran un aumento del riesgo de FOFNS asociado a hipometilación del ADN ($p=0.008$), pero este riesgo no se ve modificado por el genotipo de ninguna de las variantes de los tres genes analizados. En conclusión, nuestros hallazgos confirman la hipótesis sobre el aumento de la susceptibilidad a FOFNS cuando el DNA esta poco metilado, lo que podría afectar la expresión génica. Los resultados de interacción gen-metilación pueden ser efecto del modesto tamaño muestral utilizado.

2. ABSTRACT

In the etiology of non-syndromic orofacial clefts (NSOFC) the metabolism of folates would play an important role, where associations with hypofunctional variants of genes involved in this metabolism have been reported in addition to the low maternal intake of these micronutrients is one of the most important environmental factors. This vitamin is crucial for the synthesis and methylation of DNA. In Chile, despite the increase in folate consumption, the OFC rate has not decreased. In this study, we assessed if the risk of NSOFC in Chile was associated with low levels of global DNA methylation. For this purpose, 95 cases and 95 controls matched by sex and age were evaluated, where the methylation levels of LINE-1 (global DNA methylation marker) in oral mucosa cells were quantified by pyrosequencing. In addition, the role of variants of the folate metabolism genes *MTHFR*, *SLC19A1* and *TCN2* on the association between these variables was evaluated. The results indicate an increase of the risk of NSOFC associated with DNA hypomethylation ($p = 0.008$), but this risk is not modified by the genotype of any of the variants in the three genes considered. In conclusion, our findings confirm the hypothesis about the increased susceptibility to NSOFC when the DNA is poorly methylated, which could affect gene expression. The results of gene-methylation interaction may be the effect of the modest sample size considered.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Fisuras orofaciales

Las fisuras orofaciales (FOFs) o fisuras labiopalatinas son un defecto cráneo facial en el que las estructuras que forman el labio superior y/o el paladar no se fusionan correctamente durante el desarrollo embrionario. Esta es una de las malformaciones congénitas más comunes a nivel mundial.

Clínicamente las fisuras orofaciales se pueden presentar de diversas formas, pudiendo comprometer solo el labio superior (Fisura labial o FL) o sólo el paladar (Fisura palatina o FP) o ambas estructuras (FLP)¹⁻³. En cuanto a la lateralidad, estas pueden presentarse como una fisura de labio y/o paladar primario del lado izquierdo o derecho de la zona medial (unilaterales) o también dos fisuras hacia ambos lados de la zona medial (bilaterales) como se muestra en la figura 1¹⁻³.

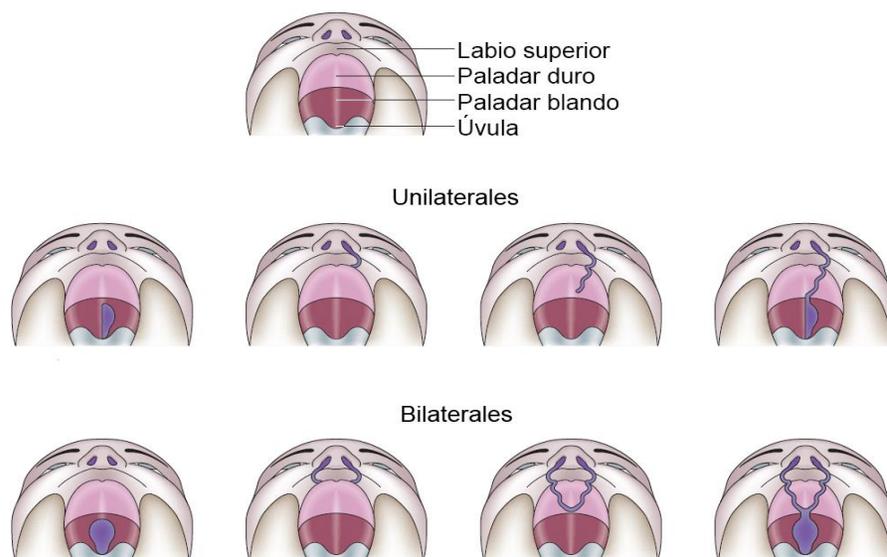


Figura 1. Representación de las distintas manifestaciones clínicas de las fisuras orofaciales. (Adaptado de Dixon et al., 2011)¹

Las consecuencias derivadas de las fisuras orofaciales afectan diversos ámbitos de la vida del paciente, las que pueden ser estéticas, auditivas, del habla, cognitivas, psicológicas y sociales¹⁻⁴. Además estos pacientes presentan mayor susceptibilidad a otras patologías como el cáncer colorrectal¹⁻⁴.

Por ello, desde su diagnóstico prenatal hasta su rehabilitación, se requiere un manejo multidisciplinario, que incluye ginecólogos ecografistas, enfermeras, cirujanos plásticos e

infantiles, cirujanos maxilofaciales, otorrinolaringólogos, fonoaudiólogos, genetistas, psicólogos, odontopediatras, ortodoncistas, kinesiólogos, entre otros⁴.

Por lo mencionado anteriormente, comprender la etiología genética de esta malformación puede conducir a realizar una mejor asesoría genética y de planificación en familias que presenten un hijo o pariente con FOF^{3, 4}.

3.2. Embriología

A partir de la cuarta semana de gestación en humanos, la cara se forma a partir de los procesos frontonasales (de los que derivan los procesos nasal medial y lateral), maxilares y mandibulares derivados del primer arco faríngeo⁵. Estos elementos dan origen a las regiones frontal (porción cefálica del proceso frontonasal), región nasal (unión de los procesos nasal medial y lateral), región de la mejilla (unión de los procesos maxilar y mandibular), a región labial inferior y mentoniana (unión de los procesos mandibulares) y la región labial⁵. Esta última se encuentra formada en su línea media por el proceso nasal medial, zona que forma el philtrum; la región lateral es formada por los procesos maxilares. La fisura de labio se produce por la falta de fusión de los procesos maxilares y nasales medios correspondientes, pudiendo estar asociada o no a fisura de paladar⁵.

Durante el proceso de formación del paladar normal las células mesenquémicas de la cresta neural migran a la cavidad oral primitiva donde formarán parte de los procesos palatinos primitivos en conjunto con el epitelio ectodérmico craneofaríngeo. Estos procesos palatinos emergen a cada lado de los procesos maxilares de forma vertical. Hacia la séptima semana de gestación estos procesos se orientan horizontalmente y los epitelios de ambos procesos se juntan hacia la línea media y comienzan a fusionarse formando el techo de la cavidad oral en donde una falla en la unión de estos procesos originará la fisura palatina⁵.

3.3. Epidemiología

Las fisuras orofaciales se presentan en promedio en 1 de cada 1000 recién nacidos vivos siendo una de las malformaciones congénitas más comunes a nivel mundial⁶⁻⁸. La prevalencia de esta varía según el origen étnico de la población, siendo de menos de 0,5/1000 recién nacidos vivos (RNV) en africanos, 1.5/1000 RNV en caucásicos y más de 2/1000 RNV en asiáticos y amerindios^{6, 7}.

Entre todos los casos de fisuras, la mayoría no se encuentran asociados a ningún síndrome u otra malformación por lo que se clasifican como “no sindrómicas” (FOFNS), alcanzando el 70% de los casos totales de fisuras labiales con o sin compromiso del paladar (FL/P) y 50% en FP^{1, 8}. Entre estos, las FL/P son más frecuente en hombres y las FP es más frecuente en mujeres, siendo ambos el doble de casos que en el sexo opuesto^{2, 8}. Del total de FL/P aproximadamente el 75% son unilaterales, en donde la mayoría de ellas se presenta en el lado izquierdo en una razón 2:1^{1, 2}.

En Chile la prevalencia de las fisuras orofaciales es de 1,8/1000 RNV, valor alto pero similar a otros países de Latinoamérica y que se encuentra dentro de lo esperado en nuestro país y el continente, ya que debido al proceso de mestizaje ocurrido presentamos una mezcla predominantemente caucásica y amerindia^{4, 6, 7}.

3.4. Etiología de las FOFNSs

Las fisuras orofaciales no sindrómicas son rasgos genéticos complejos que no tienen una causa única conocida y por ello se describen como multifactoriales^{2, 3, 9}.

3.4.1. Factores de riesgo genéticos

Existen antecedentes donde se evidencia que los pacientes con FOF tienen un familiar afectado en un 20 a 30% de los casos^{2, 3, 9}. En estas familias se han realizado estudios de segregación donde se ha determinado una alta recurrencia de FOFNS^{2, 3, 9}. Además, se ha visto que al tener un pariente de primer grado afectado, el riesgo de tener fisura labial es 32 veces más a que si en la familia no hubieran afectados^{2, 3, 9}. En estudios de mellizos se ha visto que la razón de concordancia es de un 40 a 60% en mellizos monocigóticos, la cual es mucho más alta que la presentada por mellizos dicigóticos (3-5%)^{2, 3, 9}. Estos antecedentes nos sugieren que, si bien no es la única causa, el factor genético de esta enfermedad es un fuerte contribuyente a su expresión^{2, 3, 9}.

Estudios recientes han identificado variantes de ciertos genes participantes en el desarrollo embrionario de la región cráneo facial, así como, algunos que participan del metabolismo del folato que confieren un mayor riesgo de fisuras orofaciales^{2, 3, 9}.

3.4.2. Factores de riesgo ambientales

Se han identificado diversos factores de riesgo ambientales en el desarrollo de FOFs⁹. Entre estas se encuentra el tabaquismo, alcohol y estrés fisiológico materno; el uso de ciertos

medicamentos como corticoesteroides y anticonvulsivantes; además de ciertas deficiencias nutricionales debido a la baja ingesta de cobalaminas y folatos, ambas vitaminas pertenecen al complejo B, las que se encuentran estrechamente relacionadas en el metabolismo de un carbono^{1-3, 9, 10}.

3.5. Metabolismo del folato / un carbono

El folato es una vitamina esencial del complejo B, es soluble en agua y se encuentra particularmente en frutas y verduras, especialmente en legumbres y verduras de hoja verde oscuro^{10, 11}. Estos folatos o vitamina B9 son críticos en el metabolismo de precursores de ácidos nucleicos y aminoácidos, así como también en la metilación del ADN¹⁰⁻¹². Se ha descrito que la deficiencia de estos está relacionada con severas alteraciones en el desarrollo embrionario y otros problemas en la adultez¹⁰⁻¹². Los animales no pueden sintetizar estos folatos *de novo* por lo que el consumo de plantas ricas en estas o de derivados sintéticos como el ácido fólico son el principal recurso de obtención de estas vitaminas en animales¹⁰⁻¹².

La principal función de la vitamina B9 es donar o aceptar unidades de carbono (grupos metilo) mientras ocurre la síntesis de purinas, timidilatos, metioninas, pantotenatos y formil-metionil-tRNAs¹⁰⁻¹². Participan también de otras reacciones como la interconversión entre la serina y glicina y el catabolismo de la histidina¹⁰⁻¹².

En general el término “folato” se refiere a su forma natural que se puede encontrar en plantas, legumbres y algunos productos de origen animal, mientras que el término “ácido fólico” (AF) se refiere a su forma sintética, más estable¹⁰⁻¹². Estas dos moléculas presentan ciertas diferencias: los folatos presentan una cola poliglutámica que puede tener de uno a seis moléculas de glutamato unidas por enlaces peptídicos mientras que el ácido fólico tiene solo una molécula de glutamato en esta posición¹⁰⁻¹². Los folatos deben pasar por un proceso donde esta cola poliglutámica se escinde y quedar monoglutámico (como el ácido fólico) para ser absorbidos por el intestino¹⁰⁻¹². Una vez absorbidas ambas moléculas son reducidas por la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) a su forma bioactiva que es el tetrahidrofolato (THF)¹⁰⁻¹². Posteriormente a esta molécula se le añade una unidad de carbono y se vuelve a reducir generando 5-metil-THF (5-MeTHF o ácido levomefólico), el que pasa al torrente sanguíneo, de donde es captado por los receptores específicos de folato en células de diferentes tejidos¹⁰⁻¹².

Existen estudios en modelos de ratones donde se ha observado el efecto de la suplementación del ácido Fólico en FOFNS, en donde en líneas de ratones con susceptibilidad natural a tener fisuras orofaciales, inducidas por ácido retinoico y en líneas intervenidas genéticamente knockout para *TGFb*, la suplementación con AF en las madres ha disminuido tanto el riesgo de tener FOF en la descendencia como una menor severidad de la patología en los ratones que si presentaron fisura¹⁴.

3.6. Modificaciones epigenéticas

Las modificaciones epigenéticas son capaces de regular la expresión génica sin cambiar la secuencia del material genético y son heredables tanto en la división celular como de progenitores a su descendencia^{12, 15}. Dentro de estos cambios se incluyen la metilación del ADN, modificaciones en las histonas y los ARN no codificantes que actúan sobre el genoma^{12, 15}. De estos mecanismos, el más estudiado ha sido el primero, que consiste en la adición de un grupo metilo en ciertas citosinas cuando esta está unida en su extremo 5' a una guanina (sitio CpG)^{12, 15}. Existen sitios a lo largo del genoma donde se concentra un alto número de estos sitios CpG, los que se llaman islas CpG, muchas de las cuales se asocian a promotores génicos^{12, 15}. La metilación de estos sitios CpG es llevada a cabo por las ADN metiltransferasas (DNMT) que transfieren un grupo metilo desde SAM hasta el carbono 5 de las citosinas^{12, 15}. Este tipo de modificaciones, las que últimamente han sido objeto de arduo estudio, se han asociado a una represión transcripcional por compactación de la cromatina^{10, 16}. Se ha observado que el efecto de diversos factores ambientales finalmente se traduce en cambios en el nivel de metilación del ADN y por ello este puede diferir entre poblaciones celulares de un mismo organismo, según la edad, sexo y estado de salud de un individuo¹⁷⁻²⁰. Además se ha demostrado que su nivel es crítico para el desarrollo embrionario y la aparición de malformaciones congénitas, ya que en este periodo es muy susceptible a cambios ambientales como el consumo o exposición materna y paterna a ciertas sustancias²¹⁻²³.

3.7. Elemento Nucleotídico Largo Intercalado 1 (LINE-1)

En humanos, una gran cantidad de estos sitios CpG están contenidos dentro de secuencias repetitivas a lo largo del genoma, tales como: los Elementos Nucleotídicos Largos Intercalados (LINEs) y los Elementos Nucleotídicos Cortos Intercalados (SINEs)²⁴. Dentro de las secuencias LINEs, está LINE-1 que representa el 17% del genoma total aproximadamente, este se encuentra repetido en a lo largo de todo el genoma como se observa en la figura 3 y se ha visto que sus niveles se correlacionan altamente con el nivel de metilación global del ADN, es

por ello que se usa ampliamente como un biomarcador de metilación global del ADN²⁴. LINE-1 es un retrotransposón que en condiciones naturales se encuentra altamente metilado¹⁸. La secuencia de LINE-1 intacta mide aproximadamente 6 kilobases, conteniendo una región promotora seguida de dos marcos de lecturas abiertos (ORF1 y ORF2), en dirección antisentido igualmente se observa un promotor (ASP) y otro marco de lectura abierto (ORF0)²⁴. ORF1 codifica para una proteína de unión a RNA mientras que ORF2 codifica para una transcriptasa reversa y una endonucleasa, todos estos elementos son requeridos para la retrotransposición de este elemento. ORF0 codifica para una proteína aberrante²⁴.

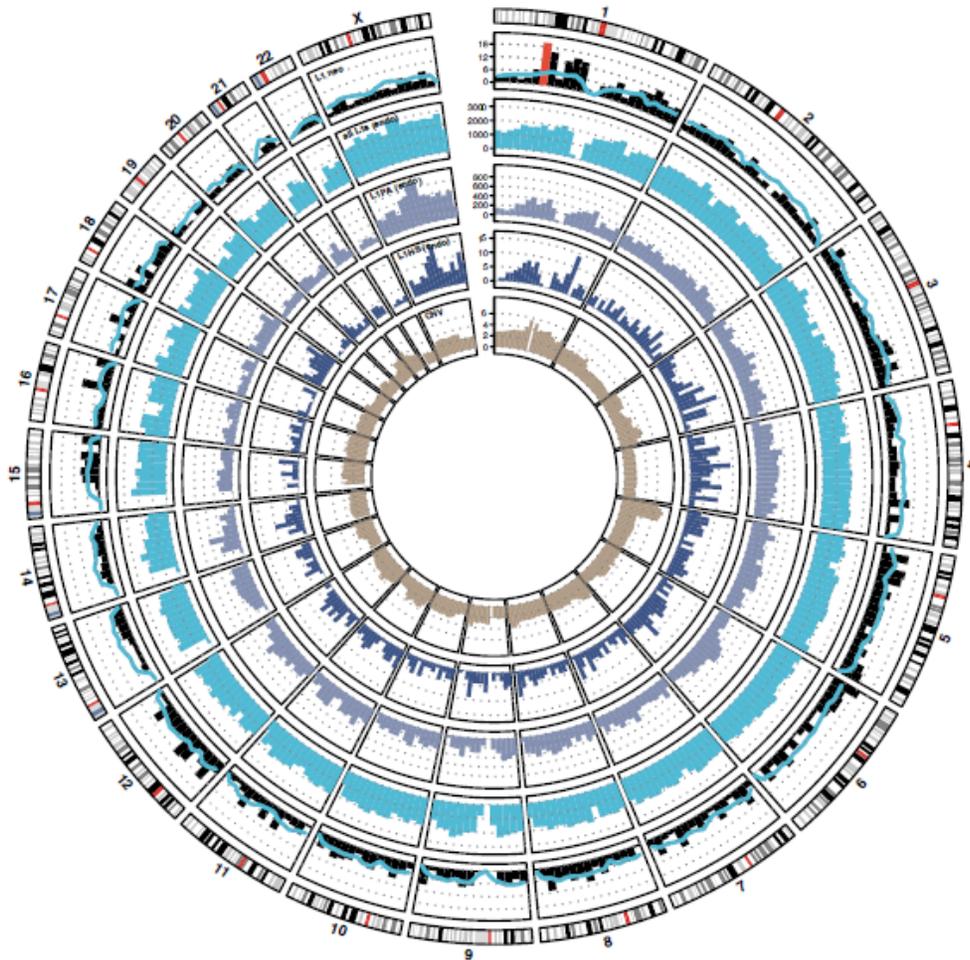


Figura 3. Sitios de integración de LINE-1 a lo largo del genoma humano. Existen 6 secciones que desde afuera hacia adentro son: el número del cromosoma y su ideograma, luego en negro los sitios de inserción de novo observados de LINE-1, la barra roja indica un sitio preferente en el cromosoma 1 y la línea azul representa los sitios potenciales de inserción de novo a lo largo del genoma; en celeste se encuentra el conteo de LINE-1 total; en azul el conteo de LINE-1 en primates; el azul oscuro representa el conteo de LINE-1 en humanos y en café se encuentra el conteo de CNV en cultivo celular de HeLa S3. (Modificado de Sultana et al., 2019)²⁵.

La mayoría de los elementos LINE-1 que se encuentran en el genoma humano presentan diferentes longitudes y en su mayoría no son funcionales, sin embargo, existe una pequeña cantidad de copias que se encuentran intactas y pueden ser potencialmente activas²⁴.

La metilación de LINE-1 se ha estudiado ampliamente en distintos tipos de cáncer, como el de mama, pulmón, colorrectal y próstata entre otros^{24, 26}. En estos, durante las etapas preneoplásicas y tempranas del tumor la hipometilación del promotor de LINE-1 es común y se ha asociado a inestabilidad genómica debido a la retrotansposición de *de novo* principalmente, en el caso de cáncer colorrectal esta hipometilación es más marcada^{24, 26}. Se han reportado casos de patologías congénitas tales como distrofias musculares o hemofilias, la retrotansposición *de novo* en etapas tempranas embrionarias como la posible causa de estas^{24, 26}.

Además, se ha reportado que la metilación de LINE-1 varía de acuerdo a la dieta de la persona, siendo mayor su metilación en personas que consumen vegetales, legumbres, cereales, pan, frutas que en personas que consumen mayormente carne de pescado enlatada, carnes procesadas, aceites, snacks salados y salsas²⁶. Una de las hipótesis de los autores de este estudio para explicar estas diferencias es que en el primer grupo los alimentos son ricos en ciertas vitaminas, sobre todo en ácido fólico²⁷.

Se ha demostrado que su uso en este tipo de investigaciones es altamente informativo¹⁸. En cuanto a fisuras orofaciales y metilación global del ADN, solo se ha estudiado su asociación con la lateralidad de la malformación, mas no existen estudios de caso-control publicados que relacionen el grado de metilación con el riesgo de estas malformaciones²⁸.

3.8. Variantes genotípicas y su asociación con la metilación del ADN

Se han identificado alrededor de 55 genes participantes directa o indirectamente del metabolismo del folato/un carbono, donde ciertas variantes funcionales se han asociado con FOFNS en diferentes poblaciones²⁹⁻³⁴. Además, algunos de estos genes presentan variantes que influyen los niveles de metilación del ADN (medidos en elementos LINE-1)^{35, 36}. En este trabajo de tesis se estudiaron variantes de 3 de estos genes, que han mostrado el efecto más significativo sobre la metilación del ADN en otras poblaciones³⁶.

El primero de ellos y el más importante es *MTHFR*. Además, se han descrito que variantes en genes de la vía metabólica de los folatos, como *SLC19A1* (transportador de folato) y *TCN2*

(transportador de cobalamina) están fuertemente asociados a los niveles de metilación de LINE-1 medidos en leucocitos³⁶.

3.9. Metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*)

El gen que codifica para la metilentetrahidrofolato reductasa se encuentra ubicado en la región 1p36.22. La enzima codificada cataliza la conversión de 5,10-metilentetrahidrofolato en 5-metiltetrahidrofolato, el cual es necesario para remetilar la homocisteína en metionina, principal dador de grupos metilo en citosinas^{37, 38}.

Diversas variantes dentro de este gen se han asociado con una proteína con actividad reducida o termolabilidad que conduce a fenotipos tales como cáncer, esquizofrenia, defectos del cierre del tubo neural, entre otros. La variante más estudiada de este gen es c.677C>T, que fue identificada primero en 1995 en pacientes con niveles altos de homocisteína en plasma, donde se concluyó que esto aumentaba el riesgo de enfermedades vasculares. Dicha variante ha sido ampliamente estudiada en diversas enfermedades, entre ellas las FOFNS. Esta variante se traduce en un cambio de alanina por valina en el aminoácido 222 de la proteína y esto genera que su producto sea termolábil con actividad enzimática reducida^{37, 38}. Se ha estudiado su efecto en la metilación del ADN y se ha evidenciado que personas homocigotas TT presentan niveles disminuidos tanto de folatos circulantes como de metilación global del ADN, en comparación al genotipo común CC³⁷⁻⁴⁰. Este polimorfismo se ha estudiado en nuestra población, evidenciando su posible rol en las FOFNS en Chile⁴¹.

3.10. Transportador de folato reducido (*SLC19A1*)

El gen del transportador del folato se ubica en 21q22.3. *SLC19A1* codifica un transportador de membrana que está involucrado en el transporte activo de folato en la célula, regulando los niveles de concentración intracelular de esta vitamina³⁵. Este se expresa en todos los tejidos y es el mayor transportador de folato³⁵.

Niveles bajos de SLC19A1 se han asociado con diversas patologías por deficiencia de folatos como las enfermedades cardiovasculares, defectos del tubo neural e incluso cáncer³⁵. Variantes presentes en este gen se han asociado como un predictor de los niveles de metilación global de ADN, usando LINE-1 como biomarcador, en individuos sanos³⁵.

3.11. Transcobalamina II (*TCN2*)

El gen transcobalamina II se ubica en 22q12.2 y codifica una proteína plasmática que se une a la cobalamina (también llamada vitamina B12), formando un complejo denominado holotranscobalamina, permitiendo tanto su transporte en la sangre, así como también media su ingreso a la célula influyendo en su concentración intracelular⁴¹. Esta vitamina es un cofactor crucial para la remetilación de la homocisteína en metionina⁴². Las cobalaminas son un factor nutricional importante en el metabolismo de la homocisteína⁴². Se ha descrito que el genotipo de algunas variantes de *TCN2* afecta los niveles de holotranscobalamina intracelular afectando el metabolismo de SAH-SAM, como es el caso del genotipo GG rs1801198 en comparación al genotipo de referencia CC⁴².

3.12. Folatos y FOFs en Chile

Debido a los estudios sobre las consecuencias del bajo consumo del folato sobre la prevalencia de malformaciones congénitas, en Chile en el año 2000 se aplicó una política pública de salud donde se fortificó con ácido fólico la harina de panificación de consumo masivo en todo el país³. Existen estudios que indican que a nivel mundial estos esfuerzos han generado los resultados esperados disminuyendo los nacimientos de niños con defectos del tubo neural y, aunque en menor medida, las FOF^{43, 44}. Sin embargo, nuestro país no parece correr con la misma suerte, ya que analizando los datos de Chile obtenidos por el ECLAMC (Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas), si bien los nacimientos con defectos del tubo neural han disminuido en un 50% aproximadamente, las FOF han seguido estables en el tiempo^{43, 45-47}. Esto, si bien puede deberse a un bajo nivel de folatos añadidos para Chile, también puede ser un indicio de que en nuestro país existen factores de riesgo genético, afectando el transporte y/o metabolismo de los folatos, que podrían explicar el nulo efecto de la fortificación en la prevalencia de esta malformación^{41, 47}.

Por los antecedentes antes descritos, el propósito de este estudio es poner a prueba la hipótesis de que los pacientes chilenos con FOFNS tienen niveles bajos de metilación global del ADN en comparación con individuos no afectados, y que esto depende de la presencia de genotipos específicos de genes que participan de la ruta metabólica del folato/un carbono.

4. HIPÓTESIS

El riesgo de fisuras orofaciales en pacientes chilenos está asociado a bajos niveles de metilación en los elementos repetitivos LINE-1 y esta, a su vez, depende de variantes de los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TCN2* participantes del metabolismo del folato/un-carbono

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la presencia de asociación entre el nivel de metilación de los elementos LINE-1 y el riesgo de fisuras orofaciales no sindrómicas en Chile, considerando el efecto de variantes de los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TCN2*.

5.2. Objetivos específicos

1. Cuantificar el nivel de metilación de LINE-1 en pacientes chilenos con fisuras orofaciales no sindrómicas y en un grupo control.
2. Evaluar la asociación entre el nivel de metilación en LINE-1 y la aparición de fisuras orofaciales no sindrómicas en una población chilena.
3. Establecer el grado de asociación entre el genotipo de *MTHFR*, *SLC19A1* y *TCN2* involucrados en el metabolismo del folato/un-carbono con los niveles de metilación en pacientes chilenos con fisuras orofaciales y en un grupo control.

6. METODOLOGÍA

6.1. Tamaño muestral y diseño de estudio

Esta investigación se realizó en el marco del proyecto FONDECYT 1170805 (Concurso 2017)⁴⁸. Considerando un α de 0,05 y un poder estadístico de 80% como mínimo, para polimorfismos con frecuencia alélica $\geq 0,2$ y con riesgos genotípicos $\geq 1,5$, se estimó que el tamaño muestral necesario es de 250 casos y 250 controles⁴⁸.

Para la realización de la presente tesis de magister, considerando además la variable de tiempo de realización de esta, el diseño de estudio propuesto fue de caso-control donde se tomó un subgrupo de 95 casos y 95 controles pareados por sexo y edad, esto ya que el nivel de metilación global del ADN es diferente entre sexos y además cambia a través de la edad²⁰. Además, ambos grupos pertenecen al mismo nivel socio-económico.

6.2. Selección, reclutamiento y toma de muestra de pacientes y grupo control

Durante el 2017 y 2018 se reclutaron pacientes con FOFNS en diferentes centros de rehabilitación de hospitales de la región metropolitana: San Borja Arriarán, Roberto del Río, Exequiel González Cortés y la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Los controles fueron reclutados en la Clínica Odontológica de Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. De todos los individuos participantes se tomó una muestra de hisopado de mucosa oral. A todos los participantes de esta investigación (o a su representante legal en el caso de los menores de edad) se les informó sobre este estudio, los que aceptaron participar voluntariamente y firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité de Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexos 1, 2 y 3).

Para el grupo de casos, los criterios de inclusión para esta investigación fueron pacientes chilenos que tuvieran fisura orofacial en cualquiera de sus presentaciones clínicas: FL, FP y FLP uni o bilateral. Los criterios de exclusión usados fueron pacientes cuyas madres hayan estado expuestas durante su embarazo a alguno de los factores conocidos causantes de fisuras orofaciales (consumo de warfarinas, fentoina y alcohol), que al paciente se le haya diagnosticado algún síndrome u otra malformación mayor además de la fisura, diagnóstico realizado por un médico genetista y que el paciente sea extranjero o tenga padres y/o abuelos extranjeros.

Para el grupo de controles, los criterios de inclusión fueron personas chilenas sin fisura orofacial. El criterio de exclusión para este grupo fueron personas extranjeras o con padres y/o abuelos extranjeros y que tenga familiares con algún tipo de FOF (hasta en tercer grado).

Todas las muestras de hisopado de mucosa oral se enviaron al Biobanco de Tejidos de la Universidad de Chile (BTUCH), en donde se extrajo el ADN genómico y se almacenaron. Para la realización de esta tesis se solicitó la cantidad necesaria para la genotipificación y la cuantificación de metilación de ADN.

6.3. Cuantificación del porcentaje de metilación de LINE-1 en muestras de pacientes con fisuras orofaciales y grupo control

Para realizar la cuantificación del porcentaje de metilación de LINE-1 primero se sometieron las muestras de ADN genómico a un tratamiento con bisulfito, luego se amplificó un segmento del elemento repetitivo LINE-1 que contiene 4 puntos susceptibles de metilación y finalmente se cuantificaron estos mediante la tecnología de pirosecuenciación^{49, 50}.

6.3.1. Modificación con bisulfito de citosinas no metiladas

Se realizó la modificación con bisulfito de citosinas no metiladas con el kit Epiect Bisulfite de QIAGEN utilizando el protocolo para ADN de baja concentración disponiendo de 300 ng totales de ADN por cada muestra, siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante la modificación con bisulfito se realizó en el termociclador MiniAmp de Applied Biosystem^{48,51}. Finalmente el eluido de ADN fue guardado a -80°C ^{48,51}.

6.3.2. Protocolo de PCR para amplificar LINE-1

Para realizar la amplificación de la secuencia LINE-1 de estas muestras, se obtuvieron de la literatura tanto los partidores de PCR como el partidador de secuenciación²⁸ (Anexo 4). Estos se analizaron mediante el programa PyroMark Assay Design de QIAGEN⁵².

Para realizar la amplificación de un segmento de la secuencia LINE-1 se usó el kit de PCR KAPA2G Robust Hotstart de KAPA Biosystem siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante^{48, 53}.

Para realizar el PCR se usó el termociclador MiniAmp señalado anteriormente y se usó un protocolo que ya se encuentra probado y estandarizado para los partidores de LINE-1 descritos^{48, 53}.

6.3.3. Electroforesis en gel de agarosa

Para evaluar si existe el amplicón de LINE-1 con el peso esperado, se utilizó el método de electroforesis en gel de agarosa⁵⁴. Para esto se preparó un gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X con GelRed como colorante⁵⁵. Se dispuso 3 uL de ladder 50pb de Invitrogen y por cada muestra se preparó la solución a cargar con 5 uL de esta y 1 uL de buffer de carga Invitrogen. La fuente de poder de la cámara de electroforesis se configuró a 120V por 60 minutos.

Una vez finalizado el tiempo se observó el gel en una cámara BioDoc-It de UVP, esta cuenta con un compartimento con luz UV y en su parte superior tiene un sistema de documentación constituido por una computadora y una cámara digital donde se registró el resultado mediante fotografía⁵⁶.

Para que las muestras pudieran seguir al paso de pirosecuenciación debieron estar en el peso esperado, y su control positivo y negativo de corrida deben estar correctos, en caso contrario se repitió la amplificación.

6.3.4. Cuantificación mediante pirosecuenciación de puntos susceptibles de metilación en la secuencia LINE-1

Para realizar la pirosecuenciación de las muestras anteriormente señaladas se utilizó el equipo PyroMark Q96 de QIAGEN que se encuentra en el Laboratorio de Programación y Epigenética Perinatal, Centro de Investigaciones Médicas, Pontificia Universidad Católica. Se usaron los reactivos de la línea PyroMark Gold de QIAGEN y las microesferas de estreptavidina-sefarosa de General Electrics Healthcare, estos son los recomendados por el fabricante y se utilizó el protocolo ya estandarizado en este laboratorio^{48, 57}.

Antes de comenzar con el protocolo se precalentó el soporte para placa a 80°C en un bloque térmico⁴⁸.

Primero se inmovilizaron los productos de PCR con microesferas de estreptavidina-sefarosa, para ello se realizó una mezcla maestra suficiente para todas las muestras de PCR anteriores y un control de reactivo de pirosecuenciación por cada placa y se dispuso en una primera placa de PCR de 96 pocillos^{48, 57}. Se selló la parte superior de la placa de PCR y se agitó suavemente durante 15 minutos a temperatura ambiente^{48, 57}. Durante la incubación de la placa de PCR se

preparó la estación de trabajo al vacío según las recomendaciones del fabricante^{48, 57} (Anexo 5).

Luego se preparó una segunda solución donde se diluyó la cantidad suficiente de partidor de secuenciación LINE-1 10 uM en Buffer de Annealing QIAGEN para su uso posterior, este se homogeneizó y se dispuso en cada pocillo en una placa de PCR PyroMark Q96 HS siguiendo la misma disposición usada anteriormente^{48, 57}. Ambas placas se dispusieron en la estación de trabajo al vacío^{48, 57}. Posteriormente, se siguió con el protocolo recomendado por el fabricante para la estación de trabajo al vacío^{48, 57} (Anexo 6).

Posteriormente se puso la placa de PCR PyroMark Q96 HS en el soporte para placa precalentado en un bloque térmico a 80°C (señalado y precalentado previamente) y se incubó a esta temperatura durante 2 minutos^{48, 57}. Luego de esto, se retiró el soporte para placa con la placa PyroMark y se dejaron enfriar por al menos 5 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente^{48, 57}.

Por cada placa a pirosecuenciar se configuró una nueva corrida donde se seleccionó el código de cartridge PyroMark a usar y se señalaron las posiciones a analizar dispuestas anteriormente, añadiendo en cada pocillo el archivo de ensayo CpG (ya generado anteriormente y caracterizado en el Anexo 7) y añadiendo el nombre y características del pocillo correspondiente para facilitar el análisis posterior^{48, 58}. Una vez listo este archivo se guardó en la memoria del computador y se seleccionó "Pre Run Information" para obtener los volúmenes requeridos de enzima DNA polimerasa, sustrato y dNTPs de cada corrida en particular y se dispensó la cantidad indicada en cada una de las posiciones correspondientes^{48, 58}.

Una vez configurado el ensayo, se encendió el equipo PyroMark Q96 y se posicionó la placa PyroMark Q96 HS y el Cartridge PyroMark con el código seleccionado anteriormente en sus lugares correspondientes dentro del equipo, una vez terminado y cerrado el equipo, en el software se inició la corrida^{48, 58}. Una vez finalizado, se retornaron los datos generados y se exportaron los resultados completos de la corrida en un archivo PDF⁵⁸.

6.4. Genotipificación de genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TCN2* de pacientes con fisuras orofaciales y grupo control

Para obtener los genotipos de variantes de estos genes, las muestras de DNA genómico de pacientes con fisura orofacial y el grupo control se analizaron mediante un array de Illumina

que contiene más de 600.000 SNPs (Infinium iSelect 24x1 HTS BeadChip). Esto se llevó a cabo en el laboratorio ERAMUS MC, de la Universidad Erasmo de Rotterdam en Holanda. Luego se retornaron los datos obtenidos de estos y mediante el programa PLINK 1.9 se seleccionaron las variantes de los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TCN2* usando los siguientes criterios: SNPs en equilibrio de Hardy-Weinberg, frecuencia del alelo menor (MAF para su sigla en inglés) $>0,1$; y que no se encuentren en desequilibrio de ligamiento en base a un $r^2 > 0,8$ ⁵⁹.

6.5. Análisis estadístico

Para analizar los datos obtenidos primero se evaluó la presencia de normalidad en la distribución de los niveles de metilación, aplicando el test de Shapiro-Wilk³⁶. Luego, según el resultado obtenido, se evaluó la asociación con el fenotipo en base a la comparación de promedios entre casos y controles con la prueba de *t* de Student o, en su defecto, de medianas con prueba de U de Mann-Whitney³⁶. Para realizar el análisis de asociación entre el grado de metilación del LINE-1 y las variantes de los tres genes ya mencionados, primero se dividió la muestra en terciles según su porcentaje de metilación global del DNA, dejando como tercil de referencia aquel en que se agrupan los individuos con mayores niveles de metilación³⁶. Mediante una prueba de regresión logística se comparó la distribución de los genotipos de estos SNPs entre los terciles en casos y controles (test de interacción)³⁶. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete STATA v15³⁶.

7. RESULTADOS

7.1. OE1: Cuantificar el nivel de metilación de LINE-1 en pacientes chilenos con fisuras orofaciales no sindrómicas y en un grupo control.

Mediante pirosecuenciación, se obtuvo el porcentaje de metilación en 4 puntos susceptibles de ser metilados de la secuencia de LINE-1 en 204 muestras, las cuales correspondían a 95 controles y 109 casos. Esto permitió establecer una submuestra de 190 muestras (95 casos y 95 controles) pareadas tanto por sexo como edad. Las características de esta muestra se encuentran descritas en la Tabla 1. En la Tabla 1 se observan las características de número de individuos por cada grupo, en donde se encuentra la misma proporción de sexos y que el promedio de edad no presenta diferencias significativas. Además, se observan las características de tipo y lateralidad de fisura solo para el grupo de casos.

Tabla 1. Características por grupo de las 190 muestras óptimas para análisis.

Característica	Casos	Controles	Total
N	95	95	190
Edad	Rango = 0-18 años Promedio = 8.4 +/-3.5 años	Rango = 0-16 años Promedio = 7.9 +/-4.5 años	Rango = 0-18 años Promedio = 8.1 +/-4.1 años p = 0.611
Sexo	55 hombres 40 mujeres	55 hombres 40 mujeres	110 hombres 80 mujeres
Consumo de alcohol	Sí = 1 No = 94	Sí = 0 No = 95	Sí = 1 No = 189
Consumo de tabaco	Sí = 1 No = 94	Sí = 0 No = 95	Sí = 1 No = 189
Exposición a humo de tabaco	Sí = 12 No = 83	Sí = 14 No = 81	Sí = 26 No = 164
Tipo de fisura	FL/P= 77 pacientes FL= 21 pacientes FLP= 56 pacientes FP= 15 pacientes		
Lateralidad de Fisura (solo FL/P)	Unilateral= 56 pacientes Bilateral= 21 pacientes		

Cantidad de individuos por cada grupo, edad (rango de edad, promedio con desviación estándar a continuación y valor p obtenido comparando ambos grupos) y sexo para todas las muestras, mientras que se observan las características de tipo y lateralidad de fisura solo para el grupo de casos.

Todos los análisis se realizaron tanto para el grupo total de pacientes (denominado FOFNS) como para subgrupos según tipo de fisura: “Fisuras de labio con o sin paladar” (FL/P), que a su vez se subdividió en 2: “Fisura labial aislada” (FL) y “Fisura de labio con paladar” (FLP); y “Fisuras palatinas aisladas” (FP). Además, usando la sub base de FL/P se analizó la muestra por lateralidad (FL/P Unilaterales o FL/P Bilaterales). En todos estos subgrupos se consideró solo el control pareado por edad y por sexo con cada caso. Los resultados de metilación obtenidos para estos subgrupos se encuentran con mayor detalle en el Anexo 8.

7.2. OE2: Evaluar la asociación entre el nivel de metilación en LINE-1 y la aparición de fisuras orofaciales no sindrómicas en una población chilena.

A los valores de metilación de LINE-1 de casos y controles se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para cada punto por separado, así como también para el promedio de estas 4 mediciones. En resultado de esta prueba mostró que la mayoría de los datos obtenidos no distribuyen normal ($p < 0.05$, datos no mostrados), siendo este el caso para los datos obtenidos de los puntos susceptibles de metilación 1 (P1), 2 (P2), 3 (P3), 4 (P4) y promedio del conjunto de datos en general (FOFNS), para todos los datos de FL/P, FLP y FL/P Unilateral (P1, P2, P3, P4 y promedio de todos estos sub grupos), para el P1, P2 y P4 del subgrupo FL, para el P1 del subgrupo FP y el P2 del subgrupo de FL/P bilateral. Los conjuntos de datos que resultaron distribuir normal ($p > 0.05$, datos no mostrados) fueron P3 y promedio del subgrupo FL; P2, P3, P4 y promedio del subgrupo FP y P1, P3, P4 y promedio del subgrupo FL/P Bilateral.

En base a los resultados obtenidos, si el grupo de datos distribuía normal se realizó una prueba de t de Student para comparar promedios y en caso contrario, se realizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar medianas. Los resultados completos de este análisis se resumen en la Tabla 3 (promedio de los 4 puntos) y Anexo 8 (punto por punto). En Tabla 2 se observan los resultados y valor p obtenidos al comparar medianas o promedios de cada conjunto de datos. En los subgrupos FOFNS, FL/P FLP y FL/P Unilateral se aplicó el análisis de U de Mann-Whitney por lo que en las columnas “controles” y “casos” se puede observar la mediana obtenida y entre paréntesis el rango intercuartílico. Para los subgrupos FL, FP y FL/P Bilateral se encuentran los resultados obtenidos según el análisis de T de Student por lo que en las columnas de controles y casos se puede observar el dato de promedio obtenido en cada grupo y a continuación su desviación estándar. En este análisis se encontró una diferencia significativa en el promedio del grupo de fisuras palatinas aisladas donde se observa que los

controles (promedio = 64.32 +/-6.5) presentan mayor metilación en el promedio de los 4 puntos que los casos (promedio = 60.28 +/-6.4) ($p = 0.0486$).

Tabla 2. Asociación entre promedios de metilación de LINE-1 y FOFNS en Chile.

	Promedio		
	Controles	Casos	P
FOFNS ♦	62.13 (11.75)	61.38 (6.5)	0.2150
FL/P ♦	61.5 (11.13)	61.75 (6.5)	0.5317
FL ●	62.11 +/- 10.4	59.27 +/- 8	0.1578
FLP ♦	62.13 (11.5)	62.25 (6.25)	0.5718
FP ●	64.32 +/- 6.5	60.28 +/- 6.4	0.0486*
FL/P Unilateral ♦	62 (9.5)	62 (6.25)	0.4839
FL/P Bilateral ●	62.8 +/- 9.8	61.54 +/- 5.4	0.3050

Resultados y valor p obtenidos al comparar medianas o promedios de cada conjunto de datos. En los subgrupos que se aplicó el análisis de U de Mann Whitney se encuentran identificados con el símbolo ♦, en ellos se puede observar la mediana obtenida y entre paréntesis el rango intercuartílico y su valor p (P) obtenido. En los subgrupos donde se aplicó T de Student se encuentran identificados con ●, en ellos se puede observar el dato de promedio obtenido en cada grupo y a continuación su desviación estándar y valor p. Los valores p menores a 0.05 se encuentran marcados con un asterisco al final del valor (*).

Considerando la posibilidad de una asociación no lineal entre casos y controles, cada uno de estos grupos fue dividido en 3 terciles basados en la distribución de la metilación presente en el grupo de controles, resultando un grupo de menor metilación (T1) un grupo con metilación intermedia (T2) y un último grupo de metilación alta (T3). Con estos datos se realizó un estudio de regresión logística usando el T3 como referencia, cuyos resultados fueron además ajustados usando las co-variables sexo, edad y exposición a humo de tabaco. En los grupos de FOFNS, FL/P, FL y FL/P Unilateral se encontraron diferencias significativas en ambos modelos entre el tercil de mayor metilación y metilación intermedia, no así con el de baja metilación. en el grupo FP se observa una distribución distinta de los casos, concentrándose en el tercil de menor metilación, pero sin encontrar diferencias significativas entre estos. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Asociación entre niveles de metilación de LINE-1 distribuido en terciles y FOFNS en Chile.

	Tercil	Metilación (%)		N		No ajustado			Ajustado		
		Mín	Máx	Controles	Casos	OR	95% IC	P	OR	95% IC	P
FOFNS	T1	39	58	30	27	1.7	0.7 - 3.8	0.212	1.5	0.6 - 3.5	0.317
	T2	58.3	65.3	30	46	2.9	1.3 - 6.2	0.008*	2.7	1.2 - 5.9	0.014*
	T3	65.5	90.5	28	15	Referencia			Referencia		
FL/P	T1	39	57.8	24	19	1.4	0.5 - 3.4	0.507	1.3	0.5 - 3.2	0.595
	T2	58	65	24	41	3	1.2 - 7	0.016*	3.4	1.2 - 6.7	0.023*
	T3	65.5	90.5	24	12	Referencia			Referencia		
FL	T1	39	56.8	9	6	1.6	0.3 - 8.6	0.563	1.6	0.3 - 9.6	0.588
	T2	57	65	6	13	5.6	1 - 30.9	0.048*	7.1	1 - 47.2	0.041*
	T3	65.5	86.5	7	3	Referencia			Referencia		
FLP	T1	44	58	17	14	1.2	0.4 - 3.6	0.732	1.2	0.4 - 3.8	0.727
	T2	58.3	65.3	18	27	2.2	0.8 - 6	0.133	2.2	0.8 - 6.1	0.134
	T3	66.3	90.5	15	9	Referencia			Referencia		
FP	T1	48.8	62	5	10	3.3	0.6 - 20	0.187	3.5	0.5 - 22.8	0.196
	T2	62.5	66	5	2	0.7	0.1 - 5.9	0.715	0.4	0.1 - 4.5	0.459
	T3	68.5	78.5	5	3	Referencia			Referencia		
FL/P Unilateral	T1	39	58	17	15	2.1	0.8 - 5.6	0.136	1.9	0.7 - 5.5	0.197
	T2	58.3	65	16	27	2.7	1.1 - 6.8	0.033*	2.6	1 - 6.6	0.040*
	T3	65.3	90.5	16	7	Referencia			Referencia		
FL/P Bilateral	T1	47.8	56.5	7	4	1.5	0.5 - 4.7	0.515	1.4	0.4 - 4.3	0.663
	T2	57	69	7	16	2.9	0.9 - 9.1	0.069	2.8	0.9 - 9.4	0.087
	T3	69.3	81.8	7	1	Referencia			Referencia		

Resultados del análisis de regresión logística. Datos de rango de metilación (valor mínimo y máximo por grupo) y cantidad de casos y controles contenidos en cada tercil, además se encuentran los datos de odds ratio (OR), Intervalo de confianza del 95% (95% IC) y valor p (p) para los terciles 1 y 2 usando el tercil 3 como referencia, se presentan los valores obtenidos para el análisis sin ajustar y ajustando el modelo con las variables sexo, edad y exposición a humo de tabaco en cada grupo. Los valores p significativos se encuentran marcados con un asterisco (*) hacia el final del mismo.

7.3. OE3: Establecer el grado de asociación entre el genotipo de *MTHFR*, *SLC19A1* y *TCN2* involucrados en el metabolismo del folato/un-carbono con los niveles de metilación en pacientes chilenos con fisuras orofaciales y en un grupo control.

En cuanto a los datos obtenidos por el array Infinium iSelect 24x1 HTS BeadChip, se retornó información sobre 600.000 SNPs. Estos fueron filtrados mediante el uso de PLINK 1.9 seleccionando los SNPs que estuviesen solo en y cercanos (hasta 5 kb río arriba y río abajo) de los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TCN2* para aplicar los filtros descritos en la metodología. Estos filtros arrojaron 4 SNPs para *MTHFR*, 16 para *SLC19A1* y 7 para *TCN2*, que se encuentran contenidos en la Tabla 4.

Considerando los genotipos de estos SNPs, se realizó un análisis de interacción entre los niveles de metilación y el genotipo obtenido en base al alelo de menor frecuencia en cada SNPs. Este análisis no arrojó ninguna relación entre ninguno de los 27 SNPs con los resultados de metilación obtenidos en los distintos grupos (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de interacción entre niveles de metilación de LINE-1, riesgo de FOFNS y genotipo de variantes de *MTHFR*, *SLC19A1* y *TCN2*.

Gen	SNP	Alelo		Anotación	P						
		Mayor	Menor		FOFNS	FL/P	FL	FLP	FP	FL/P Unilateral	FL/P Bilateral
MTHFR	rs1476413	C	A	Intrón	0.3991	0.3245	0.4976	0.2591	0.2758	0.1865	0.8452
	rs1801131	T	C	Contrasentido p.Glu429Ala	0.4897	0.3314	0.2829	0.8026	0.5727	0.7373	0.3979
	rs1801133	C	T	Contrasentido p.Ala222Val	0.3685	0.3292	0.1809	0.9411	0.4647	0.1122	0.2565
	rs17367504	T	G	Intrón	0.6470	0.2232	0.7969	0.5032	0.2473	0.8528	0.1387
SLC19A1	rs9980525	G	A		0.3736	0.3960	0.6639	0.5740	0.9932	0.8817	0.1139
	rs7279445	T	C	Intrón	0.6358	0.2253	0.9961	0.4385	0.1020	0.5894	0.9478
	rs3753019	C	T	Intrón	0.7443	0.9949	0.2304	0.2813	0.5522	0.8087	0.7599
	rs2236483	T	C	Intrón	0.8284	0.2520	0.6669	0.3665	0.2113	0.7776	0.4669
	rs7278425	C	T	Intrón	0.6723	0.5843	0.6264	0.2085	0.9485	0.6119	0.1144
	rs7499	G	A	Exón no codificante	0.9777	0.3705	0.9133	0.3917	0.1909	0.7040	0.3096
	rs7867	G	A	Exón no codificante	0.5594	0.6908	0.9665	0.9523	0.2566	0.8602	0.6748
	rs3788189	T	G	Intrón	0.4853	0.8563	0.9731	0.9830	0.1766	0.8437	0.6777
	rs2838956	A	G	Intrón	0.4901	0.9270	0.8652	0.7326	0.4958	0.4315	0.6737
	rs4818789	A	G	Intrón	0.6239	0.5467	0.5846	0.1413	0.8626	0.3052	0.2445
	rs79091853	C	T	Sinónima p.Ala324Ala	0.8683	0.9584	0.5468	0.9274	0.9921	0.5292	0.8541
	rs12659	C	T	Sinónima p.Pro232Pro	0.4186	0.9816	0.8652	0.6883	0.3024	0.4931	0.9130
	rs914232	C	T	Intrón	0.1899	0.6777	0.8652	0.3601	0.2598	0.2298	0.9130
	rs1051266	C	A	Contrasentido p.His27Arg	0.2217	0.6734	0.8652	0.3536	0.3024	0.2298	0.9673
rs13050920	C	T	Intrón	0.4314	0.8197	0.9227	0.9834	0.1330	0.8526	0.6312	
rs3788205	C	T		0.8131	0.3116	0.9559	0.3253	0.7073	0.5474	0.7555	
TCN2	rs16988828	A	G	Intrón	0.9549	0.5868	0.9928	0.6040	0.4278	0.1928	0.9940
	rs9606756	A	G	Contrasentido p.Ile23Val	0.2054	0.3277	0.3889	0.3187	0.9559	0.4817	0.5622
	rs73396379	T	C	Intrón	0.8766	0.9745	0.8303	0.8212	0.5846	0.1803	0.9915
	rs5749135	C	T	Intrón	0.4985	0.9922	0.3106	0.7955	0.2444	0.7469	0.2866
	rs2283873	G	A	Intrón	0.8226	0.9141	0.8303	0.7549	0.5846	0.1837	0.9906
	rs4820888	A	G	Intrón	0.7442	0.6937	0.4913	0.6426	0.2444	0.5227	0.8712
	rs9306264	C	T		0.9860	0.9180	0.9518	0.8237	0.5846	0.3557	0.0652

Se observan los datos de SNPs analizados por cada gen, su alelo de referencia (mayor), su alelo de menor frecuencia (menor) y su anotación, también se observan los valores p (P) obtenidos para cada SNP señalado con cada grupo.

8. DISCUSIÓN

Los niveles de metilación del ADN se han asociado con la represión transcripcional debido a mayor compactación de la cromatina y se ha demostrado que su nivel óptimo es crítico para el desarrollo embrionario exitoso y en su defecto, la aparición de malformaciones congénitas. A su vez se ha demostrado que estas marcas epigenéticas son susceptibles de ser modificadas por factores ambientales como la alimentación, entre ellos la ingesta de folatos^{12, 15, 20}. Es por ello que en la presente tesis se estudió si los pacientes chilenos con FOFNS tienen niveles bajos de metilación global del ADN en comparación con individuos no afectados, y si esto dependía de la presencia de genotipos específicos de los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TCN2* que participan de la ruta metabólica del folato/un carbono.

La primera parte de la presente tesis se enfocó en evaluar si existía una asociación entre los niveles de metilación en LINE-1, usándolo como un biomarcador de metilación global del ADN, y la aparición de fisuras orofaciales no sindrómicas en una población chilena. En las pruebas de comparación de medianas y promedios en general sólo se observa una diferencia que bordea la significancia estadística de los promedios de casos con fisura palatina aislada en comparación a su respectivo grupo control, los que sólo representan alrededor de un 16% de la muestra total. Para los demás grupos no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, sin despreciar estos resultados se puede apreciar una tendencia clara donde existe una menor metilación en general en casos comparados con los controles, donde existen resultados que podrían cambiar al aumentar el tamaño muestral, tal como el caso del punto 4 en FP ($p= 0.07$, ver Anexo 8).

Estos resultados no coinciden con lo reportado anteriormente por Li et al., quienes estudiaron a través de un array de metilación el elemento LINE-1 de ADN de leucocitos en población china de no más de 6 meses de edad⁶⁰. Sus resultados muestran que existe una mayor metilación en los pacientes afectados con FL/P no sindrómica que en el grupo control⁶⁰.

La medición de diversos elementos en sangre se considera ampliamente como una buena aproximación a los niveles presentes en otros tejidos⁶¹. Sin embargo, el uso del tejido específico relacionado con un rasgo sería más útil en el caso de defectos del desarrollo. Por ejemplo, en defectos cierre del tubo neural, en mortinatos humanos el patrón de metilación de LINE-1 en tejidos provenientes de las tres capas embrionarias, solo demostró una asociación significativa entre la hipometilación de este transposón y tejido proveniente del cerebro, mas no en otros tejidos⁶¹. En el caso de las fisuras orofaciales, al comparar la metilación en sangre

versus tejidos orales, se concluye que la sangre revelaría los cambios epigenéticos ocurridos desde el nacimiento y no así la metilación en tejidos orales⁶².

Los niveles de metilación en LINE-1 se han usado ampliamente como un indicador de la metilación global del ADN, especialmente en estudios de cáncer²⁶. Sin embargo, el perfil de metilación presente en una población no será la misma presente en otra, ya que es susceptible al ambiente²⁰. Recientemente se han visto que los niveles de metilación de LINE-1 varían enormemente por la dieta de la población en estudio²⁷. En mujeres italianas se ha asociado el comer legumbres, verduras, pescado, pan centeno entre otros alimentos saludables (ricos en folatos) con una mayor metilación natural en LINE-1²⁷. Además, estos niveles pueden variar por otros factores tales como tejido de origen, edad o sexo²⁰.

Otro punto importante a considerar es el uso de un array para la medición de metilación. Se ha estudiado que las distintas técnicas para medir metilación presentan un margen de error de medición muy amplio, siendo el de menor error la pirosecuenciación frente a los demás, con un error de medición analizado entre réplicas técnicas de un 1%^{28, 49}.

Es por estas razones que en el momento de comparar nuestros resultados con los obtenidos por Li et al.⁶¹ en China, se debe considerar el origen del tejido, población y metodología como un factor importante.

En un estudio piloto realizado por Millacura et al., donde se realizó medición de 5-metil-citosina total por ELISA en leucocitos de 20 pacientes con FOFNS y en 20 individuos sanos de la población chilena, se encontró que los casos presentaban en promedio menor cantidad de 5-metil-citosina que el grupo control⁶². Estos resultados difieren de los nuestros en la misma población, lo que podría explicarse por la técnica utilizada, el tamaño muestral y/o el origen del tejido en que se realizó la medición.

El posible rol de LINE-1 no se ha estudiado en FOFNS, sin embargo, se han realizado estudios en líneas celulares de cáncer y otras patologías que han dado evidencias de cuál sería su mecanismo para efectuar finalmente un fenotipo patológico²⁶. Se ha evidenciado que su metilación pudiera influir en la expresión de otros genes ya sea facilitando una inestabilidad cromosómica debido a la retrotransposición de este elemento a través del genoma o regulando la expresión de otros genes²⁶. Esto se ejemplifica con el primer caso reportado donde LINE-1 pudo haber tenido influencia⁶³. En 1988 se reportó el caso de un paciente con hemofilia A que no tenía antecedentes familiares de esta patología, Kazazian et al. encontraron una inserción

de LINE-1 en el gen que codifica para el Factor VIII en el cromosoma X⁶³. Desde este hallazgo se han encontrado inserciones *de novo* de LINE-1 en pacientes con distintas patologías como la talasemia, distrofias musculares, fibrosis quística y ampliamente en líneas celulares de cáncer²⁶. En el caso de las malformaciones congénitas se plantea que en el momento en que el genoma se demetila en una etapa temprana puede ser que la hipometilación de LINE-1 reactive algunas copias y aumente la tasa de retrotansposición en ese momento, generando inserciones *de novo* de este elemento en otras regiones aleatoriamente, afectando el desarrollo embrionario posterior, estas inserciones son heredables tanto en la división celular como de padres a hijos²⁶.

Además, existen estudios que dan cuenta del posible efecto de LINE-1 en la regulación de otros genes. Respecto de este aspecto, relacionado con el retraso del crecimiento intrauterino en los fetos, existe un estudio que concluyó que, en un modelo murino, el dar menor cantidad de folatos a la madre hacía desbalancear el metabolismo de folato/un-carbono y esto conducía a la hipometilación de LINE-1 aumentando la actividad de retrotransposición de esta y conduciendo así al retraso del crecimiento⁶⁴. En genes asociados a trastornos de espectro autista, existe evidencia de la relación entre la inserción de LINE-1 y bajo desarrollo de lenguaje (fenotipo severo) y su hipometilación se asocia con desregulación en los niveles de transcritos de estos⁶⁵. En estudios sobre leucemia linfocítica crónica se observan hallazgos similares, donde la hipometilación de LINE-1 y Alu se asociaron a desregulación de genes cercanos a estos transposones y que estaban asociados a esta patología⁶⁶. Otros estudios sobre el desarrollo temprano de cáncer apuntan al posible rol de la retro transcriptasa codificada por LINE-1 como modular de la expresión de otros genes a través de su unión a miARNs⁶⁷. Además, existe evidencia que la activación de LINE-1 es crucial en el embrión temprano ya que regula la accesibilidad de la cromatina⁶⁸.

Si bien no existen estudios que comprueben esta hipótesis en FOFNS, como se mencionó anteriormente, se ha visto que la metilación de LINE-1 se encuentra afectada por el consumo de ciertos alimentos ricos en folatos²⁷. También se han realizado estudios en líneas de ratones susceptibles naturalmente a tener FOFNS, inducidos mediante agentes externos a esta malformación y modificados genéticamente para este fenotipo, que el consumo de folatos disminuye el riesgo de fisuras orofaciales y además la severidad de las fisuras presentadas^{14, 69, 70}. Es por estos antecedentes, y también sumado el hecho de que los pacientes con FOFNS presentan mayor riesgo a tener ciertos tipos de cáncer como el colorrectal, que la hipótesis

antes planteada puede ser aplicable en este caso, pero se necesitan mayores estudios para comprobarla.

Considerando la posibilidad de una asociación no lineal, se realizó un estudio de regresión logística. Al dividir la muestra total en terciles (basado en el promedio de metilación de los 4 puntos del grupo control) (Tabla 4), se puede ver que teniendo el grupo de mayor metilación como referencia (T3), se aprecian diferencias con el grupo de metilación intermedia (T2), mas no con el grupo de menor metilación (T1), cuando lo esperado era que se observara mayor diferencia entre los terciles extremos. Estos resultados fueron los obtenidos para el total de la muestra y para los casos de FL/P, FL y FL/P Unilateral, no así para el grupo de FLP, FP y FL/P Bilateral. Este comportamiento puede deberse a que el grupo de fisuras labiales con o sin paladar concentró la mayoría de los casos enrolados en este estudio, a diferencia de las fisuras palatinas aisladas. Si bien no existen resultados como este reportados hasta la fecha en la literatura para FOFNS, si hay evidencias parecidas a esta en casos de tetralogía de Fallot, una malformación congénita del corazón⁷¹.

Es importante recalcar que estos resultados se ajustaron por sexo, edad y exposición al humo de tabaco, a pesar de estar pareadas estas variables, este ajuste toma sentido al observar el amplio rango de edad de los individuos incluidos en esta investigación. Además, cobra aún más importancia debido a que la metilación es dependiente de factores ambientales, por lo que es específica según diversas variables, entre ellas el sexo, edad y exposición al humo de tabaco del individuo²⁰. Al realizar este ajuste no influyó en los resultados que ya salieron significativos en el modelo sin ajustar, por lo que se concluye que estos resultados son independientes de las variables de sexo, edad y exposición al humo de tabaco por parte del individuo.

Un estudio analizó los patrones de metilación de pacientes con FOFNS con datos disponibles públicamente, el análisis bioinformático arrojó la detección de 814 sitios con metilación alterada y que están relacionados con el desarrollo de FOFNS, de estos 178 estaban hipermetilados y 636 estaban hipometilados⁷².

La asociación no lineal entre la metilación de LINE-1 y FOFNS podría explicarse por recientes evidencias que han mostrado que, a pesar que la metilación de citosinas ubicadas en el promotor está relacionada a represión transcripcional, si esta metilación se encuentra en el cuerpo del gen puede estar estimulando la elongación transcripcional⁷³. Esto podría explicar

que no necesariamente los niveles altos o bajos de metilación implican un aumento de riesgo para la expresión de este fenotipo.

Con respecto al desarrollo de las estructuras craneofaciales este está fuertemente regulado por componentes genéticos, sin embargo, estos son susceptibles a factores ambientales como las modificaciones epigenéticas⁷⁴. Hacia la tercera semana de gestación en los humanos la porción craneal de las células de la cresta neural migra hacia la zona ventral para conformar la prominencia frontonasal y los dos primeros arcos faríngeos⁷⁵. En esta etapa existen estudios sobre metilación del ADN donde la actividad de *DNMT3b* en células embrionarias es fundamental para la expresión de genes específicos de la cresta neural y el control de su migración⁷⁶. También se ha estudiado que la metilación de los promotores de *PAX7* y *TWIST* es fundamental para la diferenciación osteogénica de las células derivadas de la cresta neural⁷⁷.

Si bien en la formación del labio superior no existe evidencia sobre la influencia de la metilación del ADN en este proceso, existen modelos animales donde se ha estudiado este aspecto en la aparición de la fisura palatina^{78, 79}. En modelos murinos se ha visto que la expresión de *TGFβ3* y la metilación de su promotor es crucial para la formación de esta malformación⁷⁸. a nivel de metilación general se ha identificado que más de 5500 regiones genómicas están metiladas durante la formación del paladar murino y solo el 74% se encuentra metilado a lo largo de todo este proceso⁷⁹.

Khan, et al. Propone como una explicación a sus resultados que las diferencias de metilación encontradas en FOFNS pueden deberse a que las estructuras que darán forma al labio y paladar no cierran a la misma vez, si no que requieren tiempo²⁸. Un estudio analizando el transcriptoma de restos de los procesos que darán forma a la cara de embriones de ratón, concluyo que el primer componente que explicaba la diferente expresión de los genes involucrados era el origen de la capa embrionaria y el segundo el tiempo, esta evidencia apoyaría la hipótesis anterior⁸⁰. Los resultados obtenidos en esta tesis también señalan una diferencia en la metilación de FL/P y FP, siendo solo esta última significativa en comparación al grupo control, estos resultados son compatibles con la hipótesis planteada por Khan, et al.

La segunda parte de esta tesis se enfocó en realizar un estudio de interacción para evaluar la relación entre el genotipo de variantes de los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TCN2* que participan del metabolismo del folato, sobre la metilación de LINE-1 y el riesgo de presentar el fenotipo.

Este estudio no arrojó ninguna relación entre esas variantes y los niveles de metilación de LINE-1.

En el presente estudio se seleccionaron 27 SNPs de 3 genes relacionados al metabolismo del folato/un carbono, conocido por su rol importante en la metilación del ADN, dentro de los 27 SNPs analizados solo 6 tienen efecto en exones codificantes y de estos solo 4 presentan un cambio de aminoácido en la proteína codificada. En *MTHFR* los SNPs rs1801131 (A1298C) y rs1801133 (C677T) han sido ampliamente estudiados en cuanto a su influencia en la metilación del ADN¹³. La variante C677T produce una proteína hipofuncional y termolábil que ha sido asociada a diversas patologías, su variante mutada se ha relacionado con niveles bajos de folato en plasma y mayores niveles de homocisteína en sangre, la variante A1298C se ha asociado solo en conjunto con C677T con menor actividad enzimática de la proteína *mthfr*¹³.

La proteína codificada por *SLC19A1* no participa directamente en el metabolismo un carbono, sin embargo, si permite su entrada a las células. El SNP rs1051266 (G80A) se ha asociado a menor absorción de folatos en las células y mayores niveles de homocisteína en sangre¹³. Por último, la variante de *TCN2* rs9606756 (A67G) se ha asociado anteriormente con la hipometilación de LINE-1 en población sana y en un estudio de infartos cerebrales recurrentes en población joven, se vio su asociación con niveles de homocisteína altos en plasma además de una asociación con un menor nivel del complejo holotranscobalamina^{35, 81}. Por último, la variante de *TCN2* rs9606756 (A67G) se ha asociado anteriormente con la hipometilación de LINE-1 en población sana y en un estudio de infartos cerebrales recurrentes en población joven, se vio su asociación con niveles de homocisteína altos en plasma además de una asociación con un menor nivel del complejo holotranscobalamina.

Marshall estudió el poder estadístico necesario para los análisis de interacción, entre ellos el tipo multiplicativo que se ha evaluado en la presente investigación, donde se evidencia que es necesario un tamaño muestral mucho mayor al necesario que cuando se analiza cada factor por sí solo⁸². El autor plantea que en la gran mayoría de las investigaciones se calcula el n muestral necesario usando test que analizan un factor a la vez, sin embargo, este n muestral no es suficiente para un estudio de interacción. Según sus resultados, comparando un tamaño muestral acotado cercano al de la presente tesis (75 controles y 130 casos) el poder estadístico de este test va de un 5% a un 20%, siendo el tamaño muestral ideal de más de 1200 casos y 2400 controles⁸². Es por ello que creemos que debido al tamaño muestral reducido de esta tesis el test de interacción no alcanzó el poder estadístico necesario para poder establecer una

diferencia significativa para ninguno de los SNPs, por lo que se deben realizar estudios posteriores con un N mayor. En este contexto es que, por ejemplo, el SNP de *TCN2* rs9306264 en FL/P bilateral ($p = 0.0652$) podría tener un efecto susceptible de ser confirmado con un aumento del tamaño muestral.

Es necesario considerar finalmente que este estudio presentó ciertas limitaciones como el tamaño muestral modesto, que no alcanzó el poder estadístico necesario para los test de análisis de un factor (T de Student o U de Mann Whitney) y test de interacción. Otro factor puede ser el rango de edad amplio de los individuos enrolados por lo que el perfil de metilación necesariamente variará desde el momento del nacimiento hasta el punto en que estos fueron incluidos en el estudio, lo que tiene también relación con factores ambientales no evaluados.

Por otra parte, este estudio presenta ciertas fortalezas, como el diseño del modelo de estudio caso-control pareado por variables confundentes como edad y sexo. Otra fortaleza es que las mediciones de metilación de LINE -1 se realizaron por conversión con bisulfito de citosinas no metiladas acoplado a medición por pirosecuenciación que se considera uno de los mejores métodos con menor error de medición en esta área. Además, es importante destacar que la medición en ADN extraído de mucosa oral, por su cercanía en origen embrionario con los tejidos afectados en la FOFs. En este contexto, un estudio previo midió la metilación de distintos sitios CpG en sangre y tejidos orales de diferentes subtipos de FOFs, reportando una mayor correlación con los tejidos más cercanos que con la sangre⁶².

Por lo descrito anteriormente, se encontró una asociación no lineal entre la metilación de LINE-1 y el riesgo de FOFNS. Sin embargo, este resultado no se ve influenciado por el genotipo presente en *MTHFR*, *SLC19A1* o *TCN2* del paciente.

9. CONCLUSIÓN

El objetivo de este estudio fue evaluar si existía una relación entre el nivel de metilación de los elementos LINE-1 en DNA extraído de mucosa oral y el riesgo de fisuras orofaciales no sindrómicas en Chile, considerando además el efecto de variantes de los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TCN2*.

Si bien las pruebas para evaluar diferencias de promedios y medianas entre los casos y controles sólo arrojaron diferencias entre los controles y casos de fisuras palatinas (que comprenden alrededor del 16% de la muestra total) más no en los otros grupos, el análisis estratificado por terciles muestra un incremento del riesgo de FOFNS para el grupo medianamente metilado versus el grupo altamente metilado.

En cuanto al análisis de interacción considerando los promedios de metilación obtenidos con el genotipo del individuo, este no arrojó resultados significativos, por lo cual no se observa una relación entre ambos parámetros. Sin embargo, considerando el resultado de algunos SNPs en particular que bordean la significancia, esto puede deberse al tamaño muestral pequeño y debe repetirse el estudio aumentando el tamaño de la muestra en el futuro.

10. REFERENCIAS

1. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC (2011) Cleft lip and palate: Understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet* 12:167–178.
2. Watkins SE, Meyer RE, Strauss RP, Aylsworth AS (2014) Classification, Epidemiology, and Genetics of Orofacial Clefts. *Clin Plast Surg* 41:149–163.
3. Rivera CA, Arenas MJ (2014) Bases ambientales y genéticas de las fisuras orofaciales: Revisión. *J Oral Res* 2:35–41.
4. Ministerio de Salud Pública de Chile (2015) Guía Clínica AUGE: Fisura Labiopalatina.
5. Montenegro MA, Rojas M (2005) Aspectos Moleculares en la Formación de la Cara y del Paladar. *Int J Morphol* 23:185–194.
6. Mossey P (2007) Epidemiology underpinning research in the aetiology of orofacial clefts. *Orthod Craniofac Res* 10:114-120.
7. IPDTC Working Group (2011) Prevalence at birth of cleft lip with or without cleft palate. Data from the International Perinatal Database of Typical Oral Clefts (IPDTC). *Cleft Palate Craniofacial J* 38:66-81.
8. Shkoukani MA, Chen M, Vong A (2013) Cleft Lip – A Comprehensive Review. *Front Pediatr* 1:53.
9. Kawalec A, Nelke K, Pawlas K, Gerber H (2015) Risk factors involved in orofacial cleft predisposition - Review. *Open Med* 10:163–175.
10. Imbard A, Benoist JF, Blom HJ (2013) Neural tube defects, folic acid and methylation. *Int J Environ Res Public Health* 10:4352–4389.
11. Li K, Wahlqvist ML, Li D (2016) Nutrition, one-carbon metabolism and neural tube defects: A review. *Nutrients* 8:741.
12. Mentch SJ, Locasale JW (2016) One-carbon metabolism and epigenetics: Understanding the specificity. *Ann N Y Acad Sci* 1363:91–98.
13. Xu J, Sinclair KD (2015) One-carbon metabolism and epigenetic regulation of embryo development. *Reprod Fertil Dev* 27:667–676.

14. López-Gordillo Y, Maldonado E, Nogales L, del Río A, Barrio MC, Murillo J, Martínez-Sanz E, Paradas-Lara I, Alonso MI, Partearroyo T, Martínez-Álvarez C (2019) Maternal folic acid supplementation reduces the severity of cleft palate in Tgf- β 3 null mutant mice. *Pediatr Res* 85:566-573.
15. Maierhofer A, Flunkert J, Dittrich M, Müller T, Schindler D, Nanda I, Haaf T (2017) Analysis of global DNA methylation changes in primary human fibroblasts in the early phase following X-ray irradiation. *PLoS One* 12:e0177442.
16. Ehrlich KC, Paterson HL, Lacey M, Ehrlich M (2016) DNA hypomethylation in intragenic and intergenic enhancer chromatin of muscle-specific genes usually correlates with their expression. *Yale J Biol Med* 89:441–455.
17. Delgado-Cruzata L, Zhang W, McDonald JA, Tsai WY, Valdovinos C, Falci L, Wang Q, Crew KD, Santella RM, Hershman DL, Greenlee H (2015) Dietary Modifications, Weight Loss, and Changes in Metabolic Markers Affect Global DNA Methylation in Hispanic, African American, and Afro-Caribbean Breast Cancer Survivors. *J Nutr* 145:783–790.
18. Delgado-Cruzata L, Vin-Raviv N, Tehranifar P, Flom J, Reynolds D, Gonzalez K, Santella RM, Terry MB (2014) Correlations in global DNA methylation measures in peripheral blood mononuclear cells and granulocytes. *Epigenetics* 9:1504–1510.
19. Knothe C, Shiratori H, Resch E, Ultsch A, Geisslinger G, Doehring A, Lötsch J (2016) Disagreement between two common biomarkers of global DNA methylation. *Clin Epigenetics* 8:60.
20. Jones MJ, Goodman SJ, Kobor MS (2015) DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell* 14:924–932.
21. Chen C-P, Chang S-Y, Huang M-C, Chern S-R, Chen S-W, Lai S-T, Chuang T-Y, Wang W (2018) Detection of hypomethylation of H19 in a pregnancy with limb-body wall complex. *Taiwan J Obstet Gynecol* 57:769–771.
22. Zhang H, Guo Y, Gu H, Wei X, Ma W, Liu D, Yu K, Luo W, Ma L, Liu Y, Xue J, Huang J, Wang Y, Jia S, Dong N, Wang H, Yuan Z (2019) TRIM4 is associated with neural tube defects based on genome-wide DNA methylation analysis. *Clin Epigenetics* 11:17.
23. Li C, Fan Y, Li G, Xu X, Duan J, Li R, Kang X, Ma X, Chen X, Ke Y, Yan J, Lian Y, Liu

- P, Zhao Y, Zhao H, Chen Y, Yu Y, Liu J (2018) DNA methylation reprogramming of functional elements during mammalian embryonic development. *Cell Discov* 4:41.
24. Ardeljan D, Taylor MS, Ting DT, Burns KH (2018) The human LINE-1 retrotransposon: an emerging biomarker of neoplasia. *Clin Chem* 63:816–822.
 25. Sultana T, van Essen D, Siol O, Bailly-Bechet M, Philippe C, Zine El Aabidine A, Pioger L, Nigumann P, Sacconi S, Andrau JC, Gilbert N, Cristofari G (2019) The Landscape of L1 Retrotransposons in the Human Genome Is Shaped by Pre-insertion Sequence Biases and Post-insertion Selection. *Mol Cell* 74:555-570.
 26. Suarez NA, Macia A (2017) LINE-1 Retrotransposons in Healthy and Diseased Human Brain. *Dev Neurobiol* 78:434-455.
 27. Barchitta M, Maugeri A, Magnano R, Lio S, Favara G, Clara M, Rosa L, la Mastra C, Quattrocchi A, Agodi A (2019) Dietary Patterns are Associated with Leukocyte LINE-1 Methylation in Women: A Cross-Sectional Study in Southern Italy. *Nutrients* 11:1843.
 28. Khan MFJ, Little J, Mossey PA, Steegers-Theunissen RPM, Autelitano L, Lombardo I, Andreasi RB, Rubini M (2018) Evaluating LINE-1 methylation in cleft lip tissues and its association with early pregnancy exposures. *Epigenomics* 10:105–113.
 29. Bhaskar LVKS, Murthy J, Venkatesh Babu G (2011) Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and orofacial clefts. *Arch Oral Biol* 56:723–737.
 30. Franke B, Vermeulen SHHM, Steegers-Theunissen RPM, Coenen MJ, Schijvenaars MMVAP, Scheffer H, Den Heijer M, Blom HJ (2009) An association study of 45 folate-related genes in spina bifida: Involvement of Cubilin (CUBN) and tRNA Aspartic Acid Methyltransferase 1 (TRDMT1). *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 85:216–226.
 31. Blanton SH, Henry RR, Yuan Q, Mulliken JB, Stal S, Finnell RH, Hecht JT (2011) Folate pathway and nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 91:50–60.
 32. Duncan TM, Reed MC, Frederik Nijhou H (2013) A population model of folate-mediated one-carbon metabolism. *Nutrients* 5:2457–2474.
 33. Cheng TYD, Makar KW, Neuhouser ML, Miller JW, Song X, Brown EC, Beresford SAA, Zheng Y, Poole EM, Galbraith RL, Duggan DJ, Habermann N, Bailey LB, Maneval DR,

- Caudill MA, Toriola AT, Green R, Ulrich CM (2015) Folate-mediated one-carbon metabolism genes and interactions with nutritional factors on colorectal cancer risk: Women's Health Initiative Observational Study. *Cancer* 121:3684–3691.
34. Peng L, Dreumont N, Coelho D, Guéant J, Arnold C (2016) Genetic animal models to decipher the pathogenic effects of vitamin B12 and folate deficiency. *Biochimie* 126:43-51.
35. Tajuddin SM, Amaral AFS, Fernández AF, Rodríguez-Rodero S, Rodríguez RM, Moore LE, Tardón A, Carrato A, García-Closas M, Silverman DT, Jackson BP, García-Closas R, Cook AL, Cantor KP, Chanock S, Kogevinas M, Rothman N, Real FX, Fraga MF, Malats N (2013) Genetic and Non-genetic Predictors of LINE-1 Methylation in Leukocyte DNA. *Environ Health Perspect* 121:650–656.
36. Tajuddin SM, Amaral AFS, Fernández AF, Chanock S, Silverman DT, Tardón A, Carrato A, García-Closas M, Jackson BP, Toraño EG, Márquez M, Urdinguio RG, García-Closas R, Rothman N, Kogevinas M, Real FX, Fraga MF, Malats N (2014) LINE-1 methylation in leukocyte DNA, interaction with phosphatidylethanolamine N-methyltransferase variants and bladder cancer risk. *Br J Cancer* 110:2123–2130.
37. Wang X, Zhou Y, Zhang M, Wang Y, Qin B (2019) The methylenetetrahydrofolate reductase genotype 677CT and non-alcoholic fatty liver disease have a synergistic effect on the increasing homocysteine levels in subjects from Chongqing, China. *Genes Dis* 6:88–95.
38. Caldeira-Araújo H, Ramos R, Florindo C, Rivera I, Castro R, Tavares de Almeida I (2019) Homocysteine Metabolism in Children and Adolescents: Influence of Age on Plasma Biomarkers and Correspondent Genotype Interactions. *Nutrients* 11:646.
39. Hiraoka M, Kagawa Y (2017) Genetic polymorphisms and folate status. *Congenit Anom (Kyoto)* 57:142–149.
40. Parmeggiani F, Gallenga CE, Costagliola C, Semeraro F, Romano MR, Dell'Omo R, Russo A, De Nadai K, Gemmati D, D'Angelo S, Bolletta E, Sorrentino FS (2019) Impact of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on the efficacy of photodynamic therapy in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Sci Rep* 9:2614.

41. Ramírez-Chau C, Blanco R, Colombo A, Pardo R, Suazo J (2016) MTHFR c.677C>T is a risk factor for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in Chile. *Oral Dis* 22:703–708.
42. Stanisławska-Sachadyn A, Borzyszkowska J, Krzemiński M, Janowicz A, Dziadziuszko R, Jassem J, Rzyman W, Limon J (2019) Folate/homocysteine metabolism and lung cancer risk among smokers. *PLoS One* 14:e0214462.
43. López-Camelo JS, Castilla EE, Orioli IM, INAGEMP, ECLAMC (2010) Folic acid flour fortification: Impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries. *Am J Med Genet A* 152A:2444–2458.
44. Lopez-Camelo JS, Orioli IM, Da Grace Dutra M, Nazer-Herrera J, Rivera N, Ojeda ME, Canessa A, Wettig E, Fontannaz AM, Mellado C, Castilla EE (2005) Reduction of birth prevalence rates of neural tube defects after folic acid fortification in Chile. *Am J Med Genet A* 135:120–125.
45. Badovinac RL, Werler MM, Williams PL, Kelsey KT, Hayes C (2007) Folic acid-containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: A meta-analysis. *Birth Defects Res A - Clin Mol Teratol* 79:8–15.
46. Johnson CY, Little J (2008) Folate intake, markers of folate status and oral clefts: Is the evidence converging?. *Int J Epidemiol* 37:1041–1058.
47. Nazer J, Cifuentes L, Aguila A, Juárez ME, Cid MP, Godoy ML, García K, Melibosky F (2007) Efecto de la fortificación de la harina con ácido fólico sobre la evolución de las tasas de prevalencia al nacimiento de malformaciones congénitas en los hospitales chilenos del ECLAMC. *Rev Med Chil* 135:198–204.
48. Suazo J (2017) Nonsyndromic orofacial clefts in Chile: the role of parental biomarkers of folate/one-carbon metabolism.
49. Clark SJ, Statham A, Stirzaker C, Molloy PL, Frommer M (2006) DNA methylation: Bisulphite modification and analysis. *Nat Protoc* 1:2353–2364
50. Paz AA, Arenas GA, Castillo-Galán S, Peñaloza E, Cáceres-Rojas G, Suazo J, Herrera EA, Krause BJ (2019) Premature vascular aging in guinea pigs affected by fetal growth restriction. *Int J Mol Sci* 20:3474.

51. QIAGEN (2012) EpiTect Bisulfite Handbook.
52. QIAGEN (2013) PyroMark Assay Design SW 2.0 Quick-start guide.
53. KAPA Biosystems (2014) KAPA2G Robust HotStart PCR Kit.
54. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH (2012) Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J Vis Exp* :e3923.
55. Huang Q, Baum L, Fu WL (2010) Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis. *Clin Lab* 56:149-152.
56. Ultra-Violet Products Limited BioDoc-It™ and VisiDoc-It™ Gel Documentation Systems - Operating Instructions.
57. QIAGEN (2010) PyroMark Q96 CpG LINE-1 Handbook.
58. QIAGEN (2011) PyroMark Q96 Software User Guide.
59. Anderson CA, Pettersson FH, Clarke GM, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT (2010) Data quality control in genetic case-control association studies. *Nat Protoc* 5:1564–1573
60. Li Y, Deng Y, Deng C, Xie L, Yu L, Yuan Y, Liu H, Dai L (2019) Association of long interspersed nucleotide element - 1 and interferon regulatory factor 6 methylation changes with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Oral Dis* 25:215–222.
61. Wang L, Chang S, Guan J, Shanguan S, Lu X, Wang Z, Wu L, Zou J, Zhao H, Bao Y, Qiu Z, Niu B, Zhang T (2015) Tissue-Specific Methylation of Long Interspersed Nucleotide Element-1 of Homo Sapiens (L1Hs) During Human Embryogenesis and Roles in Neural Tube Defects. *Curr Mol Med* 15:497–507.
62. Sharp GC, Ho K, Davies A, Stergiakouli E, Humphries K, McArdle W, Sandy J, Davey Smith G, Lewis SJ, Relton CL (2017) Distinct DNA methylation profiles in subtypes of orofacial cleft. *Clin Epigenetics* 9:63
63. Kazazian HH, Wong C, Youssoufian H, Scott AF, Phillips DG, Antonarakis SE (1988) Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature* 332:164-166.
64. Li B, Chang S, Liu C, Zhang M, Zhang L, Liang L, Li R, Wang X, Qin C, Zhang T, Niu B,

- Wang L (2019) Low maternal dietary folate alters retrotranspose by methylation regulation in intrauterine growth retardation (IUGR) fetuses in a mouse model. *Med Sci Monit* 25:3354–3365.
65. Tangsuwansri C, Saeliw T, Thongkorn S, Chonchaiya W, Suphapeetiporn K, Mutirangura A, Tencomnao T, Hu VW, Sarachana T (2018) Investigation of epigenetic regulatory networks associated with autism spectrum disorder (ASD) by integrated global LINE-1 methylation and gene expression profiling analyses. *PLoS One* 13:e0201071.
 66. Barrow TM, Wong Doo N, Milne RL, Giles GG, Willmore E, Strathdee G, Byun HM (2020) Analysis of retrotransposon subfamily DNA methylation reveals novel early epigenetic changes in chronic lymphocytic leukaemia. *Haematologica*.
 67. Sciamanna I, Gualtieri A, Piazza PV, Spadafora C (2014) Regulatory roles of LINE-1-encoded reverse transcriptase in cancer onset and progression. *Oncotarget* 5:8039–8051.
 68. Jachowicz JW, Bing X, Pontabry J, Bošković A, Rando OJ, Torres-Padilla ME (2017) LINE-1 activation after fertilization regulates global chromatin accessibility in the early mouse embryo. *Nat Genet* 49:1502–1510.
 69. Yao Z, Chen D, Wang A, Ding X, Liu Z, Ling L, He Q, Zhao T (2011) Folic acid rescue of ATRA-induced cleft palate by restoring the TGF- β signal and inhibiting apoptosis. *J Oral Pathol Med* 40:433–439.
 70. Paros A, & Beck SL (1999) Folinic acid reduces cleft lip [CL(P)] in A/WySn mice. *Teratology* 60: 344–347.
 71. Sheng W, Wang H, Ma X, Qian Y, Zhang P, Wu Y, Zheng F, Chen L, Huang G, Ma D (2012) LINE-1 methylation status and its association with tetralogy of fallot in infants. *BMC Med Genomics* 5:20.
 72. Zhao A, Huang YJ, Zhang HF, Tang W, Zhang MF (2019) Study on DNA methylation profiles in non-syndromic cleft lip/palate based on bioinformatics. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 28:57–62.
 73. Jones PA (2012) Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and

beyond. *Nat Rev Genet* 13:484–492.

74. Twigg SR, Wilkie AO (2015) A Genetic-Pathophysiological Framework for Craniosynostosis. *Am J Hum Genet* 97:359–377.
75. Marcucio R, Hallgrimsson B, Young NM (2015) Facial Morphogenesis. Physical and Molecular Interactions Between the Brain and the Face. *Curr Top Dev Biol* 115:299–320.
76. Hu N, Strobl-Mazzulla PH, Bronner ME (2014) Epigenetic regulation in neural crest development. *Dev Biol* 396:159–168.
77. Sparks NRL, Martinez IKC, Soto CH, zur Nieden NI (2018) Low Osteogenic Yield in Human Pluripotent Stem Cells Associates with Differential Neural Crest Promoter Methylation. *Stem Cells* 36:349–362.
78. Liu X, Qi J, Tao Y, Zhang H, Yin J, Ji M, Gao Z, Li Z, Li N, Yu Z (2016) Correlation of proliferation, TGF- β 3 promoter methylation, and Smad signaling in MEPM cells during the development of ATRA-induced cleft palate. *Reprod Toxicol* 61:1–9.
79. Seelan RS, Appana SN, Mukhopadhyay P, Warner DR, Brock GN, Pisano MM, Greene RM (2013) Developmental profiles of the murine palatal methylome. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 97:171–186.
80. Hooper JE, Feng W, Li H, Leach SM, Phang T, Siska C, Jones KL, Spritz RA, Hunter LE, Williams T (2017) Systems biology of facial development: contributions of ectoderm and mesenchyme. *Dev Biol* 426:97–114.
81. Liu J, Jiang Y, Liu D, Zhang H, Chen T, Zhang G, Liu H, Du S, Li Z, Jin Y, Li X (2020) Relationship Between Cobalt Transporter II Gene rs9606756 Site Mutant and Serum Homocysteine Level and Recurrent Cerebral Infarction in Young and Middle-Aged People. *Minerva Med*.
82. Marshall SW (2007) Power for tests of interaction : effect of raising the Type I error rate. *Epidemiol Perspect Innov* 4:4.

11. ANEXOS

11.1. Anexo 1: Acta de aprobación de protocolo de investigación por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile



Ed-30 de mayo de 2017

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

INFORME N°:2017/07

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

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

Dr. Eduardo Fernández
Presidente CEC

Dr. Marco Cornejo
Vicepresidente CEC

Dr. Mauricio Baeza
Miembro Permanente CEC

Sr. Roberto La Rosa
Miembro Permanente CEC

Dr. Alfredo Molina
Miembro Permanente CEC

Sra. Rebeca Galarce
Miembro Permanente CEC

Dr. Juan Estay
Miembro Permanente CEC

Dra. Viviana Toro
Miembro Alterno CEC

Dr. Ignacio Araya
Miembro Alterno CEC

2. Fecha de Aprobación: 30/05/2017

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

3. Investigador responsable: Dr. José Suazo

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

5. Documentación Revisada:

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

6. Fundamentación de la aprobación

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

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

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



Dr. Eduardo Fernández G.

Presidente C.E.C.



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

11.2. Anexo 2: Consentimiento informado usado para casos



Versión 2 16/03/2017

Consentimiento Informado Para Participación en Proyecto de Investigación

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

PATROCINANTE: Concurso FONDECYT Regular 2017

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

Teléfono: 229781758

Nombre del Participante:

.....

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

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

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

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

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

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

Página

Justificación de la Investigación

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

Objetivo de la Investigación

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

Beneficio de la Investigación.

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

Tipo de Intervención y Procedimiento.

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

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

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

Riesgo de la Investigación.

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

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

Criterios para selección de los participantes en el estudio

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

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

Confidencialidad y difusión de datos.

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

Aclaraciones

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

Otros Derechos del participante

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

Carta de Consentimiento Informado (Mayores de 18 años)

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

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



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

Nombre del Paciente, Padre Tutor: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Sección a llenar por el Investigador Principal

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

Nombre del Investigador Principal: _____

Firma: _____

Fecha: _____



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

Firma: _____

Fecha: _____

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

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

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

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

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

Muchas gracias.

Nombre del Paciente: _____

Firma: _____

Fecha: _____



Sección a llenar por el Investigador Principal

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

Nombre del Investigador Principal: _____

Firma: _____

Fecha: _____

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

Firma: _____

Fecha: _____

11.3. Anexo 3: Consentimiento Informado usado para controles



Versión 2 16/05/2017

Consentimiento Informado Para Participación en Proyecto de Investigación

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

PATROCINANTE: Concurso FONDECYT Regular 2017

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

Teléfono: 229781758

Nombre del Participante:



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

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

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

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



Firma + U.S. *

Justificación de la Investigación

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

Objetivo de la Investigación

Esta investigación tiene por objetivo conocer las causas genéticas y ambientales de este problema de nacimiento conocido fisuras orofaciales. En otras palabras, averiguar cuál es el origen tanto hereditario como nutricional de esta enfermedad. Específicamente buscaremos si existen cambios en factores genéticos (o genes) que participan en la formación de la cara cuando se está desarrollando el feto durante el embarazo. Además queremos averiguar si la falta de un nutriente (llamado folato) tiene relación con este defecto. Para ello necesitamos una muestra de su material genético o ADN y de su plasma (parte líquida de la sangre), además de una encuesta sobre los alimentos que ha consumido en los últimos meses. Este estudio incluirá a un grupo de al menos 250 personas con este problema y sus madres y padres. Además necesitamos un número similar de personas (niños y adultos) sin este problema como punto de comparación con lo que encontremos en las personas afectadas y en sus padres. Dado que usted o su hija o hijo no tienen este problema es que lo estamos invitando a participar como sujeto control.

Beneficio de la Investigación.

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

Tipo de Intervención y Procedimiento.

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

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

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

Riesgo de la Investigación.

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

procedimiento. Por ello los riesgos para usted son mínimos. En el caso de la toma de muestra de sangre de cordón del recién nacido, este es un procedimiento de rutina en cada parto que no implica riesgo alguno para el niño(a) ni para la madre. En el caso de la muestra de saliva o de la mejilla no genera ningún problema para su salud, no produce dolor ni posibilidad de infección. Por ello los riesgos para usted son mínimos.

Criterios para selección de los participantes en el estudio

Los criterios de inclusión serán: ser chileno y no presentar el diagnóstico de fisuras orofaciales
Los criterios de exclusión serán: chilenos o extranjeros con antecedentes familiares de anomalías del desarrollo craneofacial.

Confidencialidad y difusión de datos.

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

Aclaraciones

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



Otros Derechos del participante

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



Carta de Consentimiento Informado (Mayores de 18 años)

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

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



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

Nombre del Paciente, Padre Tutor: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Sección a llenar por el Investigador Principal

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

Nombre del Investigador Principal: _____

Firma: _____

Fecha: _____



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

Firma: _____

Fecha: _____

11.4. Anexo 4: Características de los primers de PCR para amplificar LINE-1

Partidor Forward:

Secuencia: 5'-TTTTGAGTTAGGTGTGGGATATA-3'

Largo: 23 nucleótidos

Score: 91

GC: 34.78%

Tm: 54.26°C

ΔG : -34.55 kcal/mol

Autodimerización: -4.91 kcal/mol

Horquillas: -

Partidor Reverse:

Secuencia: 5'-Bio-AAATCAAAAATTCCCTTTC-3'

Largo: 20 nucleótidos

Score: 81

GC: 25%

Tm: 51.15°C

ΔG : -32.31 kcal/mol

Autodimerización: -5.36 kcal/mol

Horquillas: -0,79 kcal/mol

Partidor Pirosecuenciación:

Secuencia: 5'-AGTTAGGTGTGGGATATAGT-3'

Largo: 20 nucleótidos

Score: 91

GC: 40%

Tm: 50.7°C

ΔG : -28.13 kcal/mol

Autodimerización: -4.91 kcal/mol

Horquillas: -

Interacción:

Score: 78

Largo de Fragmento: 145

Dimerización entre partidores: -9.36 kcal/mol

Secuencia a analizar: TTYGTGGTGYGTYGTTTTTTAAGTYGGTTGAAAAG

Secuencia con partidores alineados:

TTTTGAGTTAGGTGTGGGATATA

|||||

AGTTAGGTGTGGGATATAGT

|||||

TTTTGAGTTAGGTGTGGGATATAGTTTYGTGGTGYGTYGTTTTTTAAGTYGGTTGAAAAGYGTAAATATTYGGTGGGAGTGAT
TYGATTTTTTAGGTGYGTYGTATTTTTTTTTTTGATYGGAAAGGGAATTTTTGATTTTTTGGGTTTT

|||||

CTTCCCTTAAAAAACTAAA

11.5. Anexo 5: Preparación de la estación de trabajo al vacío

Durante la incubación de la placa de PCR se preparó la estación de trabajo al vacío, para ello se añadieron 100 ml de etanol 70°, solución de Buffer de lavado PyroMark 1X, solución de denaturación PyroMark y Agua destilada en las posiciones correspondientes como se señala en la Figura 3⁵⁷.



Figura 4. Componentes de la estación de trabajo al vacío de PyroMark Q96. Las posiciones señaladas son el área para la primera placa de PCR (1), área para placa PyroMark Q96 HS (2), solución de etanol 70° (3), solución de Buffer de lavado PyroMark 1X (4), solución de denaturación PyroMark (5) Agua destilada (6 y 7) y la herramienta de vacío (7). Modificado desde QIAGEN⁵⁷.

11.6. Anexo 6: Protocolo usado en la estación de trabajo al vacío

Se conectó la herramienta de vacío a la estación de trabajo, se encendió y se puso la herramienta en agua destilada (posición 7 señalada en la figura 3)⁵⁷.

Luego, se introdujo con cuidado de no tocar ningún borde las sondas de filtro de la herramienta de vacío en la placa de PCR para capturar las microesferas con DNA inmovilizado, se mantuvo en esta posición durante unos segundos, una vez capturado el producto se retiró con sumo cuidado la herramienta levantándola en un ángulo de más de 90 grados para ayudar a remover cualquier liquido residual como se muestra en la figura 4⁵⁷.



Figura 5. Herramienta de trabajo levantada en un ángulo de más de 90°. Modificado desde QIAGEN⁵⁷.

Posteriormente, nuevamente con cuidado de no tocar ningún borde, se introdujo la herramienta en etanol 70° durante unos segundos y se levantó con cuidado en un ángulo de más de 90°⁵⁷. Se repitió el mismo procedimiento tanto en la solución de denaturación como buffer de lavado, en ese orden⁵⁷.

Luego del buffer de lavado se mantuvo la herramienta en paralelo sobre la placa PyroMark Q96 HS y sin bajar se apagó la estación de trabajo⁵⁷.

Una vez apagado, se introdujo las sondas en la placa para liberar las microesferas en la solución de alineamiento y se agitó suavemente la herramienta para ayudar a liberar la mayor cantidad de producto⁵⁷. Una vez realizado esto, se sacó la herramienta de trabajo y una vez fuera de la placa se volvió a encender la estación de trabajo⁵⁷.

Se introdujo la herramienta de trabajo en el agua destilada durante unos segundos y luego se sacó y se levantó a más de 90° para ayudar a quitar cualquier residuo líquido de los filtros, una vez terminado se volvió a apagar⁵⁷.

11.7. Anexo 7: Ensayo de islas CpG configurado en PyroMark

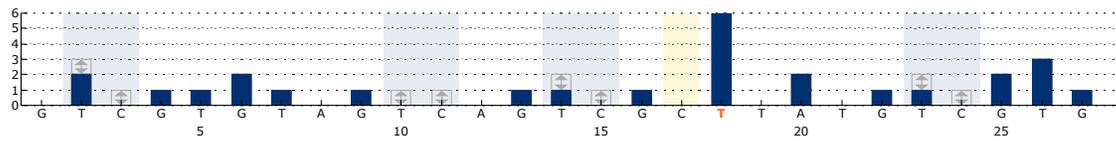
Secuencia a analizar: TTYGTGGTGYGTYGTTTTTTAAGTYGGTTTGAAAAG

Orden de dispensación generado: GTCGTGTAGTCAGTCGCTTATGTCGTG

Control de secuenciación: **G**TTCGTGTAGTCAGTCGCTTATGTCGTG

Control de tratamiento con bisulfito: GTCGTGTAGTCAGTCG**C**TTATGTCGTG

Histograma:



11.8. Anexo 8: resultados de test aplicados (U de Mann Whitney y T de Student) punto por punto.

Tabla 5. Asociación entre metilación punto por punto de LINE-1 y FOFNS en Chile.

	Punto 1			Punto 2			Punto 3			Punto 4		
	Controles	Casos	P	Controles	Casos	p	Controles	Casos	p	Controles	Casos	p
FOFNS	62 (15) ♦	61 (9) ♦	0.15	61 (6.5) ♦	60 (5.5) ♦	0.99	58.5 (14) ♦	58 (9.5) ♦	0.36	67 (10) ♦	66 (8.5) ♦	0.16
FL/P	62 (15.5) ♦	61 (8.5) ♦	0.27	60 (7.5) ♦	60.5 (5.5) ♦	0.72	56 (13) ♦	58 (9) ♦	0.77	67 (9) ♦	66 (8.5) ♦	0.39
FL	62.5 (14) ♦	60.5 (8) ♦	0.58	59 (10) ♦	58 (6) ♦	0.89	57.6 +/- 12.3 ●	55 +/- 11.3 ●	0.24	65.5 (6) ♦	66 (7) ♦	0.96
FLP	62 (15) ♦	61.5 (9) ♦	0.38	61 (6) ♦	61 (5) ♦	0.56	58.5 (14) ♦	58 (9) ♦	0.72	67.5 (10) ♦	65.5 (8) ♦	0.35
FP	63 (15) ♦	62 (12) ♦	0.29	61.07 +/- 4.1 ●	60.13 +/- 4.5 ●	0.28	59.27 +/- 11.6 ●	54.93 +/- 10.5 ●	0.15	71.53 +/- 11.7 ●	66.07 +/- 8.4 ●	0.07
FL/P Unilateral	62 (14) ♦	61 (8) ♦	0.28	61 (7) ♦	61 (5) ♦	0.81	59 (12) ♦	58 (8) ♦	0.48	67 (9) ♦	66 (8) ♦	0.33
FL/P Bilateral	64.24 +/- 12.7 ●	61.95 +/- 7.6 ●	0.24	58 (9) ♦	60 (5) ♦	0.65	59 +/- 12.2 ●	59.3 +/- 6.1 ●	0.54	66.95 +/- 10.8 ●	65.24 +/- 9.2 ●	0.29

Resultados y valor p obtenidos al comparar medianas o promedios de cada conjunto de datos. En los subgrupos que se aplicó el análisis de U de Mann Whitney se encuentran identificados con el símbolo ♦, en ellos se puede observar la mediana obtenida y entre paréntesis el rango intercuartílico y su valor p (P) obtenido. En los subgrupos donde se aplicó T de Student se encuentran identificados con ●, en ellos se puede observar el dato de promedio obtenido en cada grupo y a continuación su desviación estándar y valor p. Los valores p menores a 0.05 se encuentran marcados con un asterisco al final del valor (*).

11.9. Anexo 9: Presentación formato póster en congreso IADR 2019

Título: Association between LINE-1 Hypomethylation and the Risk of Non-Syndromic Orofacial Clefts in a Chilean Population.

Autores: G. Cáceres Rojas, A. Recabarren, B. J. Krause, J. Suazo

Congreso: XXXI Reunión Anual 2019 – IADR División Chilena

Formato: Póster

Resúmen: Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P) is one of the most common birth defects worldwide and in Chile. Numerous studies show that changes in the DNA methylation are present in different pathologies. This study aims to evaluate the association of the global methylation levels of the DNA, using the methylation of Long Interspersed Nuclear Elements 1 (LINE-1), and the risk of non-syndromic orofacial clefts in a Chilean population.

In a pilot study, we evaluated 45 case and 43 controls paired by age and sex. Oral mucosa swabs were taken from them and total DNA was extracted. We evaluated the global methylation status using 4 points susceptible of methylation of the repetitive elements LINE-1, the percentage of methylation in each point was measured using pyrosequencing of bisulfite-modified DNA. Then, these levels were compared in case and controls.

Our preliminary results showed that there are lower levels of methylation of LINE-1 in global terms in the cases (mean=63.42%±5.39) than the controls (mean=67.06%±8.2) (p-value=0.0078). The analysis point by point showed no difference in 1 point comparing cases (mean=69.62%±6.46) and controls (mean=70.12%±11.21) (p-value=0.3998) and the other 3 points presents lower levels of methylation in the cases (mean=58.93%±5.18; 59.11%±6.6; 66.02%±6.43) than the controls (mean=61.42%±5.19; 65.49%±9.54; 71.21%±9.89) (p-values=0.0136; 0.0002; 0.0022 respectively).

The results suggest an association between hypomethylation of the repetitive elements LINE-1 and the risk of non-syndromic orofacial clefts in Chilean population. These results are in concordance with a previous study which reported lower levels of 5-methyl-cytosine in Chilean patients with non-syndromic orofacial clefts.



Article

Premature Vascular Aging in Guinea Pigs Affected by Fetal Growth Restriction

Adolfo A. Paz ¹, German A. Arenas ^{1,2}, Sebastián Castillo-Galán ^{1,2}, Estefanía Peñaloza ¹, Gabriela Cáceres-Rojas ⁴, José Suazo ⁴, Emilio A. Herrera ^{3,5} and Bernardo J. Krause ^{1,*} 

¹ Department of Neonatology, Division of Paediatrics, Faculty of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Marcoleta 391, Santiago 8330024, Santiago, Chile

² Programa de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Alameda 340, Santiago 8330024, Santiago, Chile

³ Programa de Fisiopatología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Av. Salvador 486, Providencia 7500922, Santiago, Chile

⁴ Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, Sergio Livingstone 943, Independencia 8380492, Santiago, Chile

⁵ International Center for Andean Studies (INCAS), Universidad de Chile, Baquedano s/n, Putre, Chile

* Correspondence: bjkrause@uc.cl

Received: 31 May 2019; Accepted: 13 July 2019; Published: 15 July 2019



Abstract: Cardiovascular risk associated with fetal growth restriction (FGR) could result from an early impaired cardio vascular function. However, whether this effect results in premature vascular aging has not been addressed. We studied the ex vivo reactivity of carotid and femoral arteries in fetal (near term), adults (eight months-old) and aged (16 months-old) guinea pigs in normal (control) and FGR offspring. Additionally, an epigenetic marker of vascular aging (i.e., LINE-1 DNA methylation) was evaluated in human umbilical artery endothelial cells (HUAEC) from control and FGR subjects. Control guinea pig arteries showed an increased contractile response (KCl-induced) and a progressive impairment of NO-mediated relaxing responses as animals get older. FGR was associated with an initial preserved carotid artery reactivity as well as a later significant impairment in NO-mediated responses. Femoral arteries from FGR fetuses showed an increased contractility but a decreased relaxing response compared with control fetuses, and both responses were impaired in FGR-adults. Finally, FGR-HUAEC showed decreased LINE-1 DNA methylation compared with control-HUAEC. These data suggest that the aging of vascular function occurs by changes in NO-mediated responses, with limited alterations in contractile capacity. Further, these effects are accelerated and imposed at early stages of development in subjects exposed to a suboptimal intrauterine environment.

Keywords: Fetal Growth Restriction; Early Vascular Aging; Cardiovascular Diseases; Endothelial Dysfunction

1. Introduction

Cardiovascular disease (CVD) is the main cause of death worldwide [1]. Genetic changes associated with the traits of metabolic syndrome and cardiovascular diseases are able to explain a small proportion of risks and cases, suggesting the presence of other contributory factors in these conditions. Since Barker's hypothesis of adult diseases' origins during early life, the programming consequences in intrauterine life have been extensively studied [2]. Fetal growth restriction (FGR) includes any adverse condition that represses fetal growth potential, clinically defined in neonates whose birth weight is below the 10th percentile for its gestational age along with signs of altered fetal or placental vascular function [3,4]. The mechanisms that could trigger FGR are vast, but a key factor is decreased placental perfusion, characterized by a reduction in the nutrients and oxygen supply to

11.11. Anexo 11: Publicación en revisión para revista Epigenomics

Page 1 of 21

Epigenomics

NONSYNDROMIC OROFACIAL CLEFTS IN CHILE: LINE-1 METHYLATION AND *MTHFR* VARIANTS

Gabriela Cáceres-Rojas¹, Carlos Salamanca^{1,2,3}, Bernardo J. Krause⁴, Andrea S. Recabarren¹, Pamela A. Recabarren¹, Roberto Pantoja^{5,6}, Noemi Leiva⁷, Rosa Pardo^{8,9,10}, José Luis Santos¹¹ and José Suazo, PhD^{*,1}

¹ Institute for Research in Dental Sciences, School of Dentistry, Universidad de Chile, Santiago, Chile

² Research Centre in Dental Sciences (CICO), Dental School, Universidad de La Frontera.

³ Universidad Adventista de Chile, Chillán, Chile.

⁴ Department of Neonatology, Division of Paediatrics, Faculty of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

⁵ Maxillofacial Surgery Service, Cleft Lip and Palate Unit, Hospital Clínico San Borja-Arriaran. Santiago de Chile.

⁶ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

⁷ Unit of Maxillofacial Malformations, School of Dentistry, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

⁸ Section of Genetics, Hospital Clínico Universidad de Chile, Santiago, Chile.

⁹ Unit of Neonatology, Hospital Clínico Universidad de Chile, Santiago, Chile.

¹⁰ Unit of Genetics, Hospital Dr. Sótero del Río, Santiago, Chile.

¹¹ Department of Nutrition, Diabetes and Metabolism, School of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

*** Author for correspondence:**

Dr. José Suazo

Institute for Research in Dental Sciences, School of Dentistry, Universidad de Chile. Sergio Livingstone #943, Santiago, Chile. Telephone: +56 229781758. E-mail: jsuazo@odontologia.uchile.cl

<https://mc04.manuscriptcentral.com/fm-epi>