



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**INTERACCIÓN ENTRE POLIMORFISMOS DE LOS GENES *MTR*, *MTHFR* Y
SHMT1 EN EL RIESGO DE FISURAS LABIO PALATINAS NO SINDRÓMICAS
EN CHILE**

Catherine Marioly Caro Farías

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANA-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. José Suazo Sanhueza**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1170805
Santiago - Chile
2021**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**INTERACCIÓN ENTRE POLIMORFISMOS DE LOS GENES *MTR*, *MTHFR* Y
SHMT1 EN EL RIESGO DE FISURAS LABIO PALATINAS NO SINDRÓMICAS
EN CHILE**

Catherine Marioly Caro Farías

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANA-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. José Suazo Sanhueza**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1170805
Santiago - Chile
2021**

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que me apoyaron y han sido importantes durante la etapa universitaria y el desarrollo de mi tesis.

Agradezco a mi tutor de tesis Prof. José Suazo, por recibirme en este proyecto de investigación, por su dedicación, paciencia y buena voluntad durante la realización de esta tesis, que fue un largo camino, pero lleno de aprendizaje.

Además, agradezco a los docentes de la universidad por entregarme conocimientos y herramientas que me han sido de gran utilidad. Asimismo, estoy muy agradecida de todas las personas que fueron mis pacientes, porque gracias a su confianza, cariño y paciencia me permitieron avanzar hasta el final de la etapa universitaria.

Quiero agradecer a mi familia, especialmente a mi mamá y a mi hermano Daniel, por creer en mí, por guiarme y apoyarme siempre, su apoyo fue fundamental para lograr mis objetivos; a mi hermanito Luciano por alegrar mis días y ser mi motivación. También, a mi abuelo y primo, que ya no están en este mundo, pero siempre son mi luz para enfrentarme a las adversidades.

Por último, siento profunda gratitud hacía mi pololo Daniel por su amor y apoyo incondicional, también a mi amiga Pascal que ha estado conmigo en todos los momentos desde el primer día de universidad y a todas mis amigas y amigos que me alentaron, escucharon y apoyaron cuando los necesité.

Infinitas gracias a todos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CLASIFICACIÓN DE FISURAS LABIO PALATINAS	1
1.2. EMBRIOGÉNESIS DE LABIO SUPERIOR Y PALADAR	2
1.3. EPIDEMIOLOGÍA: PREVALENCIA MUNDIAL Y EN CHILE	3
1.4. FL/PNS Y SU RELACIÓN CON SALUD PÚBLICA	4
1.5. ETIOLOGÍA DE FL/PNS	4
1.5.1. Factores de riesgo ambientales	5
1.5.2. Factores de riesgo genéticos	5
1.6. FOLATOS / ÁCIDO FÓLICO	6
1.6.1. Metabolismo del folato / ácido fólico	7
1.7. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL METABOLISMO DEL FOLATO Y SU ASOCIACIÓN CON FL/PNS	8
1.7.1. 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa (MTR)	8
1.7.2. Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)	9
1.7.3. Serina hidroximetiltransferasa citosólica (SHMT1)	10
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVOS	11
3.1. OBJETIVO GENERAL	11
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1. SUJETOS	12
4.2. OBTENCIÓN DE LOS GENOTIPOS DE LOS POLIMORFISMOS RS1805087, RS1801133 Y RS197927 ...	13
4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	13
5. RESULTADOS	15
6. DISCUSIÓN	19
6.1. INTERACCIÓN ENTRE COMBINATORIAS PARES DE SNPs DE LOS GENES <i>MTR</i> , <i>SHMT1</i> Y <i>MTHFR</i> EN FL/PNS EN UNA POBLACIÓN CHILENA	20
6.2. INTERACCIÓN SIMULTÁNEA ENTRE SNPs DE LOS GENES <i>MTR</i> , <i>MTHFR</i> Y <i>SHMT1</i> EN UNA POBLACIÓN CHILENA	21
6.3. EFECTO DEL SEXO DE LOS INDIVIDUOS EN LA INTERACCIÓN ENTRE POLIMORFISMOS DE LOS GENES <i>MTR</i> , <i>MTHFR</i> Y <i>SHMT1</i> EN UNA POBLACIÓN CHILENA	22
7. CONCLUSIÓN	25
8. BIBLIOGRAFÍA	26
9. ANEXOS	35
9.1. ANEXO 1. ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN POR EL COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE.	35
9.2. ANEXO 2. APROBACIÓN DEL COMITÉ INSTITUCIONAL DE BIOSEGURIDAD.	37
9.2. ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO	38

RESUMEN

Introducción: Las fisuras labio palatinas no sindrómicas (FL/PNS) son una de las malformaciones congénitas más comunes en Chile y el mundo. Se producen por una alteración en la fusión de tejidos que dan origen al labio superior y paladar durante el desarrollo embrionario. Su etiología es multifactorial, en donde intervienen factores ambientales y genéticos, dentro de los cuales destacan la deficiencia de folato / ácido fólico y su metabolismo. La suplementación de ácido fólico en el periodo periconcepcional y la fortificación de la harina de trigo con esta vitamina no ha disminuido la tasa de incidencia de FL/PNS en Chile, lo cual puede explicarse por variantes genéticas involucradas en el metabolismo del folato que se han asociado con el riesgo de FL/PNS.

El propósito de este estudio fue determinar la existencia de interacción gen-gen entre los polimorfismos de los genes *MTR* (rs1805087), *MTHFR* (rs1801133) y *SHMT1* (rs1979277) y el riesgo de FL/PNS en una población chilena.

Metodología: Se utilizó una muestra conformada por 260 casos de FL/PNS y 346 controles. Mediante un modelo de escala aditiva se determinó la interacción entre pares de variantes y el método *multifactor dimensionality reduction* (MDR) para la interacción simultánea de las tres variantes. Ambos análisis se realizaron con y sin ajuste por sexo.

Resultados: En el análisis por pares, la interacción entre los polimorfismos *MTR*-*SHMT1* disminuye significativamente el riesgo de presentar FL/PNS ($p = 0,022$). Al analizar la interacción entre las tres variantes simultáneamente *MTR*, *MTHFR* y *SHMT1* con sus respectivos genotipos, la combinatoria GG-CT-GG aumentó significativamente el riesgo de FL/PNS tanto en la muestra no ajustada por sexo ($p = 0,021$) como en mujeres ($p = 0,015$). En varones, la combinatoria AA-CC-GA resultó protectora ($p = 0,034$), mientras que los genotipos AG-CT-GG ($p = 0,042$) y AG-TT-GG ($p = 0,021$) aumentaron el riesgo de FL/PNS.

Conclusiones: Las variantes de *MTR* (rs1805087), *MTHFR* (rs1801133) y *SHMT1* (rs1979277) involucradas en el metabolismo del folato / ácido fólico interactúan entre sí modificando el riesgo de FL/PNS, pudiendo ser influenciadas por el sexo de los individuos.

1. INTRODUCCIÓN

Las fisuras labio palatinas no sindrómicas (FL/PNS) son una de las malformaciones congénitas más comunes en humanos alrededor del mundo, se producen por una alteración en la fusión de tejidos que dan origen al labio superior y paladar durante el desarrollo embrionario. Clínicamente se componen de dos entidades separadas: fisura labial con o sin fisura de paladar (FL/P) y fisura palatina aislada (FP) y se caracterizan por no asociarse con otra malformación o anomalía estructural. Este último punto hace la distinción entre fisuras labio palatinas (FL/Ps) sindrómicas y no sindrómicas (Carinci y cols., 2007).

Las fisuras labio palatinas repercuten en la calidad de vida de quienes las presentan, debido a que provocan efectos sobre el habla, la audición, la apariencia y la cognición (Mossey y cols., 2009). Además, tienen un impacto negativo, incluso después de la rehabilitación, en dimensiones psicosociales tales como el bienestar emocional, funcional y social (Queiroz Herkrath y cols., 2015). Estas implican también un alto costo económico multidimensional, que genera una importante carga en salud pública en términos de costos médicos inmediatos y a largo plazo, así como un impacto social concomitante en los pacientes y sus familias (Berk y Marazita, 2002).

1.1. Clasificación de fisuras labio palatinas

Dentro de las fisuras labio palatinas existen las formas sindrómicas y no sindrómicas. Los casos sindrómicos se componen de una amplia gama, que incluyen más de 300 síndromes que tienen a las fisuras labio palatinas como parte de su presentación clínica (Dixon y cols., 2011). Por otra parte, las formas no sindrómicas tienen una mayor prevalencia, la cual corresponde a aproximadamente el 70% de todos los casos de FL/Ps (Marazita y cols., 2002).

Dependiendo del momento embriológico en el que se produce el defecto de fusión y de las estructuras anatómicas involucradas se han descrito distintas clasificaciones (Teissier y cols., 2016):

- a) Clasificación anatomoclínica:
- Fisuras labiales puras (completas o incompletas / con puente cutáneo / uni o bilaterales);
 - Fisura labio alveolar (completa o incompleta / uni o bilateral);
 - Fisura labio alveolo palatina (uni o bilateral);
 - Fisura velopalatina;
 - Fisura de velo (evidente o submucosa).
- b) Clasificación internacional por grupos, basada en principios embriológicos (Millard, 1967; Millard & Pigott, 1969):
- Fisura anterior: fisura de labio, labio alveolar o labio alveolo palatino (embriológicamente involucra sólo paladar primario);
 - Fisura anteroposterior: labio, alveolo y paladar (embriológicamente involucra paladar primario y secundario);
 - Fisura posterior: paladar duro y/o velo (embriológicamente involucra sólo paladar secundario).
- c) Clasificación según la «Y» de Kernahan (Kernahan & Stark, 1958; Elshahy, 1973; Kernahan, 1971):
- Es la más usada actualmente, pero debe complementarse a las anteriores. Las ramas derecha e izquierda de la «Y» se dividen en tres secciones que representan el labio, el alvéolo y el paladar duro retroalveolar hasta el agujero incisivo. El paladar posterior se divide a continuación en paladar duro y paladar blando. Dependiendo de la malformación, se somborean los sectores afectados.

1.2. Embriogénesis de labio superior y paladar

Se considera que la formación facial en humanos se origina con la migración de las células de la cresta neural hacia la región facial faríngea, entre los 25 y 28 días de gestación (Montenegro y Rojas, 2005). El desarrollo de la cara comienza alrededor de la cuarta semana de vida intrauterina, con la participación del proceso frontonasal y sus elementos derivados: los procesos nasal medial y lateral y los procesos maxilares y mandibulares derivados del primer arco faríngeo (Chiego, 2014).

El labio superior y paladar primario se desarrollan durante la sexta semana de vida del embrión. Durante esa semana se forma el proceso nasal medial, denominado philtrum, formando la línea media del labio superior. La zona distal del proceso nasal medial se encuentra íntimamente unida al proceso maxilar, constituyendo la región lateral del labio superior (Mossey y cols., 2009; Chiego, 2014). Una falta de contacto o fusión de los procesos maxilares y nasal medial provoca una fisura labial, unilateral o bilateral (Chiego, 2014).

Hacia la séptima semana el paladar se compone de una zona medial anterior, denominado paladar primario, que constituye el suelo de las fositas nasales y dos procesos palatinos laterales que inicialmente crecen verticalmente hacia los lados de la lengua en desarrollo. Hacia finales de la octava semana, los procesos palatinos se disponen horizontales sobre la lengua, formando así el paladar secundario. Producto de su unión en sentido ventro-dorsal en la línea media y también con el paladar primario y el tabique nasal, se completa la fusión alrededor de la décima semana de embriogénesis, es en esta etapa donde se podría generar una fisura de paladar (Chiego, 2014).

1.3. Epidemiología: Prevalencia mundial y en Chile

Las fisuras labio palatinas a nivel mundial se presentan en promedio en 1/1000 recién nacidos vivos (RNV) (Mossey y cols., 2009), una frecuencia similar a la del síndrome de Down, defectos del tubo neural, polidactilia y otras anomalías congénitas llamadas "comunes" (Mossey y cols., 2003).

En general, las poblaciones de Latinoamérica y Asia tienen las tasas de prevalencia de fisuras labio palatinas más altas reportadas de aproximadamente 1/500 RNV, las poblaciones de origen europeo tienen tasas intermedias de 1/1000 RNV, mientras que las poblaciones de origen africano tienen tasas de 1/2500 RNV (Mossey y cols., 2009). En Chile, según el Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas (ECLAMC), las FL/Ps corresponden a la segunda malformación más común del país, con una incidencia de aproximadamente 1/650 RNV. Específicamente su incidencia entre el 2001 y 2010 para la FP fue de 0,7/1000 RNV

y para la FLP de 1,4/1000 RNV, tasas que no han tenido cambios significativos en las últimas cuatro décadas (Nazer y Cifuentes, 2014).

Existen diferencias de prevalencia de acuerdo con el sexo; la FL/P es más frecuente en varones en una proporción de 2:1, mientras que la FP es más frecuente en mujeres en la misma proporción (Mossey y cols., 2009). También existen diferencias de acuerdo con la lateralidad; aproximadamente el 80% de las FL/PNS son unilaterales y se localizan con mayor frecuencia en el lado izquierdo, en una relación 2:1. Por otra parte, las fisuras bilaterales son más frecuentes en varones (Hagberg y cols., 1998).

1.4. FL/PNS y su relación con salud pública

A nivel mundial las FL/Ps constituyen un problema de salud pública, debido a su alta prevalencia, rehabilitación compleja, altos costos médicos y carga emocional para los pacientes y sus familias (Millacura y cols., 2017). Las consecuencias derivadas de las FL/Ps afectan a la persona en distintos niveles, razón por la cual es fundamental el manejo multidisciplinario, que incluya enfermería, cirujanos plásticos e infantiles, maxilofaciales, otorrinolaringólogos, fonoaudiólogos, genetistas, psicólogos, odontopediatras, ortodoncistas, ginecólogos ecografistas, kinesiólogos, entre otros (Mossey y cols., 2009). En Chile, se garantiza el acceso a una confirmación diagnóstica y tratamiento, incluyendo rehabilitación oral hasta los 15 años de edad. Posteriormente no existe cobertura en tratamientos médicos, debiendo asumir el paciente y/o su familia los costos asociados (Ministerio de Salud, 2015).

1.5. Etiología de FL/PNS

La causa principal en el desarrollo de FL/PNS no se ha aclarado por completo. Una compleja interacción entre factores de riesgo genéticos y ambientales durante el crecimiento embriológico de la estructura craneofacial produce el desarrollo de una fisura (Saleem y cols., 2019).

1.5.1. Factores de riesgo ambientales

Se han identificado múltiples factores de riesgo ambientales asociados con FL/PNS, tales como la exposición materna al humo del tabaco, consumo de alcohol durante el embarazo, estrés fisiológico materno, consumo de medicamentos como corticosteroides, agentes anticonvulsivantes o antagonistas del folato durante el periodo periconcepcional (Sabbagh y cols., 2015; Xu y cols., 2018). Respecto a la nutrición materna, se ha estudiado el rol del ácido fólico y cobalaminas en la incidencia de FL/Ps. La ingesta periconcepcional de ácido fólico ha demostrado reducir el riesgo tanto para FL/P como para FP (Jahanbin y cols., 2018; Lu y cols., 2019). Sin embargo, este efecto protector no es tan fuerte en las FL/Ps como en los defectos del tubo neural (Wehby y Murray, 2010).

1.5.2. Factores de riesgo genéticos

Los componentes genéticos implican variantes y/o mutaciones genéticas heredadas del padre o la madre que son directamente responsables de causar FL/P o podrían ser un factor de riesgo para aumentar las posibilidades de desarrollar una fisura (Saleem y cols., 2019). En las FL/PNS hay un antecedente familiar en un 20 a 30% de los casos (Ruda y cols., 2012). Recientemente, estudios de asociación de todo el genoma han reportado aproximadamente 37 *loci* de riesgo genético para FL/PNS, que sólo representan una pequeña fracción de su heredabilidad, por lo que aún existe una gran proporción del rasgo que no está explicado por variantes genéticas comunes (Saleem y cols., 2019). Una fracción considerable de *loci* explica sus efectos en diferentes grupos de poblaciones (Leslie y cols., 2016), pero la fuerza de asociación difiere entre poblaciones debido a la heterogeneidad de *locus*. También existe una prevalencia variable en frecuencias de alelos de riesgo para FL/PNS en diferentes poblaciones (Mossey y Modell, 2012; Leslie y cols., 2016).

Varios estudios han evaluado el posible papel de la epigenética en la etiología de FL/PNS en humanos, centrándose en la metilación del ADN de regiones específicas y globales de la sangre o tejidos orales. Se cree ampliamente que la aparición de FL/PNS está relacionada no solo con la deficiencia de ácido fólico (Prescott y Malcolm, 2002), sino también con la hiperhomocisteinemia, causada por un defecto

genético en la vía del metabolismo del folato, el cual corresponde a un proceso complejo que requiere de ciertas enzimas claves (Bhaskar y cols., 2011).

1.6. Folatos / ácido fólico

Los folatos, conocidos también como vitamina B9, son un nutriente esencial que se obtiene a partir de la dieta, puesto que los mamíferos carecen de la maquinaria enzimática para sintetizarlos (Gropper y Smith, 2012). Son solubles en agua y se encuentran principalmente en frutas y verduras, especialmente en legumbres y verduras de hoja verde oscuro (Li y cols., 2016). En general, el término ácido fólico (AF) se aplica a la forma sintética de los folatos, molécula más estable y de mayor biodisponibilidad que los compuestos de origen natural, empleada en la fortificación de alimentos y elaboración de suplementos (Imbard y cols., 2013).

Los folatos están involucrados en la transferencia de unidades de un carbono (grupos metilo) a moléculas relacionadas con la síntesis *de novo* de nucleótidos de ADN y también aseguran niveles adecuados de S-adenosilmetionina (SAM), la principal molécula donante de grupos metilo para su transferencia al ADN, histonas y otras proteínas metiladas (Lucock, 2000). La metilación del ADN es un mecanismo epigenético que modula la expresión génica en eventos tempranos, tal como la migración de células de la cresta neural a primordios faciales, o eventos tardíos del desarrollo craneofacial, como condrogénesis y palatogénesis (Lucock, 2000; Jones y Takai, 2001).

La perturbación de cualquier parte de las vías del metabolismo del folato podría resultar en una deficiencia franca de esta vitamina, con el efecto posterior de interrumpir procesos biológicos importantes, como el desarrollo craneofacial. Además, el déficit de folatos genera un aumento en los niveles de homocisteína (Bailey y Gregory, 1999; McNulty y cols., 2012), que se relaciona con severas alteraciones en el desarrollo embrionario (Imbard y cols., 2013).

1.6.1. Metabolismo del folato / ácido fólico

El metabolismo de folato / ácido fólico es probablemente el mejor ejemplo de interacción genética - ambiental en la etiología de las fisuras labio palatinas no sindrómicas (Bhaskar y cols., 2011).

Los folatos que provienen de la dieta consisten principalmente en 5-metiltetrahidrofolato (5-metilTHF) y 10-formiltetrahidrofolato (10-formilTHF) en sus formas poliglutamadas. Sin embargo, en el intestino se requiere que los poliglutamatos se hidrolicen en monoglutamatos para ser absorbidos (Beaudin y Stover, 2009). Luego de una serie de pasos se produce 5-metilTHF-monoglutamato, principal forma circulante en la sangre (Blom y cols., 2006), el cual es captado por las células, transformándose y acumulándose en forma de poliglutamato. Los folatos poliglutamados no atraviesan las membranas y de esta manera quedan retenidos en la célula. También tienen una mayor afinidad por las enzimas involucradas en el metabolismo del folato que sus contrapartes monoglutamatos (Imbard y cols., 2013).

En la célula, el 5-metilTHF puede donar un grupo metilo para la remetilación de la homocisteína (Hcy) en metionina y tetrahidrofolato (THF), reacción catalizada por la metionina sintasa (MTR) que usa cobalamina (vitamina B12) como cofactor (Li y cols., 1996).

Desde la vía de remetilación, el THF resultante se puede convertir directamente en 5,10-metilenTHF por la acción de la enzima citosólica serina hidroximetiltransferasa (SHMT1) (Imbard y cols., 2013). Luego, la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), que es una enzima dependiente de riboflavinas (vitamina B2), cataliza irreversiblemente 5,10 metilenTHF a 5-metilTHF (Skibola y cols., 2002). El 5-metilTHF es necesario para la remetilación de la homocisteína y la posterior síntesis de S-adenosil-metionina (SAM), principal donante de grupos metilo para la metilación de ADN, proteínas, lípidos o neurotransmisores (Field y cols., 2007). Si se dispone de cantidades inadecuadas de 5-metilTHF o cobalamina, la homocisteína se acumula y puede afectar actividades del desarrollo, como la

movilidad y migración de las células de la cresta neural, que son importantes en el desarrollo temprano (Brauer y Tierney, 2004).

1.7. Polimorfismos genéticos del metabolismo del folato y su asociación con FL/PNS

Existen alrededor de 50 genes que codifican productos involucrados en el transporte y metabolismo del folato y varios de ellos representan polimorfismos de riesgo para FL/PNS (Bhaskar y cols., 2011; Blanton y cols., 2011), entre ellos destacan los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) de los genes *MTR*, *SHMT1* y *MTHFR*. Cada SNP presenta un alelo mayor y un alelo menor, de acuerdo con la frecuencia alélica en cierta población. El alelo mayor es aquel más frecuente en un SNP de una población determinada, por lo que el alelo menor es el menos frecuente en la población. Por otro lado, se define como alelo de riesgo aquel alelo que se asocia de manera estadísticamente significativa con el riesgo de tener una enfermedad en estudio. Generalmente, el alelo menor suele ser considerado como el alelo de riesgo, debido a que la mayoría de las personas no porta este alelo; sin embargo, pueden existir excepciones donde el alelo mayor sea el de riesgo.

5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa (*MTR*)

El gen *MTR* codifica para la enzima conocida como metionina sintasa (MS o MTR) dependiente de cobalamina (vitamina B12) (Lucock y cols., 2000), cataliza la remetilación de homocisteína a metionina usando 5-metilTHF. Se ha informado que polimorfismos en el gen de *MTR* actúan como factor de riesgo para defectos del tubo neural (Wang y cols., 2015).

Un estudio reciente realizado en Chile reportó tres SNP intrónicos del gen *MTR*: rs10925239, rs10925254 y rs3768142 como marcadores protectores contra FL/PNS en la población chilena (Salamanca y cols., 2020a), sin embargo, estos se ubican en zonas no codificantes lejanas de los sitios de *splicing* y posteriormente son eliminados. De ahí la necesidad de estudiar variantes funcionales de este gen, ubicadas en regiones codificantes o regulatorias de este, donde sea más claro el potencial rol del polimorfismo sobre la función génica y que se hayan asociado al riesgo de FL/PNS en otras poblaciones. Una variante previamente descrita y

asociada con FL/PNS en otras poblaciones es el SNP rs1805087 (A>G) de *MTR* (Mostowska y cols., 2006; Chorna y cols., 2011; Wang y cols., 2016). Este cambio genera una variación en la proteína (Asp919Gly), la que se postula que incrementa la actividad de la enzima dado que los portadores del alelo G presentan bajos niveles circulantes de homocisteína y altos de folatos en comparación a los portadores del alelo A (Wang y cols., 2016). Además, los sujetos de genotipo GG presentan un mayor porcentaje de metilación del ADN que los sujetos AA (Goode y cols., 2004).

1.7.1. Metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*)

El gen *MTHFR* codifica para la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), la cual tiene un rol principal en el metabolismo del ácido fólico: cataliza la conversión de 5,10-metilenTHF en 5-metilTHF (Sözen y cols., 2009). Esta es una reacción crucial que proporciona tanto la forma principal circulante de folatos como la disponibilidad de grupos metilo (Matthews y cols., 1998).

Dos polimorfismos codificantes de *MTHFR* han sido ampliamente estudiados: históricamente designados C677T (rs1801133) (Goyette y cols., 1994) y A1298C (rs1801131) (Van der Put y cols., 1998). En el caso del más estudiado, C677T o C>T, el alelo T da como resultado una sustitución de alanina a valina en el codón 222 (Ala222Val), lo que da origen a una enzima termolábil (genotipo TT presenta 22% de actividad catalítica residual en la exposición a 46°C versus 67% del genotipo CC) (Frosst y cols., 1995; Yamada y cols., 2001). Los portadores del genotipo TT muestran bajos niveles de folato en plasma y altos niveles de homocisteína (Frosst y cols., 1995; Molloy y cols., 1998). En una población chilena se evaluó el papel de *MTHFR* C677T (rs1801133) en la expresión de FL/PNS, observándose que los portadores del genotipo TT versus los portadores CC + CT (modelo recesivo) aumentaron significativamente el riesgo de FL/PNS, concluyendo que el alelo T de la descendencia es un factor de riesgo real para la aparición de FL/PNS en Chile (Ramírez y cols., 2016).

1.7.2. Serina hidroximetiltransferasa citosólica (*SHMT1*)

SHMT1 es un gen que codifica la enzima citoplasmática serina hidroximetiltransferasa (SHMT1), la cual cataliza la conversión reversible de serina y THF a glicina y 5,10-metilenTHF (Skibola y cols., 2002). Esta reacción proporciona unidades de un carbono para la síntesis de purina, timidilato y metionina, que son esenciales durante las etapas de alta tasa proliferativa del desarrollo embrionario.

El primer estudio de asociación entre SNPs de *SHMT1* y FL/PNS en una población chilena, detectó una asociación con la variante rs1979277 (G>A). El alelo A mostró un efecto protector contra este defecto de nacimiento (Salamanca y cols., 2020b). Esta variante da como resultado una sustitución de leucina a fenilalanina en el residuo 474 de la proteína (Leu474Phe) (Anderson y Stover, 2009). Se ha descrito que las madres que portan el genotipo AA tienen niveles más bajos de homocisteína plasmática y recuentos más altos de folatos tanto en glóbulos rojos como en plasma, en comparación a madres con genotipo GG (Heil y cols., 2001). Con estos antecedentes, fue sugerido que una baja actividad enzimática puede aumentar la concentración citoplasmática de folatos y, por lo tanto, explicarían su papel protector contra las FL/PNS (Salamanca y cols., 2020b).

La evidencia antes expuesta muestra que los genes *MTR*, *SHMT1* y *MTHFR* codifican enzimas que interactúan en el metabolismo del folato y además presentan variantes asociadas a fisuras labio palatinas no sindrómicas. Esto teniendo en cuenta la naturaleza genética compleja de estas malformaciones. Sin embargo, estas variantes sólo se han estudiado en forma individual. Es por ello que el propósito del presente estudio es analizar la interacción gen-gen entre los polimorfismos *MTR* rs1805087 (A>G), *MTHFR* rs1801133 (C>T) y *SHMT1* rs1979277 (G>A) y el riesgo de FL/PNS en una población chilena, para contribuir con posibles nuevos marcadores y en un futuro poder realizar asesoramiento genético en familias que presentan una historia previa de este defecto. Con ello también se podrían promover intervenciones dietarias que impacten en el consumo de donadores de grupos metilo en madres portadoras de estas variantes.

2. HIPÓTESIS

El riesgo de fisuras labio palatinas no sindrómicas en la población chilena está asociado a la interacción entre variantes polimórficas de los genes *MTR* (rs1805087), *MTHFR* (rs1801133) y *SHMT1* (rs1979277) que participan del metabolismo de folatos/ácido fólico y es modificado por el sexo de los sujetos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Determinar la existencia de interacción entre variantes polimórficas de los genes *MTR* (rs1805087), *MTHFR* (rs1801133) y *SHMT1* (rs1979277) con y sin ajuste por sexo de los individuos en el riesgo de fisuras labio palatinas no sindrómicas en Chile.

3.2. Objetivos Específicos

1. Determinar la existencia de interacción entre las parejas de polimorfismos de los genes *MTR-MTHFR*, *MTHFR-SHMT1* y *MTR-SHMT1*, involucrados en el metabolismo de folatos / ácido fólico, en el riesgo de fisuras labio palatinas no sindrómicas en una población chilena.
2. Determinar la existencia de interacción simultánea entre polimorfismos de los genes *MTR-MTHFR-SHMT1* involucrados en el metabolismo de folatos / ácido fólico, en el riesgo de fisuras labio palatinas no sindrómicas en una población chilena.
3. Determinar el efecto del sexo de los individuos en la interacción entre polimorfismos de los genes *MTR*, *MTHFR* y *SHMT1*, involucrados en el metabolismo de folatos / ácido fólico, en el riesgo de fisuras labio palatinas no sindrómicas en una población chilena.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Sujetos

Las muestras de casos y de controles considerados para este estudio son aquellos cuyos genotipos se encontraban disponibles en la base de datos del Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de Chile (muestra por conveniencia).

La muestra de casos está conformada por 260 individuos., estos fueron reclutados durante los años 2017 y 2018, entre pacientes con FL/PNS en diferentes hospitales de la región Metropolitana: San Borja Arriarán, Roberto del Río, Exequiel González Cortés y la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Entre los casos, el 40% son del sexo femenino y un 31% tiene historia familiar previa de FL/Ps. 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 Ética 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 de estos hospitales que tuvieran FL/P (fisura de labio con o sin fisura de paladar) uni o bilaterales, y que no estuviesen asociadas a un síndrome u otra malformación, en base al diagnóstico de un médico genetista. Los criterios de exclusión usados fueron pacientes cuyas madres hayan estado expuestas durante su embarazo a alguno de los factores conocidos causantes de fisuras labio palatinas (consumo de warfarina, fenitoína y alcohol) y que el paciente sea extranjero o tenga padres y/o abuelos extranjeros.

Respecto a la muestra control, conformada por 346 individuos (43% del sexo femenino), estos fueron reclutados entre los donantes de los Bancos de Sangre del Hospital San José y Hospital San Juan de Dios, y los pacientes de la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile durante los años 2017 y 2019. Se incluyeron a sujetos chilenos, de progenitores chilenos sin fisuras labio palatinas. Se excluyeron a sujetos con antecedentes familiares de fisuras labio palatinas hasta tercer grado de parentesco. A todos los participantes

se les tomó una muestra de hisopado bucal, las que se enviaron al Biobanco de Tejidos de la Universidad de Chile (BTUCH), en donde se extrajo el DNA genómico y se almacenaron.

4.2. Obtención de los genotipos de los polimorfismos rs1805087, rs1801133 y rs197927

Desde un array Illumina que contiene más de 600.000 SNPs (Infinium iSelect 24x1 HTS BeadChip), procesado en ERAMUS MC University Rotterdam en Holanda, se extrajeron los genotipos de los polimorfismos de las variantes seleccionadas: *MTR* (rs1805087, Asp919Gly), *MTHFR* (rs1801133, Ala222Val) y *SHMT1* (rs1979277, Leu474Phe), tanto en los casos como en los controles.

4.3. Análisis Estadístico

Las frecuencias alélicas para estos tres polimorfismos fueron estimadas utilizando proporciones simples en casos y controles. La distribución de las frecuencias genotípicas en la muestra control de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg fue evaluada mediante una prueba de *chi*-cuadrado exacto, implementada en el paquete STATA 15.

La interacción entre pares de variantes fue evaluada mediante un modelo de interacción en escala aditiva (Dayal, 1980) en el que se evalúa las diferencias de distribución de las combinatorias de alelos de ambas variantes entre casos y controles, en el total de la muestra y separados por sexo. Para cada pareja de variantes, se calculó el odds ratio (OR) y su intervalo de confianza del 95%. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

La interacción para las tres variantes genéticas en forma simultánea se basó en el método *multifactor dimensionality reduction* (MDR), utilizando el software MDR 3.0.2 (Hahn y cols., 2003) (<http://www.multifactor dimensionality reduction.org/>). Este algoritmo consta de cuatro pasos que se repiten 10 veces, dividiendo los datos para 10 conjuntos diferentes de entrenamiento y prueba. La coherencia de validación cruzada se define cuando se detecta el mismo factor (o modelo) particular en al menos nueve de cada 10 de las réplicas (Stephens y cols., 2001; Ritchie y cols., 2001; Ritchie y cols., 2003). Se consideró que los resultados de MDR son

estadísticamente significativos con un $p < 0.05$. Esta interacción se evaluó inicialmente sin considerar el sexo de los individuos y luego ajustando por sexo. Para cada combinatoria genotípica individual, la diferencia en la proporción entre casos y controles fue evaluada aplicando una prueba de Z, implementada en el paquete STATA 15.

5. RESULTADOS

La distribución de genotipos de los tres polimorfismos en la muestra de controles no se alejó de lo esperado de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 1).

Tabla 1: Distribución de genotipos de polimorfismos (SNP) de los genes *MTR*, *MTHFR* y *SHMT1*, involucrados en el ciclo del folato, en la muestra de controles de una población chilena.

Polimorfismo	Alelo	Genotipos	N° de Controles	p-value HW
	Mayor / Menor			
<i>MTR</i> (rs1805087)	A / G	AA	228	0,717
		AG	107	
		GG	11	
<i>MTHFR</i> (rs1801133)	C / T	CC	115	0,210
		CT	178	
		TT	52	
<i>SHMT1</i> (rs1979277)	G / A	GG	186	0,343
		GA	122	
		AA	26	

Nota: HW Hardy-Weinberg

La estimación de frecuencias alélicas en los polimorfismos de *MTR*, *MTHFR* y *SHMT1* en casos y controles, tuvo como resultado que no hay diferencias en las frecuencias del alelo menor para ninguno de ellos entre estos dos grupos (Tabla 2).

Tabla 2: Distribución de frecuencias alélicas de polimorfismos (SNP) de los genes *MTR*, *MTHFR* y *SHMT1*, involucrados en el ciclo del folato en casos de FL/PNS y controles de una población chilena.

Gen	SNP	Frecuencia alelo menor		p-value
		Caso	Control	
<i>MTR</i>	rs1805087	0,197	0,186	0,669
<i>MTHFR</i>	rs1801133	0,464	0,409	0,058
<i>SHMT1</i>	rs1979277	0,217	0,261	0,075

El análisis de interacción entre pares de polimorfismos genéticos en el total de la muestra evidencia la presencia de interacción en la combinatoria *MTR-SHMT1*, la

cual disminuye el riesgo de presentar FL/PNS de forma significativa (OR 0,60; IC 95% 0,36 – 0,98; $p = 0,022$), tal como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3: Interacción entre pares de polimorfismos (SNPs) de los genes *MTR*, *MTHFR* y *SHMT1* en el riesgo de FL/PNS en una población chilena.

Combinatoria	OR (IC 95%)	p-value
<i>MTR</i> – <i>MTHFR</i>	1,34 (0,81 – 2,21)	0,928
<i>MTHFR</i> - <i>SHMT1</i>	0,88 (0,54 – 1,43)	0,600
<i>MTR</i> - <i>SHMT1</i>	0,60 (0,36 – 0,98)	0,022

Nota: OR (IC del 95%) odds ratio con intervalo de confianza del 95%.

A diferencia de la interacción entre pares de genes para la muestra total, el mismo análisis considerando el sexo de los individuos no presentó resultados estadísticamente significativos para ninguna de las parejas de variantes (Tabla 4).

Tabla 4: Interacción entre pares de polimorfismos (SNPs) de los genes *MTR*, *MTHFR* y *SHMT1* en el riesgo de FL/PNS en una población chilena, considerando el sexo de los sujetos.

Combinatoria	Mujeres		Varones	
	OR (IC 95%)	p-value	OR (IC 95%)	p-value
<i>MTR</i> - <i>MTHFR</i>	0,84 (0,39 – 1,81)	0,287	1,92 (0,97 – 3,77)	0,568
<i>MTHFR</i> - <i>SHMT1</i>	1,19 (0,56 – 2,51)	0,829	0,71 (0,37 – 1,35)	0,683
<i>MTR</i> - <i>SHMT1</i>	0,72 (0,33 – 1,57)	0,126	0,53 (0,25 – 1,10)	0,061

Nota: OR (IC del 95%) odds ratio con intervalo de confianza del 95%.

Con respecto al objetivo 2, el análisis de interacción considerando los tres genes simultáneamente en el panorama global no presenta una diferencia significativa ($p = 0,180$, Tabla 5), pero al observar cada una de las combinatorias por genotipos encontramos una diferencia en su distribución entre casos y controles. En la Tabla 5 se observa que la combinatoria de genotipos GG-CT-GG, de los polimorfismos de los genes *MTR*, *MTHFR* y *SHMT1* respectivamente, presentaron una interacción estadísticamente significativa, en donde esta combinatoria fue más frecuente en casos que en controles (ratio 6,00; $p = 0,021$). Para las demás combinatorias no se observaron diferencias significativas.

Tabla 5: Interacción global y por combinatoria de genotipos para polimorfismos de los genes *MTR*, *MTHFR* y *SHMT1*, en el riesgo de FL/PNS en una población chilena.

Combinatoria de genotipos <i>MTR</i>, <i>MTHFR</i>, <i>SHMT1</i>	Casos (n = 260)	Controles (n = 346)	Caso/Control Ratio	Z-test p-value
AA, CC, GG	27	36	0,75	0,992
AA, CC, GA	10	24	0,41	0,101
AA, CC, AA	7	8	0,87	0,764
AA, CT, GG	48	73	0,65	0,423
AA, CT, GA	29	36	0,80	0,771
AA, CT, AA	4	9	0,44	0,373
AA, TT, GG	22	18	1,22	0,109
AA, TT, GA	15	12	1,25	0,173
AA, TT, AA	2	2	1,00	0,771
AG, CC, GG	19	22	0,86	0,645
AG, CC, GA	6	17	0,35	0,096
AG, CC, AA	1	2	0,50	0,727
AG, CT, GG	26	25	1,04	0,222
AG, CT, GA	11	22	0,50	0,254
AG, CT, AA	2	1	2,00	0,406
AG, TT, GG	10	6	1,66	0,107
AG, TT, GA	4	8	0,50	0,496
AG, TT, AA	2	3	0,66	0,896
GG, CC, GG	3	3	1,00	0,726
GG, CT, GG	6	1	6,00	0,021
GG, CT, GA	0	2	0,00	0,218
GG, CT, AA	0	1	0,00	0,384
GG, TT, GG	1	2	0,50	0,727
GG, TT, GA	0	1	0,00	0,384

Nota: P-value para la interacción global = 0,180.

Con relación al objetivo 3, de acuerdo con el análisis separado por sexo (Tabla 6) no se observan diferencias significativas en el panorama global ($p = 0,337$). Sin embargo, en el análisis por cada combinatoria genotípica nuevamente se observa un resultado significativo para la combinatoria GG-CT-GG en mujeres ($p = 0,015$), pero no así en varones ($p = 0,435$). Además, sólo en varones hubo presencia de interacción significativa en las combinatorias AA-CC-GA, más frecuente en

controles que en casos (ratio 0,31; $p = 0,034$), y para AG-CT-GG (ratio 1,70; $p = 0,042$) y AG-TT-GG (ratio 4,0; $p = 0,021$), con mayor frecuencia en casos que en controles, para los polimorfismos de los genes *MTR*, *MTHFR* y *SHMT1* respectivamente.

Tabla 6: Interacción global y por combinatoria de genotipos para polimorfismos de los genes *MTR*, *MTHFR* y *SHMT1*, considerando el sexo de los sujetos, en el riesgo de FL/PNS en una población chilena.

Combinatoria de genotipos	Mujeres				Varones			
	Casos (n = 104)	Controles (n = 150)	Caso / Control Ratio	Z-test p- value	Casos (n = 156)	Controles (n = 196)	Caso / Control Ratio	Z-test p-value
AA, CC, GG	12	17	0,70	0,960	15	19	0,78	0,984
AA, CC, GA	4	5	0,80	0,825	6	19	0,31	0,034
AA, CC, AA	5	3	1,66	0,207	2	5	0,40	0,395
AA, CT, GG	14	28	0,50	0,271	34	45	0,75	0,794
AA, CT, GA	13	20	0,65	0,849	16	16	1,00	0,496
AA, CT, AA	2	1	2,00	0,362	2	8	0,25	0,116
AA, TT, GG	9	9	1,00	0,417	13	9	1,44	0,149
AA, TT, GA	7	4	1,75	0,118	8	8	1,00	0,638
AA, TT, AA	1	1	1,00	0,794	1	1	1,00	0,872
AG, CC, GG	6	9	0,66	0,936	13	13	1,00	0,541
AG, CC, GA	2	10	0,20	0,080	4	7	0,57	0,589
AG, CC, AA	1	1	1,00	0,794	0	1	0,00	0,373
AG, CT, GG	9	15	0,60	0,718	17	10	1,70	0,042
AG, CT, GA	6	13	0,46	0,389	5	9	0,55	0,509
AG, CT, AA	2	0	infinito	0,087	0	1	0,00	0,373
AG, TT, GG	2	4	0,50	0,703	8	2	4,00	0,021
AG, TT, GA	1	3	0,33	0,515	3	5	0,60	0,696
AG, TT, AA	1	0	infinito	0,230	1	3	0,33	0,435
GG, CC, GG	0	2	0,00	0,238	3	1	3,00	0,214
GG, CT, GG	4	0	infinito	0,015	2	1	2,00	0,435
GG, CT, GA	0	1	0,00	0,406	0	1	0,00	0,373
GG, CT, AA	0	0	0,00	0,000	0	1	0,00	0,373
GG, TT, GG	1	0	infinito	0,230	0	2	0,00	0,204
GG, TT, GA	0	0	0,00	0,000	0	1	0,00	0,373

Nota: P-value para la interacción global en mujeres = 0,635 y en varones = 0,560.

6. DISCUSIÓN

En el desarrollo embrionario del rostro interactúan una amplia gama de factores que abarcan la diferenciación celular, el crecimiento, la apoptosis, la adhesión de célula a célula y la señalización inter e intracelular. La alteración de uno o más de estos factores, por causas genéticas, ambientales o mixtas pueden repercutir en el desarrollo de malformaciones craneofaciales como las FL/PNS (Prescott & Malcolm, 2002). Un factor ampliamente estudiado ha sido el folato / ácido fólico, el cual actúa como donante y aceptor de unidades de carbono en procesos como la remetilación de homocisteína a metionina, síntesis de ácidos nucleicos y aminoácidos y metilación del ADN, que son necesarios para la división celular, la expresión génica y el mantenimiento de la estructura cromosómica durante el desarrollo fetal (Goyette y cols., 1994; James y cols., 1999; Bailey & Gregory, 1999). Por esta razón, en Chile se han desarrollado medidas preventivas como la suplementación con ácido fólico a mujeres en el periodo periconcepcional y la fortificación de la harina de trigo con ácido fólico. Sin embargo, no se han logrado cambios significativos en la prevalencia de FL/PNS (Nazer & Cifuentes, 2014). Por lo tanto, podríamos considerar que en Chile, la principal causa de FL/PNS no es la disponibilidad de ácido fólico; lo que se ha demostrado en un reciente artículo en que mujeres chilenas en edad gestacional presentan niveles adecuados de folatos plasmáticos (Busso y cols., 2021).

Por ello, nuestra hipótesis global apunta más bien a variantes en genes que regulan el metabolismo de estas vitaminas. Varias líneas de investigación han demostrado una asociación significativa entre polimorfismos de genes que codifican proteínas y enzimas relacionados con el metabolismo del folato y un mayor riesgo de FL/PNS (Herrera y cols., 2016). Sin embargo, debido a la heterogeneidad genética entre poblaciones y los escasos estudios con respecto a esta temática en Chile, es que planteamos el objetivo de determinar la existencia de interacción entre las variantes polimórficas (SNPs) de los genes *MTR* (rs1805087), *MTHFR* (rs1801133) y *SHMT1* (rs1979277) involucrados en el metabolismo del folato y su asociación con el riesgo de fisuras labio palatinas no sindrómicas en una población chilena.

Dentro del primer análisis no hubo diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de alelo menor en casos y controles para ninguno de los tres SNPs

estudiados (Tabla 2). Reportes previos en población chilena han asociado dos de estos polimorfismos con FL/PNS. La variante rs1801133 C>T del gen *MTHFR*, generó un aumento significativo del riesgo de FL/PNS en portadores del genotipo TT, donde dos copias del alelo menor fueron necesarias para aumentar la susceptibilidad del fenotipo (Ramírez y cols., 2016). Mientras que el alelo menor (A) del polimorfismo rs1979277 de *SHMT1* mostró un efecto protector de FL/PNS en una población chilena y los genotipos AA y GA estuvieron más representados en controles que en sujetos afectados (Salamanca y cols., 2020b).

6.1. Interacción entre combinatorias pares de SNPs de los genes *MTR*, *SHMT1* y *MTHFR* en FL/PNS en una población chilena

Utilizando el modelo aditivo se detectó que la interacción entre los SNPs *MTR* (rs1805087) y *SHMT1* (rs1979277) disminuye significativamente el riesgo de presentar FL/PNS en una población chilena ($p: 0,022$) (Tabla 3). Estos resultados pueden interpretarse como que los portadores de dos copias del alelo menor de cada gen tienen el doble de efecto protector en comparación con los heterocigotos (Salanti y cols., 2009). Esto concuerda con el efecto reportado anteriormente para la FL/PNS (Goode y cols., 2004; Wang y cols., 2016; Salamanca y cols., 2020a). La enzima MTR es la encargada de catalizar la remetilación de homocisteína en metionina y THF, por su parte SHMT1 cataliza este THF resultante y lo convierte en 5,10-metilenTHF. Ambos genes y sus enzimas tienen un papel esencial en la posterior formación de SAM, que es el donante de metilo universal para una multitud de reacciones biológicas de metilación. Los alelos menores de ambos SNPs, si bien no se ha demostrado que afecten directamente la actividad enzimática de estas enzimas, se asocian con aumento de niveles circulantes de folatos (Heil y cols., 2001; Wang y cols., 2016). En Chile, tres variantes intrónicas profundas del gen *MTR* resultaron protectoras para FL/PNS (Salamanca y cols., 2020a). Esta evidencia previa apoya nuestros resultados de interacción protectora para la FL/PNS en población chilena.

En este estudio, las demás combinatorias analizadas no mostraron resultados estadísticamente significativos sobre el riesgo de FL/PNS. Una posible explicación es que efectivamente no hay interacción, o bien, que el tamaño muestral utilizado

no fue el adecuado para detectar diferencias estadísticas. Para detectar interacciones gen-gen se requieren tamaños de muestra de tres a cuatro veces mayores que el análisis de asociación de un solo gen (Wang & Zhao, 2003). Por esta razón, sería recomendable aumentar el tamaño muestral en futuras investigaciones y de esta forma confirmar o descartar interacciones genéticas que se asocien con el riesgo de FL/PNS.

La interacción estadística se puede evaluar tanto en una escala aditiva (riesgo absoluto) como multiplicativa (riesgo relativo). Varios epidemiólogos han argumentado que la interacción biológica debe evaluarse en una escala aditiva en lugar de una escala multiplicativa. La interacción en una escala aditiva significa que el efecto combinado de dos exposiciones es mayor (o menor) que la suma de los efectos individuales de las dos exposiciones. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que un efecto de interacción observado puede no tener implicaciones sobre los mecanismos biológicos subyacentes (Mutsert y cols., 2009; Knol y cols., 2011).

6.2. Interacción simultánea entre SNPs de los genes *MTR*, *MTHFR* y *SHMT1* en una población chilena

Al analizar la interacción simultánea entre los tres SNPs de esta tesis mediante MDR, observamos que los genotipos GG-CT-GG de los polimorfismos de *MTR*-*MTHFR*-*SHMT1* respectivamente, son significativamente más frecuente en casos que en controles (Tabla 5), aumentando el riesgo de expresión de FL/PNS en una población chilena. Este hallazgo evidencia que, aunque una pequeña porción de la muestra tuvo esta combinatoria de genotipos (Tabla 5), llevar al menos una copia del alelo menor de riesgo (T) de *MTHFR* y dos copias del alelo de riesgo (GG) de *SHMT1* aumenta el riesgo de FL/PNS, incluso en presencia del genotipo protector (GG) de *MTR*. Esto podría mostrar el diferente peso que tienen las variantes en forma individual sobre la actividad de estas enzimas. No obstante, la anterior fue la única combinatoria de genotipos con resultados significativos.

Un estudio similar, evaluó la interacción simultánea entre los SNPs *MTHFR* (rs1801133), *MTR* (rs1805087) y *PEMT* (rs4646406) mediante MDR y reveló una interacción significativa sobre la susceptibilidad a FL/PNS, sin embargo, cuando se

consideraron por separado, ninguno de estos polimorfismos se asoció significativamente con el riesgo de FL/PNS (Mostowska y cols., 2010).

Los métodos basados en haplotipos, como MDR, pueden considerarse más poderosos que los métodos de marcador único para el mapeo de genes de susceptibilidad en trastornos complejos, porque permiten capturar los efectos combinados entre dos o más variantes causales dentro de una región genómica (Hsieh y cols., 2011; Liu y cols., 2008). El enfoque MDR puede detectar evidencia de interacción de alto orden con muestras más pequeñas que otros métodos basados en replicaciones y validación cruzada (Ritchie y cols., 2001, 2003).

6.3. Efecto del sexo de los individuos en la interacción entre polimorfismos de los genes *MTR*, *MTHFR* y *SHMT1* en una población chilena

En cuanto a la interacción entre pares de SNPs ajustada al sexo de los sujetos, no hubo diferencias significativas. El sexo es una variable biológica que tiene impacto en la prevalencia y severidad de FL/PNS en diferentes poblaciones. En Chile se han descrito diferencias cuando los sujetos se estratifican por sexo; en mujeres portadoras del genotipo TT del polimorfismo rs1801133 del gen *MTHFR* aumentó significativamente el riesgo de FL/PNS, así también variantes de los genes *BMP4*, y *MSX1* presentaron dimorfismo sexual para FL/PNS (Suazo y cols., 2010, 2011; Ramírez y cols., 2016).

En los seres humanos, el dimorfismo sexual se observa en la prevalencia, el curso y la gravedad de muchas enfermedades comunes. Estudios sugieren que la arquitectura genética específica del sexo influye en los fenotipos humanos, incluidos los rasgos reproductivos, fisiológicos y patológicos. Muchas enfermedades con origen durante la embriogénesis presentan sesgos sexuales. Los embriones masculinos y femeninos exhiben diferentes susceptibilidades a factores ambientales durante la gestación temprana, incluso antes de que aparezcan las hormonas sexuales, debido a efectos reguladores intrínsecos de la constitución de los cromosomas sexuales. También se cree probable que haya una regulación génica diferencial entre varones y mujeres, particularmente en genes sensibles a esteroides sexuales (Ober y cols., 2008). El rostro humano adulto presenta un

dimorfismo sexual que parece establecerse en los primeros años de vida, pero que podría depender de factores expresados en la vida prenatal (Bulygina y cols., 2006). La evidencia expuesta tiene relación con hallazgos epidemiológicos que muestran diferencia en las frecuencias de FL/PNS entre varones y mujeres.

Al analizar la interacción simultánea entre los tres SNPs ajustados por sexo, no se observa evidencia de interacción a nivel global (Tabla 6). Observando las combinatorias de genotipos GG-CT-GG de los polimorfismos de *MTR-MTHFR-SHMT1* respectivamente, además de aumentar el riesgo de FL/PNS en la muestra global, fue significativamente mayor en mujeres, donde los casos femeninos fueron más frecuentes que los controles (Tabla 6), por lo que el aumento global del riesgo pudo estar influenciado por la frecuencia en mujeres.

En varones, se observó que los genotipos AG-CT-GG y AG-TT-GG de los genes *MTR-MTHFR-SHMT1* respectivamente (Tabla 6), aumentaron significativamente el riesgo de FL/PNS, en concordancia con el resultado anterior la susceptibilidad al fenotipo aumenta cuando se porta una o dos copias del alelo menor en los SNPs *MTR-MTHFR* y dos copias del alelo mayor en *SHMT1*.

Adicionalmente, una combinatoria resultó protectora de FL/PNS en varones, conformada por los genotipos AA-CC-GA de los genes *MTR-MTHFR-SHMT1*, respectivamente (Tabla 6), la cual fue más frecuente en controles varones que en varones afectados. Contrario a los resultados previos, para un efecto protector fueron necesarias dos copias del alelo mayor de los SNPs de *MTR* y *MTHFR* y una copia del alelo menor del SNP *SHMT1*. No hubo otras combinaciones de genotipos con resultados significativos.

Nuestros hallazgos sumados a la evidencia expuesta nos indican que la regulación génica diferencial en varones y mujeres puede tener efectos sobre la interacción entre polimorfismos genéticos involucrados en el metabolismo del folato y en el riesgo de FL/PNS.

Los polimorfismos genéticos tienen distintos comportamientos en el riesgo de FL/PNS cuando se analizan de forma individual, en pares o en tríos. Por lo cual resulta interesante incentivar la investigación sobre el rol y los mecanismos de

interacción de estos y otros polimorfismos genéticos involucrados en el metabolismo del folato y su relación con el riesgo del FL/PNS. Este conocimiento debería ayudar a clasificar los contribuyentes genéticos de FL/PNS y poder en un futuro aplicar clínicamente esta información en población chilena.

El presente estudio tiene ciertas limitaciones y fortalezas que considerar. En cuanto a las limitaciones, el número de polimorfismos seleccionados, a pesar de tener alguna evidencia funcional, no representa necesariamente la variabilidad total de estos tres genes. Como antes se menciona, existen muchos otros genes involucrados en el metabolismo del folato, por lo que los genes evaluados son sólo parte de esta red metabólica. El estudio también estuvo limitado por el tamaño de la muestra de casos y controles. Es importante considerar que para estudios de interacción en pares de genes se requiere de un mayor tamaño muestral que en estudios de asociación, lo que tiene efecto en que algunas combinatorias de genotipos de estas variantes no estarían representadas y, por lo tanto, podría haber interacciones que no se detectaron entre los SNPs y el riesgo de FL/PNS. En este sentido, usando el programa QUANTO, la combinatoria que resultó significativa en el modelo aditivo (*MTR-SHMT1*) arrojó un poder estadístico de 57%, bajo la línea mínima del 80%.

Una fortaleza de este estudio es su novedad en nuestra población. Según nuestro conocimiento es el primer estudio que analiza interacciones entre pares y tríos de polimorfismos genéticos involucrados en el metabolismo del folato / ácido fólico en la población chilena. Además, nuestro estudio analizó las interacciones de tríos de SNPs con el modelo MDR, el cual tiene la ventaja de utilizar interacciones de muchos factores y ha sido considerado como el mejor de su tipo para estudios en modelos genéticos, por tener una mayor precisión equilibrada de prueba, consistencia de validación cruzada y un mayor poder estadístico respecto a otros modelos (Ritchie y cols., 2003).

7. CONCLUSIONES

Se puede concluir, con relación al primer objetivo, que el polimorfismo rs1805087 del gen *MTR* interactúa aditivamente con el polimorfismo rs1979277 del gen *SHMT1*, disminuyendo el riesgo de fisuras labio palatinas no sindrómicas, lo que se traduce en que la interacción entre los alelos menores de ambos polimorfismos tiene un efecto protector para este fenotipo en una población chilena.

En cuanto al segundo objetivo, no se observó evidencia de interacción a nivel global para los tres genes en forma simultánea sobre el riesgo del fenotipo. Sin embargo, se determinó la presencia de interacción entre los genotipos GG-CT-GG, de los SNPs *MTR* (rs1805087), *MTHFR* (rs1801133) y *SHMT1* (rs1979277) respectivamente, la cual aumenta el riesgo de FL/PNS en una población chilena.

Con respecto al tercer objetivo, el sexo de los individuos no tuvo efecto en el riesgo de FL/PNS cuando las combinatorias se analizaron por pares de polimorfismos ni para los tres en forma simultánea a nivel global. No obstante, hubo diferencias en el riesgo cuando los polimorfismos *MTR* (rs1805087), *MTHFR* (rs1801133) y *SHMT1* (rs1979277) interactuaron con sus respectivas combinatorias de genotipos; aumentando el riesgo de FL/PNS en la combinatoria GG-CT-GG en mujeres y AG-CT-GG / AG-TT-GG en varones. Concordando en que la susceptibilidad al fenotipo aumenta cuando se porta una o dos copias del alelo menor en los SNPs *MTR-MTHFR* y dos copias del alelo mayor en *SHMT1*. Por otro lado, la combinatoria AA-CC-GA resultó protectora en varones; la cual, al contrario de los genotipos de riesgo, se caracteriza por contener dos copias del alelo mayor de los SNPs de *MTR-MTHFR* y una copia del alelo menor del SNP *SHMT1*.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, D. D., Stover, P. J. (2009). SHMT1 and SHMT2 are functionally redundant in nuclear de novo thymidylate biosynthesis. *PLoS One*, 4(6), e5839. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005839>
- Bailey, L. B., Gregory, J. F. (1999). Folate metabolism and requirements. *The Journal of Nutrition*, 129(4), 779-782. <https://doi.org/10.1093/jn/129.4.779>
- Beaudin, A. E., Stover, P. J. (2009). Insights into metabolic mechanisms underlying folate-responsive neural tube defects: A minireview. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 85(4), 274-284. <https://doi.org/10.1002/bdra.20553>
- Berk, N. W., Marazita, M. L. (2002). Costs of cleft lip and palate: Personal and societal implications. *Cleft lip and palate: From origin to treatment* (pp. 458-467). Oxford University Press, New York.
- Bhaskar, L. V., Murthy, J., Venkatesh, G. (2011). Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and orofacial clefts. *Archives of Oral Biology*, 56(8), 723-737. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.01.007>
- Blanton, S. H., Henry, R. R., Yuan, Q., Mulliken, J. B., Stal, S., y cols. (2011). Folate pathway and nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 91(1), 50-60. <https://doi.org/10.1002/bdra.20740>
- Blom, H. J., Shaw, G. M., den Heijer, M., & Finnell, R. H. (2006). Neural tube defects and folate: Case far from closed. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(9), 724-731. <https://doi.org/10.1038/nrn1986>
- Brauer, P. R., Tierney, B. J. (2004). Consequences of elevated homocysteine during embryonic development and possible modes of action. *Current Pharmaceutical Design*, 10(22), 2719-2732. <https://doi.org/10.2174/1381612043383692>
- Bulygina, E., Mitteroecker, P., & Aiello, L. (2006). Ontogeny of facial dimorphism and patterns of individual development within one human population. *American Journal of Physical Anthropology*, 131(3), 432-443. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20317>
- Busso, D., Echeverría, G., Passi-Solar, A., Morales, F., Farías, M. y cols. (2021).

- Folate status in women of childbearing age in the Urban Metropolitan Region of Chile: Results from the National Health Survey 2016-2017. *Public Health Nutrition*, 24(3), 385-392. <https://doi.org/10.1017/S1368980020002608>
- Carinci, F., Scapoli, L., Palmieri, A., Zollino, I., Pezzetti, F. (2007). Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: An update. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 71(10), 1509-1519. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2007.06.007>
- Chiego, D. J. (2014). *Principios de histología y embriología bucal con orientación clínica*. 4ta ed. Barcelona: Elsevier.
- Chorna, L. B., Akopian, H. R., Makukh, H. V., Fedoryk, I. M. (2011). [Allelic polymorphism of MTHFR, MTR and MTRR genes in patients with cleft lip and/or palate and their mothers]. *TSitologija i genetika*, 45(3), 51-56.
- Dayal, H. H. (1980). Additive excess risk model for epidemiologic interaction in retrospective studies. *Journal of Chronic Diseases*, 33(10), 653-660. [https://doi.org/10.1016/0021-9681\(80\)90008-9](https://doi.org/10.1016/0021-9681(80)90008-9)
- Dixon, M. J., Marazita, M. L., Beaty, T. H., Murray, J. C. (2011). Cleft lip and palate: Understanding genetic and environmental influences. *Nature Reviews Genetics*, 12(3), 167-178. <https://doi.org/10.1038/nrg2933>
- Elsahy, N. I. (1973). The modified striped Y--a systematic classification for cleft lip and palate. *The Cleft Palate Journal*, 10, 247-250.
- Field, M. S., Szebenyi, D. M. E., Perry, C. A., & Stover, P. J. (2007). Inhibition of 5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 458(2), 194-201. PubMed. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.12.023>
- Frosst, P., Blom, H. J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C. A., y cols. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics*, 10(1), 111-113. <https://doi.org/10.1038/ng0595-111>
- Goode, E. L., Potter, J. D., Bigler, J., & Ulrich, C. M. (2004). Methionine synthase D919G polymorphism, folate metabolism, and colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American*

- Society of Preventive Oncology*, 13(1), 157-162.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-03-0097>
- Goyette, P., Sumner, J. S., Milos, R., Duncan, A. M., Rosenblatt, D. S., y cols. (1994). Human methylenetetrahydrofolate reductase: Isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genetics*, 7(2), 195-200.
<https://doi.org/10.1038/ng0694-195>
- Gropper, S. S., Smith, J. L. (2012). *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. 6ta. Wadsworth: Cengage Learning.
- Hagberg, C., Larson, O., Milerad, J. (1998). Incidence of Cleft Lip and Palate and Risks of Additional Malformations. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 35(1), 40-45.
https://doi.org/10.1597/15451569_1998_035_0040_ioclap_2.3.co_2
- Hahn, L. W., Ritchie, M. D., Moore, J. H. (2003). Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatic*, 19(3), 376-382. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btf869>
- Heil, S. G., Van der Put, N. M., Waas, E. T., den Heijer, M., Trijbels, F. J., y cols. (2001). Is mutated serine hydroxymethyltransferase (SHMT) involved in the etiology of neural tube defects? *Molecular Genetics and Metabolism*, 73(2), 164-172. <https://doi.org/10.1006/mgme.2001.3175>
- Herrera M, J., Muñoz, A. M., & Parra S, B. E. (2016). Factores determinantes del estado nutricional del folato y el rol de la variante genética C677T de la enzima metilen tetrahydrofolato reductasa (MTHFR). *Revista chilena de nutrición*, 43(4), 336-345. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182016000400001>
- Hsieh, A.-R., Hsiao, C.-L., Chang, S.-W., Wang, H.-M., & Fann, C. S. J. (2011). On the use of multifactor dimensionality reduction (MDR) and classification and regression tree (CART) to identify haplotype-haplotype interactions in genetic studies. *Genomics*, 97(2), 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.11.003>
- Imbard, A., Benoist, J.F., Blom, H. J. (2013). Neural tube defects, folic acid and methylation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(9), 4352-4389. <https://doi.org/10.3390/ijerph10094352>
- Jahanbin, A., Shadkam, E., Miri, H. H., Shirazi, A. S., Abtahi, M. (2018). Maternal

- Folic Acid Supplementation and the Risk of Oral Clefts in Offspring. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 29(6), e534-e541. <https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000004488>
- James, S. J., Pogribna, M., Pogribny, I. P., Melnyk, S., Hine, R. J. y cols. (1999). Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70(4), 495-501. <https://doi.org/10.1093/ajcn/70.4.495>
- Jones, P. A., Takai, D. (2001). The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, 293(5532), 1068-1070. <https://doi.org/10.1126/science.1063852>
- Kernahan, D. A. (1971). The striped Y--a symbolic classification for cleft lip and palate. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 47(5), 469-470. <https://doi.org/10.1097/00006534-197105000-00010>
- Kernahan, D. A., & Stark, R. B. (1958). A new classification for cleft lip and cleft palate. *Plastic and Reconstructive Surgery and the Transplantation Bulletin*, 22(5), 435-441. <https://doi.org/10.1097/00006534-195811000-00001>
- Knol, M. J., VanderWeele, T. J., Groenwold, R. H. H., Klungel, O. H., Rovers, M. y cols. (2011). Estimating measures of interaction on an additive scale for preventive exposures. *European Journal of Epidemiology*, 26(6), 433-438. <https://doi.org/10.1007/s10654-011-9554-9>
- Leslie, E. J., Carlson, J. C., Shaffer, J. R., Feingold, E., Wehby, G., y cols. (2016). A multi-ethnic genome-wide association study identifies novel loci for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate on 2p24.2, 17q23 and 19q13. *Human Molecular Genetics*, 25(13), 2862-2872. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw104>
- Li, K., Wahlqvist, M. L., & Li, D. (2016). Nutrition, One-Carbon Metabolism and Neural Tube Defects: A Review. *Nutrients*, 8(11), 741. <https://doi.org/10.3390/nu8110741>
- Li, Y. N., Gulati, S., Baker, P. J., Brody, L. C., Banerjee, R., y cols. (1996). Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Human Molecular Genetics*, 5(12), 1851-1858.

<https://doi.org/10.1093/hmg/5.12.1851>

- Liu, N., Zhang, K., Zhao, H. (2008). Haplotype-association analysis. *Advances in Genetics*, 60, 335-405. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(07\)00414-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(07)00414-2)
- Lu, C., Wang, J.-Y., & Jia, Z.-L. (2019). [Environmental factors of non-syndromic cleft lip and palate]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi = Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi = West China Journal of Stomatology*, 37(5), 547-550. <https://doi.org/10.7518/hxkq.2019.05.018>
- Lucock, M. (2000). Folic acid: Nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Molecular Genetics and Metabolism*, 71(1-2), 121-138. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.3027>
- Lucock, M., Daskalakis, I., Briggs, D., Yates, Z., Levene, M. (2000). Altered folate metabolism and disposition in mothers affected by a spina bifida pregnancy: Influence of 677c → t methylenetetrahydrofolate reductase and 2756a →g methionine synthase genotypes. *Molecular Genetics and Metabolism*, 70(1), 27-44. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.2994>
- Marazita, M. L., Field, L. L., Cooper, M. E., Tobias, R., Maher, B. S., y cols. (2002). Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in China: Assessment of Candidate Regions. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 39(2), 149-156. https://doi.org/10.1597/1545-1569_2002_039_0149_nclwow_2.0.co_2
- Matthews, R. G., Sheppard, C., Goulding, C. (1998). Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase: Biochemistry and molecular biology. *European Journal of Pediatrics*, 157 Suppl 2, S54-59. <https://doi.org/10.1007/pl00014305>
- McNulty, H., Pentieva, K., Hoey, L., Strain, J., Ward, M. (2012). Nutrition throughout life: Folate. *Int J Vitam Nutr Res*, 82(5), 348-354. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000130>
- Millacura, N., Pardo, R., Cifuentes, L., Suazo, J. (2017). Effects of folic acid fortification on orofacial clefts prevalence: A meta-analysis. *Public Health Nutrition*, 20(12), 2260-2268. <https://doi.org/10.1017/S1368980017000878>
- Millard, D. (1967). *Rotation-advancement in wide cleft lips*. Fourth International Congress of Plastic Surgery, Rome.
- Millard, D., & Pigott, R. W. (1969). *Rotation-advancement in wide unilateral lip cleft*.

349.

- Ministerio de Salud., Subsecretaría de Salud Pública., División de Prevención y Control de Enfermedades., Departamento de Salud Bucal. (2015). *Guía clínica AUGE: fisura labiopalatina*. Recuperado de <http://www.repositoriodigital.minsal.cl/handle/2015/509>
- Molloy, A. M., Mills, J. L., Kirke, P. N., Whitehead, A. S., Weir, D. G., y cols. (1998). Whole-blood folate values in subjects with different methylenetetrahydrofolate reductase genotypes: Differences between the radioassay and microbiological assays. *Clinical Chemistry*, *44*(1), 186-188.
- Montenegro, M. A., Rojas, M. (2005). Aspectos Moleculares en la Formación de la Cara y del Paladar. *International Journal of Morphology*, *23*(2), 185-194. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022005000200014>
- Mossey, P., Catilla, E. E. (2003). *Global registry and database on craniofacial anomalies: Report of a WHO Registry Meeting on Craniofacial Anomalies*. Recuperado de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42840>
- Mossey, P. A., Little, J., Munger, R. G., Dixon, M. J., Shaw, W. C. (2009). Cleft lip and palate. *The Lancet*, *374*(9703), 1773-1785. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60695-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60695-4)
- Mossey, P. A., Modell, B. (2012). Epidemiology of oral clefts 2012: An international perspective. En *Cleft Lip and Palate: Epidemiology, Aetiology and Treatment* (Vol. 16, pp. 1-18). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000337464>
- Mostowska, A., Hozyasz, K. K., Wojcicki, P., Dziegelewska, M., & Jagodzinski, P. P. (2010). Associations of folate and choline metabolism gene polymorphisms with orofacial clefts. *Journal of Medical Genetics*, *47*(12), 809-815. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.070029>
- Mutsert, R., Jager, K. J., Zoccali, C., & Dekker, F. W. (2009). The effect of joint exposures: Examining the presence of interaction. *Kidney International*, *75*(7), 677-681. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.645>
- Nazer, J., Cifuentes, L. (2014). [Prevalence of congenital malformations at birth in Chilean maternity hospitals]. *Revista Médica De Chile*, *142*(9), 1150-1156. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872014000900009>
- Ober, C., Loisel, D. A., & Gilad, Y. (2008). Sex-specific genetic architecture of human

- disease. *Nature Reviews. Genetics*, 9(12), 911-922. <https://doi.org/10.1038/nrg2415>
- Prescott, N. J., & Malcolm, S. (2002). Folate and the face: Evaluating the evidence for the influence of folate genes on craniofacial development. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal: Official Publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association*, 39(3), 327-331. https://doi.org/10.1597/1545-1569_2002_039_0327_fatfet_2.0.co_2
- Queiroz Herkrath, A. P., Herkrath, F. J., Rebelo, M. A., Vettore, M. V. (2015). Measurement of health-related and oral health-related quality of life among individuals with nonsyndromic orofacial clefts: A systematic review and meta-analysis. *The Cleft palate-craniofacial journal*, 52(2), 157-172. <https://doi.org/10.1597/13-104>
- Ramírez, 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 Diseases*, 22(7), 703-708. <https://doi.org/10.1111/odi.12533>
- Ritchie, M. D., Hahn, L. W., Roodi, N., Bailey, L. R., Dupont, W. D., y cols. (2001). Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *American Journal of Human Genetics*, 69(1), 138-147. <https://doi.org/10.1086/321276>
- Ritchie, M. D., Hahn, L. W., Moore, J. H. (2003). Power of multifactor dimensionality reduction for detecting gene-gene interactions in the presence of genotyping error, missing data, phenocopy, and genetic heterogeneity. *Genetic Epidemiology*, 24(2), 150-157. <https://doi.org/10.1002/gepi.10218>
- Ruda, J. M., Krakovitz, P., Rose, A. S. (2012). A Review of the Evaluation and Management of Velopharyngeal Insufficiency in Children. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 45(3), 653-669. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2012.03.005>
- Sabbagh, H. J., Hassan, M. H., Innes, N. P., Elkodary, H. M., Little, J., y cols. (2015). Passive smoking in the etiology of non-syndromic orofacial clefts: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116963>
- Salamanca, C., González, P., Recabarren, A. S., Recabarren, P. A., Pantoja, R., y

- cols. (2020a). Genetic variants in S-adenosyl-methionine synthesis pathway and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Chile. *Pediatric Research*. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-0994-3>
- Salamanca, C., González, P., Recabarren, A. S., Recabarren, P. A., Pantoja, R., y cols. (2020b). A SHMT1 variant decreases the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Chile. *Oral Diseases*, 26(1), 159-165. <https://doi.org/10.1111/odi.13229>
- Salanti, G., Southam, L., Altshuler, D., Ardlie, K., Barroso, I. y cols. (2009). Underlying genetic models of inheritance in established type 2 diabetes associations. *American Journal of Epidemiology*, 170(5), 537-545. <https://doi.org/10.1093/aje/kwp145>
- Saleem, K., Zaib, T., Sun, W., Fu, S. (2019). Assessment of candidate genes and genetic heterogeneity in human non syndromic orofacial clefts specifically non syndromic cleft lip with or without palate. *Heliyon*, 5(12). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03019>
- Skibola, C. F., Smith, M. T., Hubbard, A., Shane, B., Roberts, A. C., y cols. (2002). Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood*, 99(10), 3786-3791.
- Sözen, M. A., Tolarova, M. M., Spritz, R. A. (2009). The common MTHFR C677T and A1298C variants are not associated with the risk of non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela. *Journal of Genetics and Genomics*, 36(5), 283-288. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(08\)60116-2](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(08)60116-2)
- Suazo, J., Santos, J. L., Jara, L., & Blanco, R. (2010). Parent-of-origin effects for MSX1 in a Chilean population with nonsyndromic cleft lip/palate. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 152A(8), 2011-2016. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33528>
- Suazo, J., Tapia, J. C., Santos, J. L., Castro, V. G., Colombo, A. y cols. (2011). Risk variants in BMP4 promoters for nonsyndromic cleft lip/palate in a Chilean population. *BMC Medical Genetics*, 12, 163. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-12-163>
- Stephens, M., Smith, N. J., Donnelly, P. (2001). A new statistical method for

- haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, 68(4), 978-989. <https://doi.org/10.1086/319501>
- Teissier, N., Bennaceur, S., & Van Den Abbeele, T. (2016). Tratamiento primario del labio leporino y del paladar hendido. *EMC - Cirugía Otorrinolaringológica y Cervicofacial*, 17(1), 1-14. [https://doi.org/10.1016/S1635-2505\(16\)77703-6](https://doi.org/10.1016/S1635-2505(16)77703-6)
- Van der Put, N. M., Gabreëls, F., Stevens, E. M., Smeitink, J. A., Trijbels, F. J., y cols. (1998). A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: An additional risk factor for neural-tube defects? *American Journal of Human Genetics*, 62(5), 1044-1051.
- Wang, S., Zhao, H. (2003). Sample size needed to detect gene-gene interactions using association designs. *American Journal of Epidemiology*, 158(9), 899-914. <https://doi.org/10.1093/aje/kwg233>
- Wang, Y., Liu, Y., Ji, W., Qin, H., Wu, H., y cols. (2015). Analysis of MTR and MTRR Polymorphisms for Neural Tube Defects Risk Association. *Medicine*, 94(35). <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001367>
- Wang, W., Jiao, X.-H., Wang, X.-P., Sun, X.-Y., & Dong, C. (2016). MTR, MTRR, and MTHFR Gene Polymorphisms and Susceptibility to Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 20(6), 297-303. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2015.0186>
- Wehby, G., Murray, J. C. (2010). Folic Acid and Orofacial Clefts: A Review of the Evidence. *Oral diseases*, 16(1), 11-19. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01587.x>
- Xu, D.P., Qu, W.D., Sun, C., Cao, R.Y., Liu, D.W., y cols. (2018). A Study on Environmental Factors for Nonsyndromic Cleft Lip and/or Palate. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 29(2), 364-367. <https://doi.org/10.1097/SCS.00000000000004214>
- Yamada, K., Chen, Z., Rozen, R., Matthews, R. G. (2001). Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 14853-14858. <https://doi.org/10.1073/pnas.261469998>

9. ANEXOS

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



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 Comejo
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

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



Dr. Eduardo Fernández G.

Presidente **CECE**

DE
ETICA



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

9.2. Anexo 2. Aprobación del Comité Institucional de Bioseguridad.



Comité Institucional de Bioseguridad
Administración Conjunta Campus Norte
FDO N°99

Santiago, 09 de Marzo de 2017.

C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación Fondecyt Regular N°1170805 (2017), titulado "**Nonsyndromic Orofacial Clefts in Chile: The Role of Parental Biomarkers of Folate/One-Carbon Metabolism**". El Investigador Responsable de este proyecto es el Profesor Dr. José Suazo Sanhueza, Académico del Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad Odontología.

Las muestras de sangre y cordón umbilical serán tomadas de sujetos provenientes de los centros de salud mencionados en la metodología del proyecto. Las muestras serán manipuladas para extracción de ADN en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Odontología. El personal técnico que manipulará las muestras se encuentra debidamente entrenado en esta área. Además, ellos estarán bajo la supervisión del Dr. Suazo.

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

Se extiende el presente certificado a solicitud del Dr. Suazo para ser presentado en el Concurso Fondecyt Regular 2017 (Conicyt).

Dr. Mario Chiong
Secretario

Dra. Carla Lozano M.
Presidenta

9.2. Anexo 3. Consentimiento informado.



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 estas 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: _____