



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

“Influencia de factores maternos genéticos y ambientales en el riesgo de fisuras labio-máxilo-palatinas no sindrómicas en Chile”

Nicolás Roberto Marín Guerrero

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José Suazo Sanhueza

Adscrito a Proyecto FONDECYT 1170805

Santiago - Chile 2020



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

“Influencia de factores maternos genéticos y ambientales en el riesgo de fisuras labio-máxilo-palatinas no sindrómicas en Chile”

Nicolás Roberto Marín Guerrero

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José Suazo Sanhueza

Adscrito a Proyecto FONDECYT 1170805

Santiago - Chile 2020

*Dedicado a mis padres,
Virginia y Roberto,
por todo el amor que me han entregado.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi tutor el profesor Dr. José Suazo por permitirme trabajar en este proyecto y además porque desde que inicié este trabajo él siempre estuvo conmigo, tuvo paciencia, preocupación y voluntad, me enseñó con dedicación lo que debía saber para poder realizar esta tesis y siempre se mostró dispuesto a ayudarme en todo lo que necesité.

Al alumno de doctorado Carlos Salamanca por haberme ayudado con la aplicación de los filtros establecidos.

A mis queridos amigos Belén, Pilar, Cote, Juan, Feña, Josefa y Romi, que estuvieron a mi lado, me quisieron, aguantaron y apoyaron durante mis años en la facultad. Doy gracias por haberlos conocido y que ahora sean parte de mi vida.

A mi querida Doris Pinto, por su amor, comprensión, apoyo incondicional y por toda la ayuda que me brindó en incontables ocasiones para escribir este documento.

INDICE

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.1 Fisuras labio-máximo-palatinas	1
1.2 Epidemiología: Prevalencia mundial y en Chile	2
1.3 Desarrollo embrionario de la línea media maxilofacial	3
1.4 Importancia clínica de las FLPMNS	5
1.5 Clasificación de las fisuras orofaciales	7
1.6 Etiología y factores de riesgo	9
1.7 Metabolismo del folato en las FLMPNS	11
2. HIPÓTESIS	16
3. OBJETIVO GENERAL	16
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
5. METODOLOGÍA	17
5.1 Sujetos de estudio	17
5.2 Variables Evaluadas	18
5.3 Métodos estadísticos	19
6. RESULTADOS	20
7. DISCUSIÓN	27
7.1 FLMPNS y factores ambientales maternos	27
7.2 Consumo materno de ácido fólico y FLMPNS	30
7.3 Factores genéticos del metabolismo de folatos en las madres y FLMPNS	30
7.4 Fortalezas y debilidades	31
8. CONCLUSIONES	33
10. ANEXOS Y APÉNDICES	43

RESUMEN

Introducción: Las fisuras labio-máxilo-palatinas no sindrómicas (FLMPNS) son malformaciones congénitas, con etiología multifactorial y de alta prevalencia mundial. En su desarrollo intervienen factores ambientales y genéticos, en donde el metabolismo del folato se hace relevante, describiendo tanto el efecto del genotipo materno de variantes de genes involucradas en dicho metabolismo, como deficiencias de su consumo asociadas al desarrollo de estas malformaciones. El objetivo de esta tesis fue evaluar la asociación entre factores maternos tanto ambientales como genéticos, relacionados con el metabolismo del folato, y su asociación con el riesgo de FLMPNS en Chile.

Material y métodos: Estudio observacional analítico de casos y controles, se incluyeron mujeres chilenas madres biológicas de casos con FLMPNS (n=144) y madres biológicas de controles sanos (n=144). Desde una encuesta epidemiológica se obtuvieron datos sobre: exposiciones a teratógenos, consumo de alcohol o tabaco en cualquier etapa de la vida y durante el embarazo, presencia de enfermedades crónicas, nivel educacional, número de abortos espontáneos, edad de la menarquia y consumo de ácido fólico durante el embarazo. Desde una muestra de ADN genómico se obtuvieron los genotipos de polimorfismos de los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *MTHFD1* en ambos grupos de madres, extraídos desde un array de 600,000 variantes. La asociación entre variantes ambientales y el fenotipo se determinó mediante la prueba de *t* de Student para variables cuantitativas y la prueba de *Z* para variables categóricas y Odds Ratio (OR) con intervalo de confianza de 95% (IC 95%) para variantes genéticas.

Resultados: Respecto a los factores ambientales maternos, se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para: Exposiciones ambientales a teratógenos (OR 2,36; $p < 0,001$); Consumo de alcohol o tabaco en cualquier etapa de la vida (OR 1,61; $p = 0,045$) y nivel educacional (comparado a las madres sin educación) básico completo ($p < 0,001$), técnico profesional completo (OR 0,27; $p = 0,025$), y universitario completo (OR 0,25; $p = 0,030$).

Conclusiones: Por primera vez en Chile, se pudo establecer una asociación entre el aumento del riesgo de tener descendencia que presente FLMPNS y variables maternas ambientales. Sin embargo, luego de la corrección por comparaciones múltiples no se logró demostrar una asociación estadísticamente significativa con las variables genéticas seleccionadas. Se sugiere realizar más estudios en relación a estos factores.

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Fisuras labio-máxilo-palatinas

Las fisuras labiopalatinas se pueden clasificar como fisuras de labio con o sin fisura del paladar (FL/P), las cuales para este trabajo de investigación se denominará dentro de un gran grupo conocido como fisuras labio-máxilo-palatinas (FLMP) (Bhaskar y cols., 2011). Son alteraciones que se dan durante el desarrollo embrionario en el territorio craneofacial y que afectan la estructura y conformación normal de la línea media facial. Además, estas malformaciones son uno de los defectos congénitos más frecuentes en los seres humanos (Dixon y cols, 2011). Las personas con FLMP pueden padecer problemas de deglución, alimentación, lenguaje, audición e integración social. Sin embargo, estas alteraciones pueden ser corregidas mediante cirugías, tratamientos dentales, terapia del habla e intervención psicosocial (Rao y cols, 2016).

Las FLMP pueden desarrollarse en conjunto con un grupo de malformaciones, formando parte de un síndrome (FLMP sindrómicas o FLMPNS), o bien como una anomalía aislada (FLMP no sindrómicas o FLMPNS) (Singh y cols, 2012). Las FLMPNS se pueden asociar con anomalías estructurales adicionales que ocurren fuera de la región de la fisura o un síndrome con etiología genética conocida. Por otra parte, las FLMPNS son una condición aislada, no asociada a otra anomalía reconocible. Originalmente, se pensaba que las FLMPNS eran una condición distinta con su propia etiología genética, separada de todas las formas sindrómicas, sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que ambas condiciones pueden ser extremos opuestos de un espectro amplio de las FLMP. En la actualidad, la mayoría de los estudios sugieren que aproximadamente el 70% de las FLMP son no sindrómicas y el 30% de los casos restantes que son sindrómicos se pueden subdividir en anomalías cromosómicas, síndromes mendelianos reconocibles (producto de teratógenos) y síndromes no categorizados aún (Stanier y cols, 2004).

En las FLMP, el reconocimiento reciente de fenotipos subclínicos, como la úvula bífida y la fisura palatina ha llevado a un aumento en el número de miembros afectados en algunas familias, lo que indica posibles patrones de herencia (Watkins y cols, 2014).

1.2 Epidemiología: Prevalencia mundial y en Chile

Las FLMPNS son las malformaciones craneofaciales de mayor frecuencia mundialmente. En Chile son un gran problema debido a su prevalencia, y sus consecuencias disminuyen la calidad de vida de los individuos afectados y de su entorno familiar (Nazer y cols., 2010). La rehabilitación de estos pacientes representa un alto costo económico por sus tratamientos, debido a que suelen culminar a la edad de 15 años, cuando se les realiza cirugía ortognática (Carrasco y cols., 2011). Las FLMPNS se encuentran entre las malformaciones congénitas más comunes de la cavidad bucal. Si observamos la prevalencia de nacimientos con FLMPNS por cada 1.000 nacidos vivos a nivel mundial, Asia presenta 1,57, luego le sigue América del Norte con 1,56, Europa con 1,55, Oceanía con 1,33, América del Sur con 0,99 y África con 0,57. Los indígenas americanos registran las tasas de prevalencia más altas de 2,62 por 1.000 nacidos vivos, seguidos por los japoneses 1,73 y los chinos 1,56 (Panamonta y cols, 2015).

Las FLMPNS tienen una mayor prevalencia en los hombres, los cuales duplican los casos en relación con las mujeres. Los fenotipos más prevalentes son las fisuras labiales unilaterales representando entre el 80 - 85% de los casos (Setó-Salvia y cols., 2014).

La incidencia estimada de alteraciones congénitas que se relacionan con deformaciones del labio y paladar en Chile es de 1,78 x 1000 nacidos vivos en los hospitales de la región metropolitana y 1,66 x 1000 nacidos vivos en el resto de los hospitales, lo que, proyectado al número de nacimientos anuales, se estima aproximadamente 452 casos nuevos anualmente. Estos se distribuyen geográficamente como un 62% de ellos en las regiones Metropolitana, V y VIII. Se estima una incidencia de 350 nuevos casos al año (Ministerio de Salud, Chile, 2009).

En Chile, la incidencia de esta patología puede variar según la ubicación geográfica y situación socioeconómica, sin embargo, se encuentra fuertemente asociada a un componente genético de origen amerindio (Palomino y cols., 2000).

En Chile la mezcla indígena es de 45,6% en la población total del país. Una correlación y comparación entre los porcentajes de mezcla indígena e incidencia de

fisuras, comprueba la existencia de una mayor frecuencia de fisuras a medida que aumenta el grado de indigenicidad (Sepúlveda y cols.,2008).

1.3 Desarrollo embrionario de la línea media maxilofacial

El desarrollo del labio superior y el paladar depende de 3 procesos biológicos fundamentales: Migración de las células de la cresta neural, la transición de epitelio-mesénquima (TEM) y la formación de las estructuras craneofaciales medias (Rincón y cols., 2012).

El desarrollo embrionario en los humanos de una boca primitiva comienza entre los 28 y 30 días de la gestación, momento en el cual migran células desde las crestas neurales hacia la región anterior en la cara. Durante esta etapa se desarrollan los procesos maxilares superiores e inferiores, los cuales son originados por el primer arco faríngeo y el proceso frontonasal. Éste será al límite superior de la boca primitiva o estomodeo, conjuntamente en las zonas laterales se forman unos engrosamientos de tejido, denominados placodas nasales (Sadler, 2012).

Alrededor de la quinta semana de gestación, las placodas nasales invaginan dando origen a las fosas nasales. Las placodas nasales originan una cresta de tejido que rodea cada fosa nasal para formar los procesos nasales. Las prominencias ubicadas más externamente corresponden a los procesos nasales laterales y las ubicadas en el borde interno serán los procesos nasales mediales (Sadler, 2012).

La formación del labio superior ocurre entre la cuarta y séptima semana del desarrollo embrionario (**figura 1.1**). Los dos procesos maxilares se fusionan con el proceso nasal medial, pero la fusión no se completa hasta que las uniones epiteliales desaparecen por la transformación de las células epiteliales en tejido mesenquimatoso y/o apoptosis, para que posteriormente el mesodermo migre a través de las prominencias ya fusionadas (Jiang y cols, 2006).

Durante la 6° y 7° semana, los procesos maxilares superiores continúan creciendo en dirección hacia medial, produciendo una compresión hacia la línea de los procesos nasales medios, posteriormente desaparece la hendidura que había entre ambos procesos para finalmente lograr la fusión de estos tejidos, formando una

nueva estructura llamada segmento intermaxilar. La región más posterior de esta estructura dará origen al paladar primario (Sadler, 2012).

El paladar primario se forma en torno al desarrollo de las placodas nasales con una rápida proliferación del epitelio lateral y el tejido mesenquimático subyacente (Mossey y cols, 2009). La separación de la cavidad oral de la nasal ocurre por la fusión del proceso frontonasal y los procesos maxilares; para esta fusión se requiere un crecimiento coordinado entre los procesos y la apoptosis del epitelio que forma el puente nasal transitorio (Mangold y cols, 2011).

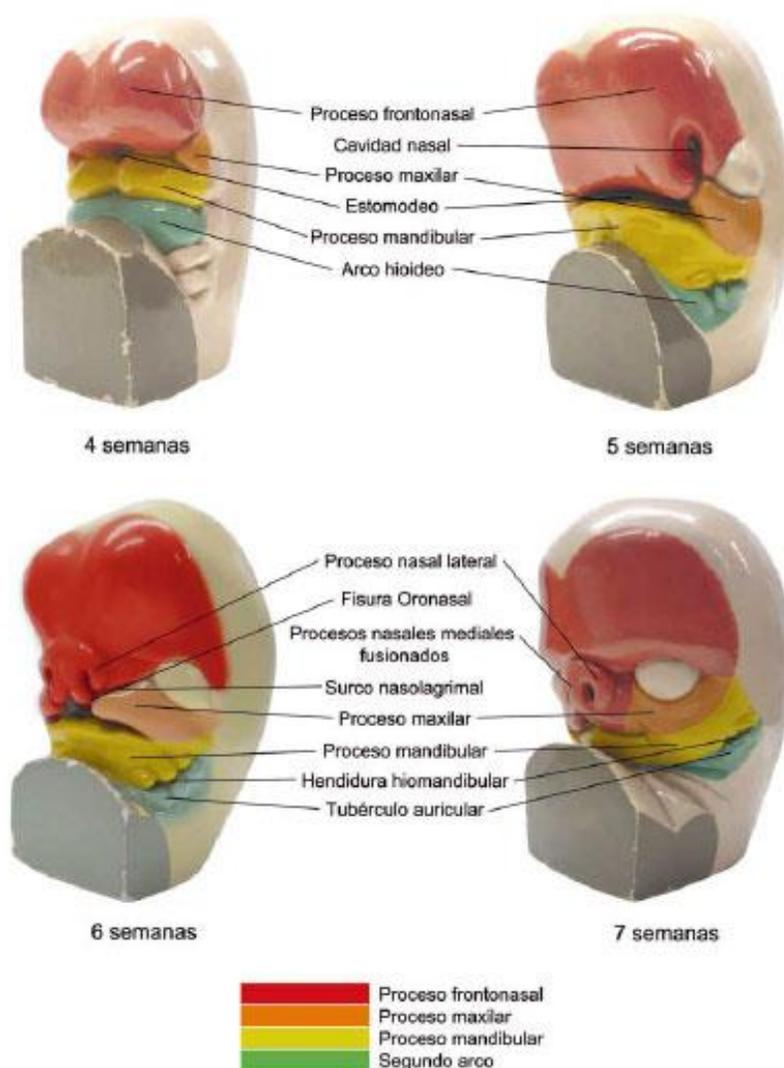


Figura 1.1. Representación de la formación de la cara en el humano entre la 4ta -7ma semana del desarrollo embrionario. Las estructuras embrionarias son destacadas con colores: Rojo: prominencia frontonasal, naranja: proceso maxilar, amarillo: proceso mandibular y verde: segundo arco faríngeo (Meruane y cols., 2012).

La estructura principal del paladar definitivo se compone de dos protuberancias provenientes de los procesos maxilares superiores, aquellas reciben el nombre de crestas palatinas, se desarrollan en su totalidad durante la sexta semana de gestación y se ubican de forma oblicua, hacia abajo y cada lado de la lengua. Durante la séptima semana, estas crestas ascienden y se disponen de manera horizontal, por encima de la lengua, fusionándose y dando origen al paladar secundario (Sadler, 2012).

En la zona anterior, el componente palatino del segmento intermaxilar que corresponde al paladar primario se fusionará hacia posterior con el paladar secundario dando origen al paladar duro y paladar blando (Sadler, 2012).

1.4 Importancia clínica de las FLPMNS

Las FLMPNS se producen como consecuencia de alteraciones en los distintos mecanismos embriológicos que ocurren durante el desarrollo de la región maxilofacial (Palomino y cols., 2000).

Las malformaciones que se producen por causa de las FLMPNS ocasionan que el paciente padezca de variados problemas, como alteraciones en la alimentación, respiración nasal, audición, crecimiento facial, desarrollo dental, fonarticulación, estéticas y psicológicas. La gravedad de estas varía según el compromiso de las diferentes estructuras, como labio superior, arcada dentaria, oclusión, paladar y nariz (Godoy y cols., 2010).

Las células de las crestas neurales corresponden a células multipotentes que son inducidas durante la etapa de gastrulación hacia el borde de la placa neural, entre el ectoderma neural y no neural. Durante la neurulación estas células se especializan en células premigratorias dentro del tubo neural. Posteriormente emergen de este y se someten a una transición epitelio-mesénquima, creándose una lámina desde el neuroepitelio con morfología mesenquimática que migra a diferentes partes del cuerpo para posteriormente diferenciarse en diversos tejidos, dentro de los cuales se encuentran los huesos y cartílagos craneofaciales (Hu y cols., 2014).

Alteraciones en la migración o proliferación de las células de la cresta neural producen diversas malformaciones craneofaciales dentro de las cuales encontramos las FLMPNS (Hall y cols, 1999; Eppley y cols, 2005).

La alteración del tamaño y forma de las prominencias faciales aumentan el riesgo de presentar FLMPNS. Un posible origen de las fisuras es debido a un contacto y fusión insuficiente entre estas prominencias (Juriloff y cols.,2014).

Alteraciones en la unión del proceso maxilar con los procesos nasales mediales van a generar fisuras que involucran labio y estructuras maxilares. Existen fenotipos y manifestaciones clínicas que se relacionan con esta malformación, con características que son definidas por las diferentes estructuras anatómicas involucradas. Por ejemplo, las fisuras complejas que involucran labio y paladar son las que afectan con una mayor extensión de tejido, y son consideradas como severas debido a la necesidad de una rehabilitación multidisciplinaria (Del Prete y cols., 2014).

La fisura del paladar primario ocurre con mayor frecuencia en el límite entre el paladar primario y secundario, a la altura del foramen incisivo el cual separa los incisivos laterales y los caninos. Se han identificado como causales la deficiencia de mesénquima, osificación tardía, disminución del volumen de la premaxila, aumento de apoptosis o aumento de la reabsorción ósea (Burg y cols, 2016).

El cierre y la fusión del paladar secundario requieren interacciones, movimientos y apoptosis a lo largo de los márgenes mediales de los procesos palatinos (Zhou y cols, 2013). La fusión del paladar secundario ocurre desde anterior a posterior, comenzando en el foramen incisivo y concluyendo con la fusión de la úvula (Burg y cols, 2016).

Las fisuras del paladar secundario se pueden originar debido a una alteración en el movimiento de elevación, adhesión y/o fusión de los procesos palatinos, debido a factores genéticos, mecánicos o teratogénicos (Sperber y cols, 2002b).

La formación del paladar duro y blando es posterior al desarrollo embrionario del labio, debido a esto algunos estudios señalan que las fisuras palatinas son una consecuencia de las fisuras labiales (Setó-Salvia y cols., 2014). Sin embargo, otros

estudios indican que ambas malformaciones poseen distintos orígenes embriológicos e independientes (Khandelwal y cols., 2013). Basados en que, si bien los procesos maxilares y palatinos se unen por medio de desmosomas para formar una lámina epitelial, la que posteriormente desaparecerá por la transformación de epitelio-mesénquima (TEM). En el paladar secundario este proceso está regulado por el factor TGF β -3, el cual no está presente en los procesos maxilares o nasales que conformarán al paladar primario, y además en la formación del labio, estarían involucrados otros factores como Shh (Sonic hedgehog) y BMP (proteína morfogenética del hueso) (Rincón y cols.,2012).

1.5 Clasificación de las fisuras orofaciales

Existe poca claridad al referirse a las FLMPNS; algunos autores las definen como deformidades producto de un desarrollo embrionario alterado. Sin embargo, actualmente se considera que una malformación es un defecto en la morfología de un órgano o parte de un órgano, resultado de un proceso de desarrollo anormal. El potencial de desarrollo del órgano involucrado era originalmente normal y debido a un factor extrínseco como una infección, un teratógeno, un trauma, o por factores intrínsecos como deficiencias en la expresión de ciertas proteínas, producen una alteración en el desarrollo que posteriormente continuará de manera anormal (Watkins y cols, 2014).

En 1976, Teissier desarrolló una clasificación anatómica basada en números, se le asignaron números en orden correlativo a las diferentes malformaciones, tomando en consideración su ubicación en referencia a la línea media sagital. Con el fin de orientar, la órbita se dividió en dos lados, la parte inferior bajo el párpado inferior es el sector que corresponde a las fisuras faciales y la parte superior, es decir, sobre el párpado superior, a las fisuras craneales. Las fisuras se enumeran del 0-14, considerando que en la línea media sagital tendríamos el número 0 correspondiente a una hendidura facial de línea media y luego se avanza en sentido contra el reloj, asignando números correlativos a las diferentes fisuras, que van del 0 – 7, para fisuras faciales y del 8 – 14 para fisuras craneales. Existe un patrón esquelético y un patrón de tejido blando que generalmente se corresponden, pero no

necesariamente. Dentro de las fisuras faciales los numero 1-2 y 3 corresponden a las fisuras Labio-maxilo-palatinas (Winters. 2016).

Según la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud en su décima revisión (CIE-2010), agrupa a las FLMPNS dentro de las malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas y las clasifica en 3 tipos de acuerdo con las estructuras anatómicas involucradas: Fisura de paladar, labio leporino y fisura de paladar con labio leporino (ICD, 2010).

Existen múltiples formas anatomo-clínicas que son determinadas por un defecto de fusión en diferentes momentos embriológicos. Estas formas son: La fisura labial pura; labioalveolar; labio-alvéolo-palatina unilateral; labial bilateral; labiopalatina bilateral; velar y velopalatina (Teissier y cols., 2016).

La clasificación internacional de las hendiduras labiales, alveolares y palatinas se basa en principios embriológicos, organizados en grupos:

- Grupo 1: Paladar hendido anterior (primario):
Labio (derecha ± izquierda), alvéolo (derecha ± izquierda).
- Grupo 2: Paladar hendido anterior y posterior (primario y secundario):
Labio (derecha ± izquierda), alvéolo (derecha ± izquierda), alvéolo (derecha ± izquierda).
- Grupo 3: Paladar hendido posterior:
Paladar duro (derecha ± izquierda), paladar duro (velo) (Teissier y cols., 2016)

Si bien existen variadas clasificaciones que permiten comprender las diferentes presentaciones de las FLMPNS los profesionales de la salud tienen dificultad para determinar el grado de severidad de estas, debido a los múltiples fenotipos que se dan en este tipo de malformaciones, ya que se ven implicadas 4 estructuras diferentes: labio, reborde alveolar, paladar duro y paladar blando. Además, se expresa de forma unilateral o bilateral. Por estos motivos, es difícil unificar criterios al momento de establecer qué nomenclatura utilizar para denominar clínicamente la

severidad de las FLMPNS. Una de las formas más utilizadas, basada en la clasificación de Stark y Kernahan, que incluye todas las posibilidades de fisuras de paladar primario y secundario, es una herramienta práctica que utiliza un esquema con forma de “Y” (**figura 1.2**), permitiendo categorizar el tipo de fisura, su extensión y las estructuras que se encuentran afectadas. (Kernahan., 1971).

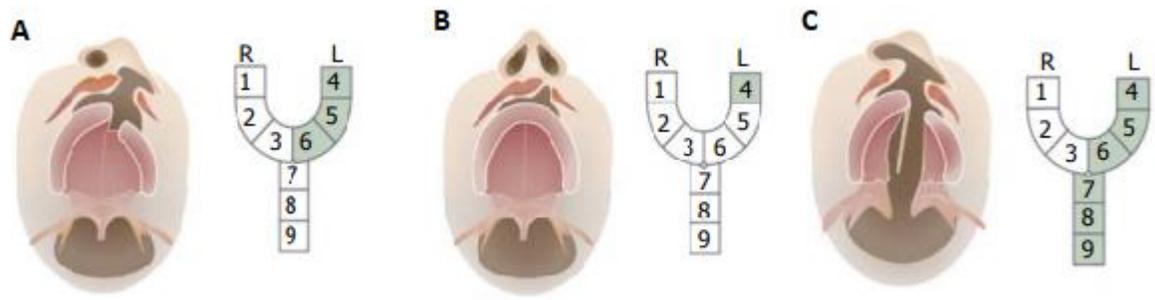


Figura 1.2. Los números del esquema “Y” representan estructuras anatómicas: 1: Labio derecho; 2: Alvéolo derecho; 3: Premaxila derecha; 4: Labio izquierdo; 5: Alvéolo izquierdo; 6: Premaxila izquierda; 7: Paladar duro; 8: Paladar blando; 9: Hendidura submucosa. A: Fisura completa de paladar primario B: Fisura incompleta de paladar blando, C: fisura completa de paladar primario y secundario. (Kernahan., 1971; Smarius y cols., 2017).

1.6 Etiología y factores de riesgo

Si bien en la actualidad se desconoce cuál es la causa específica de las FLMPNS se sabe que tienen una etiología compleja y multifactorial, debido a que los factores genéticos en conjunto con los factores ambientales determinan su riesgo (Cobourne, 2004, Wyszynski y cols, 1997).

Son muchos los factores de riesgo ambientales que pueden afectar de forma negativa al desarrollo embrionario, dentro de los que destacan la edad materna, el tabaquismo, el consumo de alcohol durante el embarazo o un déficit de ácido fólico/folatos en la dieta (Setó-Salvia y cols., 2014).

El tabaquismo durante el embarazo es un factor de riesgo para las FLMPNS. En relación con los mecanismos biológicos de cómo el humo del tabaco afecta el desarrollo fetal, estudios en humanos y de laboratorio demuestran que muchos de los productos químicos que contiene el cigarro pueden cruzar la barrera placentaria y tener un efecto dañino directo en el feto (Hackshaw y cols, 2011).

A pesar de los riesgos, muchas mujeres todavía fuman durante el embarazo, a nivel internacional las cifras indican que en Inglaterra y Gales la prevalencia es de un 17% y en Estados Unidos de un 14%. Esta prevalencia varía con la edad materna y el nivel educativo disminuyendo el porcentaje de forma inversamente proporcional obteniéndose índices de prevalencias menores (Hackshaw y cols, 2011).

En Chile la prevalencia de consumo regular de tabaco durante el embarazo que implicaría un consumo diario o casi diario alcanza un 4,8% en mujeres que están o estuvieron alguna vez embarazadas (SENDA Chile, 2015).

En el caso de consumo materno de alcohol, los estudios clínicos de éste como factor de riesgo para las FLMPNS han sido inconsistentes, aunque se ha demostrado en modelos animales que tiene un efecto disruptivo en las células de la cresta neural, las cuales contribuyen al desarrollo de los labios y el paladar (Burg y cols, 2016).

En Chile, el consumo de alcohol es un gran problema de salud pública, sobre todo cuando se da durante el embarazo, debido a que entre el 20% y el 65% de las mujeres consume en algún momento durante la gestación, existen, inclusive, entre un 5% a 10% de mujeres que consumen en niveles tan altos como para poner en riesgo la vida del feto (Aros, 2008).

En relación con los factores de riesgo genéticos existen variantes de carácter aberrante que son heredadas desde los padres las cuales pueden generar que los individuos sean susceptibles a desarrollar una FLMPNS o ser una causa directa en el desarrollo de esta. (Setó-Salvia y cols., 2014)

Dado que el desarrollo craneofacial es un proceso genéticamente regulado, es que han sido estudiados ampliamente los factores genéticos asociados a las FLMPNS en diferentes poblaciones, pero sólo se ha demostrado que, mutaciones en unos pocos genes, serían causales (Carinci y cols, 2007).

Se han identificado múltiples genes que estarían involucrados en el desarrollo de estas anomalías, dentro de los cuales se incluyen a *IRF6*, *TGFA*, *TGFB3*, *MSX1*, *CRISPLD2*, *MTHFR*, *MTHFD*, *MTR*, *MTRR*, *RFC-1*, *BHMT1*, *BHMT2* y *CBS* (Bhaskar y cols., 2011; Blanton y cols., 2011). A pesar de que los mecanismos de herencia que se ven involucrados aún no son comprendidos en su totalidad, la

evidencia permite considerar que los factores genéticos tienen un rol importante en la aparición de las FLMPNS. Las cuales parecen seguir un mecanismo de herencia que es complejo y multifactorial, con una transmisión vertical impredecible que no responde a modelos mendelianos, por lo tanto, no puede ser explicado a través de modelos genéticos convencionales (Bhaskar y cols., 2011).

1.7 Metabolismo del folato en las FLMPNS

Se ha relacionado a la carencia o deficiencia de folatos con el desarrollo de múltiples defectos congénitos, destacando los defectos del tubo neural (DTN) (Blanton y cols., 2011). La formación del tubo neural y las regiones craneofaciales tienen su origen en las células de la cresta neural, debido a esto se piensa que la deficiencia de ácido fólico también puede contribuir al desarrollo de FLMPNS (Badovinac y cols., 2007; Chevrier y cols., 2007). Sin embargo, aún no se han definido cuáles son los mecanismos involucrados por los que los folatos podrían prevenir estos defectos. (Blanton y cols., 2011).

Desde 1998 en los Estados Unidos, es obligatorio la fortificación de la harina y otros productos de granos con ácido fólico, lo que se tradujo en un efectivo aumento en la concentración de folatos tanto en suero como en eritrocitos en las mujeres en edad fértil. Esta política ha coincidido con una disminución del 19% en la prevalencia de los DTN (Blom y cols., 2006).

En enero de 2000, el Ministerio de Salud de Chile dictaminó la adición de ácido fólico a la harina de trigo para reducir el riesgo de DTN. Esta política igualmente que en otros países resultó en aumentos significativos de folatos en el suero y glóbulos rojos de mujeres en edad fértil al año posterior a la fortificación (Cortés y cols., 2012). Con esta medida disminuyó en un 55% la incidencia de DTN en Chile, y una disminución de 9% de la tasa de egresos hospitalarios de las fisuras labio-palatinas en menores de 1 año (Paulos y cols., 2016).

El término folatos se refiere a un grupo que incluye al ácido fólico y sus derivados, los cuales son obtenidos por medio de alimentos naturales, alimentos fortificados o productos farmacéuticos (Ikeda y cols., 2012). La forma sintética del ácido fólico es el pteroil-L-monoglutámico, el cual es utilizado en la fabricación industrial de suplementos alimenticios (Ikeda y cols., 2012). La forma natural del folato en los

alimentos sin fortificar es una forma reducida, metilada con una cadena de residuos de glutamato. Por esta razón el consumo humano de ácido fólico en la dieta es de poliglutamatos (predominantemente 5-metiltetrahidrofolato (5-metilTHF)) (Ikeda y cols., 2012).

Los folatos desempeñan un papel importante en el metabolismo de un carbono (MUC), en la síntesis de nucleótidos, aminoácidos y en la metilación del ADN, que es esencial para la dinámica de la cromatina y la consiguiente modulación de la expresión génica (Osterhues y cols, 2013).

La absorción de folatos comienza en el lumen del intestino, lugar donde los poliglutamatos de folatos se hidrolizan a monoglutamatos por acción de la enzima glutamato carboxipeptidasa II (GCPII) y son absorbidos en la mucosa intestinal por distintos transportadores de folatos, como el transportador de folato reducido (RFC) y el transportador de folato acoplado a protones (PCFT). En las células de la mucosa intestinal los monoglutamatos son convertidos en 5-metiltetrahidrofolato (5-metilTHF) por la enzima DHFR (Dihidrofolato-reductasa). El 5-metilTHF es transportado a la circulación, siendo la principal forma de folato circulante. La captación periférica de 5-metilTHF circulante está mediada por RFC y por endocitosis mediada por receptores de folato (FR) (Ikeda y cols., 2012).

En los mamíferos la función principal de los folatos es actuar como un sustrato enzimático para la activación química y la transferencia de unidades de un carbono por medio del MUC, el cual es esencial para la biosíntesis de purina y timidilato, al igual que en el metabolismo de los aminoácidos metionina, serina, glicina, cisteína y homocisteína (Ikeda y cols., 2012). Las reacciones del MUC se pueden ver como dos ciclos entrelazados (**figura 1.3**), uno que produce monofosfato de desoxitimidina (dTMP) y precursores de purina para la biosíntesis de ADN (ciclo de ADN), y otro que produce y utiliza el donante del grupo metilo S-adenosilmetionina (SAM) para reacciones de metilación celular (ciclo de metilación) (Laanpere y cols.,2010).

En el ciclo del ADN intervienen las enzimas SHMT1 y MTHD1, las que son las responsables de la formación de 5,10-metilenetetrahidrofolato (5,10-metilen THF), el cual es un intermediario importante debido a que en su formación se obtienen

grupos de un carbono y que por medio de SHMT1 pueden usarse para metilar el monofosfato de desoxiuridina (dUMP) para producir dTMP para la síntesis de ADN. También, pueden ser empleados por MTHD1 para la síntesis de purinas formando 10-formiltetrahidrofolato, o dirigidos hacia el ciclo de metilación mediante síntesis irreversible de 5- metilTHF por metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Finalmente, el uso de folatos para la metilación biológica y la síntesis de nucleótidos resulta muy importante, especialmente cuando el suministro de metilo es inadecuado, como es en casos de déficit de folato (Laanpere y cols.,2010).

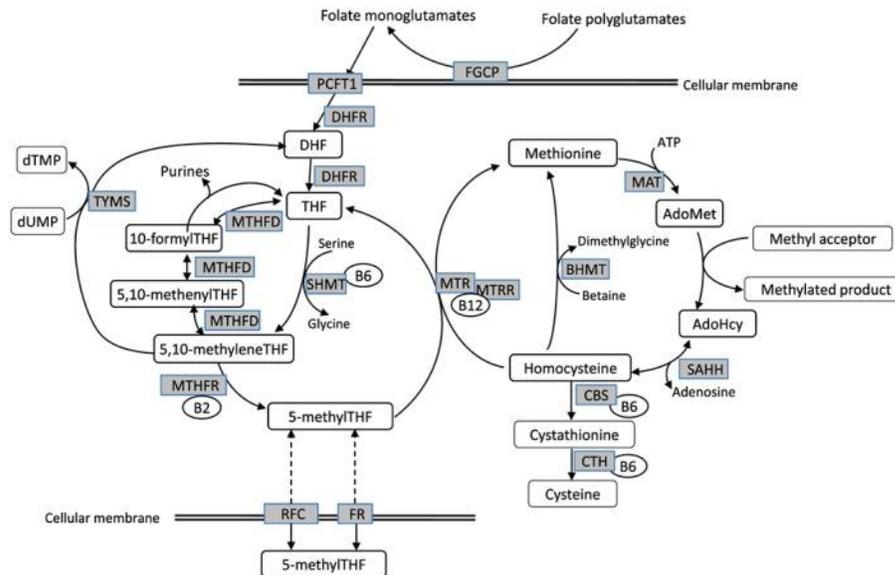


Figura 1.3. Esquema simplificado de la vía del folato y el metabolismo de la homocisteína. AdoHcy, S - adenosilhomocisteína; AdoMet, S - adenosilmetionina; BHMT, betaína homocisteína metiltransferasa; CBS, cistationina β -sintasa; CTH, γ - cistationasa; DHF, dihidrofolato; FGCP, folil poli - γ - glutamato carboxipeptidasa; FR, receptor de folato; MAT, metionina adenosiltransferasa; MTHFD, metilentetrahidrofolato deshidrogenasa; MTHFR, metilentetrahidrofolato reductasa; MTR, metionina sintasa; MTRR, metionina sintasa reductasa; PCFT1, transportador de folato acoplado a protones; RFC, transportador de folato reducido; SAHH, S - adenosilhomocisteína hidrolasa; SHMT, serina hidroximetiltransferasa; THF, tetrahidrofolato; B2, vitamina B2; B6, vitamina B6; B12, vitamina B12 (Hiraoka y cols., 2017).

Estudios muestran que durante el período periconcepcional un consumo diario de 4mg de ácido fólico disminuye el riesgo de presentar defectos congénitos. Sin embargo, niveles elevados de homocisteína en la sangre de madres de niños que padecen de FLMPNS, junto con estudios que asocian el uso materno de ácido fólico y la reducción del riesgo de presentar FLMPNS, hacen suponer que hay genes involucrados en el metabolismo de los folatos que podrían presentar variantes que se asocian al desarrollo de las FLMPNS (Bhaskar y cols., 2011).

En el contexto del metabolismo de folatos y las FLMPNS, también se ha descrito el efecto del genotipo materno de variantes de genes involucradas en dicho metabolismo. Es así como polimorfismos de los genes *MTHFR* (Metilentetrahidrofolato reductasa), *MTHFD1* (Metilentetrahidrofolato deshidrogenasa 1) y *SLC19A1* (miembro número uno, familia 19 de transportador de solutos) tienen una frecuencia mayor en madres de pacientes con FLMPNS u otras malformaciones cráneo-faciales, en relación con madres de niños no afectados, lo que permite inferir que son factores de riesgo materno (Mills y cols, 2008; Bufalino y cols, 2010).

Dentro de la ruta de interconversión de tetrahidrofolato, la *MTHFR* juega un papel central en el metabolismo del folato al convertir de manera irreversible N^5, N^{10} -metileno-tetrahidrofolato en N^5 -metil-tetrahidrofolato que es la forma primaria de circulación del folato. Este producto del metabolismo del folato proporciona los grupos metilos requeridos para la síntesis de metionina, que a su vez participan en la síntesis de S-adenosilmetionina (SAM), el principal donante del grupo metilo en el metabolismo de un carbono (Osterhues y cols, 2013). Se ha descrito una asociación entre el polimorfismo C677T o A1298C a FLMPNS en diversas poblaciones, incluyendo la chilena (Luo y cols., 2012; Ramirez-Chau y cols., 2016). En esta ruta también encontramos a la Metilentetrahidrofolato deshidrogenasa 1, codificada por *MTHFD1* que es otro gen importante en el metabolismo del folato, que se ubica en el cromosoma 14q23.3. La *MTHFD1* es una enzima citoplasmática trifuncional dependiente de NADP que a menudo es denominada "C1-THF sintasa" y desempeña un papel importante en los derivados de un carbono de tetrahidrofolato, que podría derivar en 10-formil-tetrahidrofolato (10-THF), 5,10-metenil-tetrahidrofolato ciclohidrolasa (5,10-metenilTHF ciclohidrolasa) y 5,10-metilentetrahidrofolato deshidrogenasa (5,10-MTHFD) (Wu y cols, 2015). Una variante común de *MTHFD1* es 1958G → A, el cual se ha relacionado con un mayor riesgo de desarrollar FLMPNS. (Beaudin y cols, 2012). Otro gen que participa en el metabolismo del folato es el transportador de folato reducido 1 o *RFC1*, también conocido como miembro 1 de la familia de transportadores de solutos 19 o *SLC19A1* (Vieira y cols, 2005). El *RFC1* cumple un importante rol en metabolismo del folato debido a que es un transportador de la forma activa de este, tanto hacia el interior

de la célula como hacia la circulación (Hiraoka y cols., 2017). El folato es una molécula altamente hidrofílica, por lo tanto, no puede atravesar las membranas biológicas a través de la difusión, cumpliendo la función de intercambiador de aniones orgánico en la absorción de folatos por la acción bidireccional de transportar 5- metiltetrahidrofolato y tiamina monofosfato. El 5-metiltetrahidrofolato es la versión activa del folato que ingresa en las células y que va a constituir la concentración de folato intracelular (Al Mahmuda y cols, 2016).

Las FLMPNS son alteraciones congénitas comunes del desarrollo embrionario de la cavidad bucal, con una fuerte prevalencia en nuestro país, y un origen en donde intervienen factores genéticos y epigenéticos, que al interactuar pueden contribuir al desarrollo de las FLMPNS ya que existen múltiples genes que están involucrados en la aparición de éstas. La interacción de los genes con variados factores ambientales puede inducir a cambios epigenéticos, y un buen ejemplo es el metabolismo del folato (Van Rooij y cols, 2004).

Considerando la alta prevalencia de estas patologías craneofaciales en Chile y su origen multifactorial, se hace importante realizar estudios que permitan conocer que factores las determinan. Es por esto que, con el fin de aportar evidencia sobre el origen de las FLMPNS, este trabajo intenta responder la pregunta de investigación ¿existen factores maternos genéticos y ambientales, relacionados con el metabolismo de folatos, que incrementen el riesgo de fisuras labio-máxilo-palatinas no sindrómicas en la población chilena?

2. HIPÓTESIS

Factores maternos tanto genéticos como ambientales, relativos al metabolismo de los folatos, incrementan el riesgo de fisuras labio-máximo-palatinas no sindrómicas en la población chilena.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de factores maternos genéticos y ambientales, relativos al metabolismo de los folatos, sobre el riesgo de FLMPNS en la población chilena.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Evaluar la asociación entre factores ambientales (teratógenos, nivel educacional, enfermedades crónicas y variables relativas a la reproducción) en la madre y el riesgo de FLMPNS en la población chilena.
- 2) Evaluar la asociación entre consumo materno de ácido fólico durante el embarazo y el riesgo de FLMPNS en la población chilena.
- 3) Evaluar la asociación entre variantes polimórficas de los genes *MTHFR*, *MTHFD1* y *SLC19A1* en madres y el riesgo de FLMPNS en la población chilena.

5. METODOLOGÍA

5.1 Sujetos de estudio

El tamaño muestral, tanto de madres de casos como madres de controles, corresponde al número de muestras y datos de madres disponibles bajo la tutela del Dr. José Suazo a la fecha de la entrega del proyecto que permitió llevar a cabo este estudio.

La muestra de madres de casos está conformada por 144 mujeres reclutadas durante los años 2017 y 2019, en los siguientes centros de rehabilitación: Hospital San Borja Arriarán, Hospital Roberto del Río, Hospital Exequiel González Cortés y la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Los criterios de inclusión para esta investigación fueron mujeres chilenas, madres biológicas de pacientes chilenos que tuvieran fisura labio-máxilo-palatina en cualquiera de sus presentaciones clínicas (FL, FP y FLP) y que no estuvieran asociadas a un síndrome u otra malformación. Se excluyó a madres de hijos cuyo padre o abuelos sean extranjeros.

Respecto al grupo de madres de controles (N= 144), estas fueron reclutadas entre las donantes de los Bancos de Sangre del Hospital San José y Hospital San Juan de Dios, durante los años 2017 y 2019. Se incluyó a mujeres chilenas, de progenitores chilenos, con al menos un hijo vivo sin malformaciones craneofaciales de un padre chileno. Se excluyeron a mujeres con antecedentes familiares de fisuras orofaciales hasta tercer grado de parentesco.

A partir de la información recopilada a través de una encuesta epidemiológica realizada durante el período anteriormente mencionado por el equipo de profesionales del proyecto liderado por el Dr. José Suazo, la cual fue aplicada a ambos grupos, se seleccionó la información de las preguntas que tenían relación con las variables a estudiar, obteniéndose información sobre las exposiciones ambientales a teratógenos, nivel educacional, consumo de alcohol y tabaco, antecedentes de salud y el consumo de ácido fólico durante el embarazo. La base de datos anonimizada resultado de esta encuesta, fue codificada, organizada y analizada estadísticamente por el autor de esta tesis. Para los análisis genéticos,

se obtuvo una muestra de mucosa oral en las madres de casos y una muestra de sangre periférica de las madres de controles. Desde estas muestras se extrajo el ADN genómico a través de métodos comerciales, lo que se realizó en el Biobanco de Tejidos de la Universidad de Chile (BTUCH), quienes además almacenaron tanto estas muestras como los datos de todas estas mujeres. Todas las mujeres reclutadas declararon su voluntariedad de participar en este estudio a través de la firma de un documento de consentimiento informado, aprobado por los Comités de Ética de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y del Servicio de Salud Metropolitano Central.

5.2 Variables Evaluadas

1) Variables epidemiológicas

Desde la encuesta epidemiológica, se extrajeron las siguientes variables a comparar entre madres de casos y madres de controles: a) Exposiciones ambientales a teratógenos, tales como pesticidas, humo, gases tóxicos, metales pesados, entre otros. b) Consumo de alcohol o tabaco en cualquier etapa de la vida. c) Consumo de alcohol o tabaco en cualquier etapa durante el embarazo. d) Enfermedades crónicas diagnosticadas. e) Nivel educacional: Esta variable fue categorizada en distintos niveles, considerando como categoría al nivel educacional más alto completado por el sujeto encuestado: Educación básica, educación media, técnico profesional y universitario. f) Existencia de episodios de abortos espontáneos. g) Consumo de ácido fólico durante el embarazo. h) Edad promedio de la menarquía.

2) Variables genéticas

Las muestras de ADN genómico fueron enviadas al laboratorio ERAMUS MC University Rotterdam en Holanda donde se genotipificaron usando un array prediseñado de Illumina que contiene más de 600.000 SNPs (Infinium iSelect 24x1 HTS BeadChip). Desde este laboratorio se recibió una matriz con la información de los genotipos de todos los SNPs del array para cada individuo. Desde esta matriz se seleccionaron, en base a sus coordenadas, las variantes de los genes *MTHFR*, *MTHFD1* y *SLC19A1* usando los siguientes criterios: SNPs en equilibrio de Hardy-

Weinberg, frecuencia del alelo menor (MAF) $> 0,1$; y que no se encontraran en desequilibrio de ligamiento en base a un $r^2 > 0,8$ (Anderson, C. A y cols., 2010).

Estos filtros fueron aplicados por Carlos Salamanca, alumno de Doctorado en Ciencias Odontológicas, bajo la tutoría del Dr. Suazo.

5.3 Métodos estadísticos

En el análisis de los datos, para evaluar si la distribución de las variables cuantitativas es normal, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk. En variables que poseían una distribución normal se utilizó la media como medida de tendencia central y se compararon los grupos mediante la prueba de t de Student. Cuando las variables cuantitativas no mostraron distribución normal, se usó la mediana, y los grupos se compararon calculando la prueba de Wilcoxon. Para las variables categóricas en tanto, estas se describieron en porcentajes, y la asociación con el fenotipo se evaluó mediante el cálculo de Odds Ratio (OR) con intervalo de confianza de 95%, o en su defecto la prueba de Z. La significancia estadística se definió con un valor de $p < 0,05$. Para la asociación entre variantes genéticas maternas seleccionadas de acuerdo a lo antes descrito y el riesgo de FLMPNS, se calculó el Odds Ratio (OR) con intervalo de confianza de 95%, usando el alelo de mayor frecuencia como referencia. Dado que se evaluaron múltiples hipótesis, se aplicó una corrección por comparaciones múltiples mediante el método de Benjamini-Hochberg con una proporción de falsos descubrimientos (*false discovery rate* o FRD) de 5%. Todas las pruebas que se aplicaron tanto para variables genéticas como ambientales fueron realizadas por el autor de esta tesis usando el paquete estadístico STATA 14.

6. RESULTADOS

En relación con el objetivo específico N°1, se analizaron múltiples variables epidemiológicas las que fueron comparadas entre las 144 madres de casos y 144 madres de controles, las que se detallan a continuación:

Respecto a las exposiciones ambientales a teratógenos, tales como pesticidas, humo, gases tóxicos, metales pesados, entre otros, en la **tabla 1** se observa que los casos presentan una mayor frecuencia de exposición que los controles, con un OR de 2,36 (IC: 95%, 1,40 – 3,99). Esto se refiere a que la razón entre las exposiciones ambientales a teratógenos versus la no exposición a estos es 2,36 veces mayor en casos en comparación a los controles y esta asociación es estadísticamente significativa ($p=0,001$).

Tabla 1. Exposiciones ambientales maternas a teratógenos asociado al riesgo de FLMPNS

	Expuestos	No expuestos	OR	IC	p-value
Casos	66 (22,9%)	78 (27,1%)	2,36	1,40 - 3,99	<0,001
Controles	38 (13,1%)	106 (36,8%)			
Total	288				

OR: Odds Ratio IC: intervalo de confianza.

En cuanto al consumo de alcohol o tabaco en cualquier etapa de la vida, en la **tabla 2** se describe que los casos presentan una mayor frecuencia de consumo que los controles, con un OR de 1,61 (IC: 95%, 0,98 – 2,63). Esto significa que la razón entre consumo de alcohol o tabaco versus el no consumo es 1,61 veces mayor en casos en comparación a los controles, y esta asociación es estadísticamente significativa ($p=0,045$).

Tabla 2. Consumo de alcohol o tabaco en cualquier etapa de la vida asociado al riesgo de FLMPNS

	Sí consumió	No consumió	OR	IC	p-value
Casos	79 (27,4%)	65 (22,5%)	1,61	0,98 - 2,63	0,045
Controles	62 (21,5%)	82 (28,5%)			
Total	288				

OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza.

En lo que se refiere al consumo de alcohol o tabaco en cualquier etapa durante el embarazo, en la **tabla 3** se observa que los casos presentan una mayor frecuencia de consumo que los controles, con un OR de 1,21 (IC: 95%, 0,57 – 2,57). Sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p=0,597$).

Tabla 3. Consumo de alcohol o tabaco en cualquier etapa durante el embarazo asociado al riesgo de FLMPNS

	Sí consumió	No consumió	OR	IC	p-value
Casos	20 (6,9%)	124 (43%)	1,21	0,57 - 2,57	0,597
Controles	17 (5,9%)	127 (44,1%)			
Total	288				

OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza.

En relación con el nivel educacional, la determinación de los Odds-Ratio se realizó asociando al nivel educacional más alto alcanzado por la encuestada con el nivel mínimo, que para este estudio se determinó como “sin educación”. Todo esto se detalla en la **tabla 4**.

En primer lugar, para el nivel educacional de básica completa se obtuvo un valor de OR de 0, por lo que se realizó la prueba Z, obteniéndose un OR de 1 (IC: 95%, 0 - 0,04), siendo estos valores estadísticamente significativos ($p=<0,001$).

En segundo lugar, para el nivel educacional de media completa la proporción de casos fue mayor que los controles y su OR de 0,37 (IC: 95%, 0,09 – 1,26), sin embargo, los resultados no son estadísticamente significativos ($p=0,083$).

En tercer lugar, para el nivel educacional de Técnico profesional completo la proporción de casos fue igual que los controles con un OR de 0,27 (IC: 95%, 0,06 – 0,97), siendo estos valores estadísticamente significativos ($p=0,025$).

Finalmente, en el nivel educacional de universitario completo se obtuvo un OR de 0,25 (IC: 95%, 0,05 – 1,03) siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,03$).

Tabla 4. Nivel educacional materno asociado al riesgo de FLMPNS

Nivel educacional	Casos	Controles	OR	IC	p-value
Sin educación	15 (5,2%)	4 (1,4%)	ref*	ref*	ref*
Básica completa	0 (0%)	32 (11,1%)	-	-	<0,001#
Media completa	78 (27,1%)	56 (19,4%)	0,37	0,09- 1,26	0,083
Técnico profesional completo	34 (11,8%)	34 (11,8%)	0,27	0,06 -0,97	0,025
Universitario completo	17 (5,9%)	18 (6,3%)	0,25	0,05- 1,03	0,030

*referencia, #p-value para la prueba de Z, OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza.

Respecto a las enfermedades crónicas diagnosticadas, en la **tabla 5** se observa que los casos y controles poseen la misma distribución de morbilidades crónicas, con un OR de 1,00 (IC: 95%, 0,61 - 1,64). Sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p=1,00$).

Tabla 5. Presencia de enfermedades crónicas diagnosticadas y su asociación al riesgo de FLMPNS

	posee una o más EC*	No posee EC*	OR	IC	p-value
Casos	61 (21,2%)	83 (28,8%)	1,00	0,61 - 1,64	1
Controles	61 (21,2%)	83 (28,8%)			
Total	288				

*Enfermedad crónica, OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza.

En relación a las variables relativas a la reproducción en la **tabla 6** se describen los datos obtenidos para la categoría de episodios de abortos espontáneos, casos y controles presentaron la misma distribución y un OR de 1 (IC: 95%, 0,55– 1,83), sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=1,00$).

Tabla 6. Existencia de episodios de abortos espontáneos asociado al riesgo de FLMPNS

	Tuvo aborto	No tuvo	OR	IC	p-value
Casos	31 (10,8%)	113 (39,1%)	1,000	0,55 - 1,83	1
Controles	31 (10,8%)	113 (39,1%)			
Total	288				

OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza.

En relación con la edad promedio de la menarquia o primera menstruación de casos y controles, en la **tabla 7** se describen los datos obtenidos luego de realizar la prueba de Shapiro-Wilk, la cual mostró la ausencia de normalidad en la distribución de esta variable ($p < 0,0001$). Para el grupo de los casos la mediana fue de 13 años (rango intercuartílico, RIC de 2 años) y para controles de 12 años (rango intercuartílico de 2 años). La prueba de Mann-Whitney no muestra diferencias significativas ($p=0,440$).

Tabla 7. Edad promedio de la menarquia

	Mediana	Rango Intercuartílico	p-value
Casos	13 años	2 años	0,440
Controles	12 años	2 años	

En lo que se refiere al objetivo específico N°2, en relación al consumo materno de ácido fólico durante el embarazo se observa en la **tabla 8** un OR de 1,53 (IC: 95%, 0,85 – 2,74), sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p=0,129$).

Tabla 8. Consumo de ácido fólico durante el embarazo asociado al riesgo de FLMPNS

	Consumió	No consumió	OR	IC	p-value
Casos	115 (39,9%)	29 (10%)	1,53	0,85 - 2,74	0,129
Controles	104 (36,1%)	40 (13,9%)			
Total	288				

OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza.

Por último, para las variables genéticas, relacionando el tercer objetivo de esta tesis, luego de aplicar los filtros detallados en la metodología se seleccionaron 4 SNPs para el gen *MTHFD1*, 4 SNPs para el gen *MTHFR* y 17 SNPs para el gen *SLC19A1*. Esta diferencia de variantes se debe a factores como el número total de SNPs en cada gen y la cantidad de ellos que cumplan con los criterios antes descritos, que también es variable para cada gen. En la **tabla 9** se observa los datos obtenidos para el análisis de asociación con los distintos polimorfismos del gen *MTHFD1*. Sin embargo, estos valores no son estadísticamente significativos, tanto en los datos crudos como corregidos por comparaciones múltiples ($p=0,932$).

Tabla 9. Polimorfismos de *MTHFD1* asociado al riesgo de FLMPNS

SNP	OR	IC	p-value	p-value*
rs17824591(G>A)	0,92	0,51 - 1,63	0,756	0,932
rs8011839 (C>T)	0,96	0,55 - 1,65	0,868	0,932
rs1076991 (T>G)	0,97	0,64 - 1,46	0,868	0,932
rs2236225 (A>G)	1,18	0,77 - 1,80	0,425	0,932

OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza, *p-value corregido por comparaciones múltiples.

En cuanto al gen *MTHFR*, en la **tabla 10** se observa los datos obtenidos para los distintos polimorfismos, sin embargo, luego de realizar a estos valores una corrección por comparaciones múltiple se determinó que no son estadísticamente significativos ($p=0,932$).

Tabla 10. Polimorfismos de *MTHFR* asociado al riesgo de FLMPNS

SNP	OR	IC	p-value	p-value*
rs17367504 (A>G)	0,96	0,53 - 1,73	0,895	0,932
rs1476413 (C>T)	0,89	0,52 - 1,51	0,645	0,932
rs1801131 (T>G)	0,95	0,57 - 1,58	0,839	0,932
rs1801133 (G>A)	1,21	0,80 - 1,83	0,345	0,932

OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza. *p-value corregido por comparaciones múltiples.

Finalmente, para el gen *SLC19A1* se evaluaron 17 SNPs y en la **tabla 11** se describen los resultados obtenidos para ellos. En este caso se detectó que la variante rs9980525 (G>A) arrojó un resultado estadísticamente significativo ($p=0,023$). Sin embargo, al realizar la corrección por comparaciones múltiples se determinó que esta no posee significancia estadística ($p=0,570$), al igual que el resto los valores obtenidos.

Tabla 11. Polimorfismos de *SLC19A1* asociado al riesgo de FLMPNS

SNP	OR	IC	p-value	p-value*
rs79091853 (C>T)	0,83	0,42 - 1,60	0,554	0,932
rs4818789 (T>G)	1,18	0,68 - 2,04	0,530	0,932
rs9980525 (G>A)	1,83	1,05 - 3,23	0,023	0,570
rs7278425 (C>T)	0,81	0,49 - 1,31	0,361	0,932
rs3753019 (C>T)	0,94	0,58 - 1,52	0,786	0,932
rs2236483 (T>C)	0,91	0,58 - 1,42	0,659	0,932
rs3788205 (C>T)	0,92	0,60 - 1,43	0,706	0,932
rs7499 (G>A)	1,03	0,66- 1,60	0,883	0,932
rs3788189 (T>G)	1,01	0,65 - 1,57	0,952	0,932
rs2838956 (A>G)	1,03	0,67 - 1,59	0,890	0,932
rs1051298(G>A)	1,05	0,66 - 1,66	0,831	0,932
rs7867 (G>A)	1,05	0,68 - 1,62	0,825	0,932
rs914232 (C>T)	1,17	0,76 - 1,81	0,455	0,932
rs1051266 (C>T)	1,13	0,73 - 1,75	0,564	0,932
rs12659 (G>A)	1,34	0,86 - 2,07	0,168	0,932
rs7279445 (T>C)	1,19	0,79 - 1,80	0,376	0,932
rs13050920 (T>C)	1,33	0,88 - 2,00	0,155	0,932

OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza. *p-value corregido por comparaciones múltiples.

7. DISCUSIÓN

Este proyecto de investigación tuvo por intención aportar evidencia para determinar la etiología de las FLMPNS en la población chilena, y para esto, entendiendo que estas patologías tienen un origen multifactorial, se hizo hincapié en factores maternos tanto genéticos como ambientales que pudiesen modificar el riesgo de estas malformaciones. Como antes se describe, el metabolismo del folato juega un rol importante tanto en el desarrollo embrionario como en la aparición de las fisuras. Es por ello que el foco de este trabajo fueron las variables genéticas y ambientales relacionadas con este metabolismo.

Las fisuras orofaciales son alteraciones con una etiología compleja y multifactorial, que se desarrollan en el territorio craneofacial durante el período embrionario y que alteran la conformación normal de la línea media facial (Dixon y cols, 2011).

Estudios indican que el consumo de folatos disminuye el riesgo de presentar defectos congénitos, pero niveles elevados de homocisteína en la sangre de madres de niños que padecen de FLMPNS suponen, además, un componente genético involucrado en el metabolismo de los folatos asociado al desarrollo de estas malformaciones (Bhaskar y cols., 2011).

7.1 FLMPNS y factores ambientales maternos

En relación con los objetivos específicos planteados por este trabajo de investigación, el primero de ellos consideró evaluar la asociación entre factores ambientales en la madre y el riesgo de fisuras orofaciales no sindrómicas en la población chilena.

Respecto a las exposiciones ambientales de la madre a factores con efectos teratógenos y su asociación con el riesgo de FLMPNS, se identificó que, en el grupo de las madres de casos, la frecuencia de exposición fue significativamente mayor que en el grupo control (**tabla 1**). Estos resultados son similares a los de otros estudios previos realizados a nivel mundial, que hablan sobre la relación entre la expresión de malformaciones congénitas como hendiduras faciales y la exposición materna a agentes ambientales teratógenos como por ejemplo solventes (Cordier y

cols. 2012, Brender y cols. 2014), humo (Ten Tusscher y cols 2000, Cordier y cols. 2004) entre otros.

Dentro de este mismo objetivo, en segundo lugar, se investigó la asociación del riesgo de FLMPNS con el consumo de alcohol o tabaco por parte de madres de casos y controles en donde el consumo fue evaluado en cualquier etapa de la vida y durante el embarazo. Los valores obtenidos son estadísticamente significativos para la categoría de consumo de alcohol o tabaco en cualquier etapa de la vida, al igual que otros estudios que indican esta relación entre el consumo de estas sustancias y el desarrollo de FLMPNS. En un metaanálisis se encontraron asociaciones consistentes entre las FLMPNS (FL, FP o FLP) y el tabaquismo materno, que sugieren como riesgos relativos generales un 7,5% para FL/P y 5% para FP. Considerando que el primer trimestre del embarazo es el período más sensible en la etiología de estas malformaciones, el tabaquismo durante este período aumenta en un 30% más de riesgo de tener un hijo con FL/P (Little, J. y cols 2004).

En relación al consumo de alcohol y su asociación con el riesgo de FLMPNS nuestros hallazgos son estadísticamente significativos y consistentes con otros estudios como el de DeRoo en 2008, que reportó haber encontrado un mayor riesgo de fisuras para los recién nacidos cuyas madres tenía un sobreconsumo promedio de cinco o más bebidas por ocasión durante el primer trimestre en comparación con las no bebedoras, por el contrario, obtuvo una menor asociación entre el riesgo de FLMPNS y niveles más bajos de consumo materno de alcohol.

Si bien hubo una asociación para el consumo de alcohol o tabaco en cualquier etapa de la vida, no se encontró una asociación estadísticamente significativa para su consumo durante el embarazo, esto se podría explicar debido al sesgo de recuerdo al momento de realizar la encuesta, ya que este dato se obtuvo por autoreporte de parte del encuestado. Además, si bien la mayoría de las madres deja de beber o reduce su consumo una vez que es consciente de su embarazo, el consumo de alcohol durante el embarazo es alto (McCormack y cols., 2017).

En tercer lugar, se analizó el nivel educacional encontrándose una relación significativa entre los niveles educacionales más bajos y el riesgo de FLMPNS

(**tabla 4**). Nuestros resultados concuerdan con otros estudios en donde se determinó que existe un mayor riesgo de tener descendencia portadora de FLMPNS en madres que poseen un bajo nivel educacional (Poletta y cols., 2007). Con lo anterior se podría suponer, que niveles educacionales superiores tendrían un efecto protector en relación al riesgo de tener hijos con FLMPNS, debido a que gran parte de las madres de casos no tienen escolaridad o solo cursaron educación primaria (González y cols., 2008). Otros estudios que analizaron esta relación, también lo hicieron considerando el nivel socioeconómico, donde se encontró que vivir en un lugar con condiciones socioeconómicas adversas se asocia moderadamente con un mayor riesgo de FL / P, pero no de FP. (Lupo y cols. 2015).

Continuando con el primer objetivo, se analizó la presencia de enfermedades crónicas diagnosticadas en las madres de casos y su asociación al riesgo de FLMPNS. Se decidió evaluar este factor debido a que existe evidencia de que morbilidades como hipertensión arterial (HTA) o diabetes mellitus (DM) serían un factor de riesgo en el desarrollo de esas patologías. Los estados de hiperglicemia que genera la DM y la disminución del flujo sanguíneo uteroplacentario provocada por la HTA, tendrían efectos teratogénicos en el desarrollo embrionario (Ordoñez y cols.,2003). También se consideró que el padecer enfermedades crónicas implica el uso de fármacos que pueden ser un factor de riesgo, como es el uso de anticonvulsivantes durante el embarazo, los cuales aumentan el riesgo de malformaciones (Hernández-Díaz y cols., 2012). Sin embargo, a pesar de existir evidencia en otras poblaciones, en este trabajo no se encontró una asociación significativa entre morbilidades crónicas y el riesgo de FLMPNS.

Finalmente, respecto a los factores analizados correspondientes a componentes reproductivos de la madre, como lo es la edad de la menarquia y la existencia de episodios de abortos espontáneos, no fue posible encontrar una relación significativa con el riesgo de FLMPNS. Es importante destacar que la menarquia o primer sangrado de origen menstrual es el evento que determina el inicio de la ovulación. Tener la menarquia a temprana edad se ha asociado a enfermedades cardiovasculares y tanto edades tempranas como tardías estarían asociadas con abortos espontáneos (Guldbrandsen y cols., 2014). En consecuencia, estudios previos en otras poblaciones muestra que las madres de casos de FLMPNS

presentan una mayor proporción de abortos espontáneos que las madres de controles (Cheshmi y cols., 2020). Es por esto que se sugiere seguir realizando el estudio de estas variables en otras poblaciones, que permitan entender el origen multifactorial de esta patología.

7.2 Consumo materno de ácido fólico y FLMPNS

El segundo objetivo planteado fue evaluar la asociación entre el consumo materno de ácido fólico durante el embarazo y la expresión de fisuras orofaciales no sindrómicas en la población chilena. Existen estudios que relacionan la disminución de folatos durante el periodo periconcepcional con el desarrollo de FLMPNS (Bhaskar y cols., 2011). Si bien hay evidencia de un posible efecto protector del uso de ácido fólico suplementario y el riesgo de FLMPNS en humanos, no todos los estudios realizados dan cuenta de esto (Badovinac y cols., 2007). En Chile, la política pública de fortificación de la harina con ácido fólico está vigente desde el año 2000, sin embargo, esta medida no ha logrado disminuir las tasas de prevalencia de FL/P (Nazer y cols., 2010). Al realizar los análisis, no se encontró una asociación estadísticamente significativa con el riesgo de FLMPNS y el consumo de ácido fólico para esta población. Esto se podría explicar debido a que los datos obtenidos a través de la encuesta sobre el consumo de ácido fólico fueron por autoreporte, lo que pudo haber ocasionado un sesgo de recuerdo. También, se puede deber a diferencias en las cantidades de folatos en los alimentos consumidos entre los participantes en ambos grupos, lo que podría dilucidarse, en estudios futuros, al aplicar una encuesta alimentaria de frecuencia de consumo o investigar a madres en donde su consumo de ácido fólico haya sido recetado por un médico y donde idealmente se pueda acceder a los registros de las cantidades indicadas.

7.3 Factores genéticos del metabolismo de folatos en las madres y FLMPNS

El tercer objetivo fue evaluar la asociación entre variantes polimórficas de los genes *MTHFR*, *MTHFD1* y *SLC19A1* en madres y la expresión de fisuras orofaciales no sindrómicas de una población chilena. Existe evidencia que relaciona variantes maternas de estos genes con el desarrollo de FLMPNS en la descendencia (Bhaskar y cols., 2011; Blanton y cols., 2011). Para la población chilena se ha descrito al SNP *MTHFR rs1801133* (c.677C>T; p.Ala222Val) como un factor de

riesgo para FLMPNS (Ramírez-Chau, C. y cols. 2016). Viera en 2008 informa una relación positiva entre *SLC19A1* y el riesgo a desarrollar fisura labial. Un estudio demostró en una población al sur de India una fuerte asociación entre el polimorfismo materno MTHFD1 1958G>A y el riesgo de FLMPNS (Murthy y cols.,2014). Sin embargo, a pesar de esta evidencia previa y después de la aplicación de correcciones por comparaciones múltiples, los análisis realizados en este trabajo de investigación no encontraron una relación estadísticamente significativa en nuestra población, lo que se puede explicar, por una parte, por el efecto de la heterogeneidad genética en esta malformación. Este concepto se refiere a que un fenotipo idéntico puede ser el producto de mutaciones en distintos genes, las que pueden tener efectos variables dependiendo de la población. Es decir, el resultado de asociación de una variante puede no ser extrapolable a todas las poblaciones (Saleem y cols., 2019). Además, es importante destacar que la etiología de las FLMPNS es multifactorial, por lo que intervienen tanto factores ambientales como genéticos. En este contexto, se conocen más de 50 genes involucrados en el transporte y metabolismo de folatos, síntesis de SAM y metilación de ADN, que presentan polimorfismos que podrían alterar cualquiera de estos procesos y, por lo tanto, contribuir a la expresión de estas patologías (Bhaskar y cols., 2011). Cabe destacar el caso del polimorfismo rs9980525 del gen *SLC19A1* (**tabla 11**) que arrojó un resultado significativo el cual no se mantuvo luego de aplicar la corrección. Esto podría reflejar el efecto del tamaño muestral. Por ello sería relevante replicar el análisis de este SNP con un número mayor de madres en ambos grupos. De confirmarse esta asociación en estudios futuros, podríamos postular la importancia de este gen materno en el riesgo de FLMPNS en Chile. Recordemos que *SLC19A1* codifica un transportador de la forma activa de folatos tanto hacia la célula como hacia la circulación (Hiraoka y cols., 2017), por lo que su función sería relevante para los niveles circulantes de estas moléculas.

7.4 Fortalezas y debilidades

El presente trabajo de investigación es el único hasta la fecha que ha buscado una relación entre factores maternos genéticos-ambientales en el marco del metabolismo del folato con el riesgo de desarrollar FL/LPNS en la población chilena. En nuestro país, estudios como este se hacen relevantes dado la fortificación

mandataria con ácido fólico de la harina de panificación que se ha implementado desde el año 2000. Es en este contexto que el estudio de otras variables relacionadas al metabolismo del ácido fólico debe estudiarse, teniendo en cuenta que estos defectos del nacimiento no han mostrado una disminución en su prevalencia desde el año de implementación de la medida (Hertrampf y cols., 2004).

Este estudio se basó en datos autoinformados del consumo de ácido fólico y no contiene información sobre la formulación, la dosis o el momento de inicio de la ingesta de este nutriente. Es por esto que, a partir de los datos de la encuesta epidemiológica, no se pudo obtener un total conocimiento de la ingesta de folatos por las madres que componen esta muestra durante el período periconcepcional. Sin embargo, este punto, que se considera una debilidad de nuestro estudio, nos abre la oportunidad en el futuro de obtener datos más acabados del consumo de ácido fólico y folatos a través de una encuesta nutricional y su relación con el riesgo de FLMPNS en Chile.

Entendemos que los resultados de este estudio son limitados, debido en parte al modesto tamaño muestral, lo que podría afectar la validez externa del trabajo; por lo tanto, recomendamos realizar estudios más amplios para determinar la asociación entre estas variables estudiadas al riesgo materno de FLMPNS.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos por medio de los análisis realizados en esta investigación permiten concluir:

- En este estudio se encontró que el consumo de alcohol y tabaco en cualquier etapa de la vida; la exposición a agentes teratógenos y un bajo nivel de escolaridad por parte de madres, está asociado con el aumento del riesgo de tener descendencia que presente FLMPNS.
- A pesar de existir evidencia en otras poblaciones, en este estudio no se encontró asociación con el consumo materno de ácido fólico durante el embarazo por parte de las madres y el riesgo de presentar FLMPNS en sus hijos.
- Si bien los genes *MTHFR*, *MTHFD1* y *SLC19A1*, que se seleccionaron para este trabajo, tienen evidencia previa en otras poblaciones de genotipos maternos que están asociados con las FLMPNS, en la población estudiada no se obtuvieron resultados significativos previo y posterior a aplicar correcciones por comparaciones múltiples. La única excepción la constituye el polimorfismo rs9980525 del gen *SLC19A1*, sin embargo, este no mantuvo su significancia luego de esta corrección. En el futuro, de aumentar el tamaño muestral para el análisis de este marcador, podríamos confirmar el rol de este gen materno en el riesgo de las fisuras en Chile.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al Mahmuda, N., Yokoyama, S., Huang, J. J., Liu, L., Munesue, T., Nakatani, H., Hayashi, K., Yagi, K., Yamagishi, M., & Higashida, H. (2016). A study of single nucleotide polymorphisms of the SLC19A1/RFC1 gene in subjects with autism spectrum disorder. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5).
- Anderson, C. A., Pettersson, F. H., Clarke, G. M., Cardon, L. R., Morris, A. P., & Zondervan, K. T. (2010). Data quality control in genetic case-control association studies. *Nature Protocols*, 5(9), 1564–1573.
- Aros, S. (2008). Exposición fetal a alcohol. In *Revista Chilena de Pediatría* (Vol. 79).
- Badovinac RL, Werler MM, Williams PL, et al. Folic acid-containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: a meta-analysis. *Birth Defects Research*. 2007; 79:8–15.
- Beaudin, A.E., Perry C. A., Stabler S. P., Allen R. H., Stover P. J., (2012). Maternal Mthfd1 disruption impairs fetal growth but does not cause neural tube defects in mice. *American Journal of Clinical Nutrition*, 95(4), 882–891.
- Bhaskar L, Murthy J y Babu GV (2011). Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and orofacial clefts. *Arch Oral Biol* 56:723-737
- Blanton SH, Henry RR, Yuan Q, Mulliken JB, Stal S, Finell RH, et al. (2011). Folate Pathway and Nonsyndromic Cleft Lip and Palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 91:50-60.
- Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, et al. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7:724–731.
- Boletín N ° 22: Prevalencia de consumo regular de tabaco durante el embarazo. Observatorio Chileno de Drogas 2015.
- Brender, J. D., Shinde, M. U., Benjamin Zhan, F., Gong, X., & Langlois, P. H. (2014). Maternal residential proximity to chlorinated solvent emissions and birth defects in offspring: A case-control study. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 13(1), 96.

- Bufalino, A., Ribeiro Paranaíba, L. M., Nascimento De Aquino, S., Martelli-Júnior, H., Oliveira Swerts, M. S., Coletta, R. D. (2010). Maternal polymorphisms in folic acid metabolic genes are associated with nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 88(11), 980–986.
- Burg, M. L., Chai, Y., Yao, C. A., Magee, W., Figueiredo, J. C. (2016). Epidemiology, etiology, and treatment of isolated cleft palate. *Frontiers in Physiology*, 7(MAR), 1–16.
- 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.
- Carrasco L, Merino A y Faraggi M (2011). Rinoseptoplastía en pacientes fisurados. *Rev. Otorrinolaringología Cir. Cabeza Cuello* 71:171-178.
- Cheshmi, B., Jafari, Z., Naseri, M. A., & Davari, H. A. (2020). Assessment of the correlation between various risk factors and orofacial cleft disorder spectrum: a retrospective case-control study. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery*, 42(1), 26.
- Chevrier C, Perret C, Bahuau M, et al. Fetal and maternal MTHFR C677T genotype, maternal folate intake and the risk of nonsyndromic oral clefts. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2007; 143:248–257.
- Cobourne MT (2004) The complex genetics of cleft lip and palate. *Eur J Orthod* 26:7-16.
- Cordier, S., Chevrier, C., Robert-Gnansia, E., Lorente, C., Brula, P., & Hours, M. (2004). Risk of congenital anomalies in the vicinity of municipal solid waste incinerators. *Occupational and environmental medicine*, 61(1), 8–15.
- Cordier, S., Garlantézec, R., Labat, L., Rouget, F., Monfort, C., Bonvallot, N., ... Multigner, L. (2012). Exposure during pregnancy to glycol ethers and chlorinated solvents and the risk of congenital malformations. *Epidemiology*, 23(6), 806–812.

- Cortés, F., Mellado, C., Pardo, R. A., Villarroel, L. A., & Hertrampf, E. (2012). Wheat flour fortification with folic acid: Changes in neural tube defects rates in Chile. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 158A (8), 1885–1890.
- Del Prete S, D'urso A, Tolevski Meshkova D y Coppotelli E (2014). Cleft lip and palate: a review of the literature. *Orthodontics* 5(12): WMC004783
- DeRoo, L. A., Wilcox, A. J., Drevon, C. A., & Lie, R. T. (2008). First-trimester maternal alcohol consumption and the risk of infant oral clefts in Norway: A population-based case-control study. *American Journal of Epidemiology*, 168(6), 638–646.
- 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.
- Eppley, B. L., van Aalst, J. A., Robey, A., Havlik, R. J., and Sadove, A. M. (2005). The spectrum of orofacial clefting. *Plast. Reconstr. Surg.* 115, 101e–114e.
- Godoy E, Godoy A, Godoy F, Monasterio L y Suazo G (2010). Manejo del paciente con fisura labio-palatina en Arica: Experiencia de 15 años. *Rev. Otorrinolaringología Cir. Cabeza Cuello* 70:133-138.
- González BS, López ML, Rico MA, Garduño F (2008). Oral clefts: a retrospective study of prevalence and predisposal factors in the State of Mexico. *J. Oral Sci.* 50:123–9.
- Guldbrandsen, K., Håkonsen, L. B., Ernst, A., Toft, G., Lyngsø, J., Olsen, J., & Ramlau-Hansen, C. H. (2014). Age of menarche and time to pregnancy. *Human Reproduction*, 29(9), 2058–2064.
- Hackshaw, A., Rodeck, C., Boniface, S. (2011). Maternal smoking in pregnancy and birth defects: A systematic review based on 173 687 malformed cases and 11.7 million controls. *Human Reproduction Update*, 17(5), 589–604.
- Hall, B. K. (1999). *The Neural Crest in Development and Evolution*. New York, NY: Springer.

Hernández-Díaz, S., Smith, C. R., Shen, A., Mittendorf, R., Hauser, W. A., Yerby, M., & Holmes, L. B. (2012). Comparative safety of antiepileptic drugs during pregnancy. *Neurology*, 78(21), 1692–1699.

Hertrampf, E., & Cortés, F. (2004). Folic acid fortification of wheat flour: Chile. In *Nutrition Reviews* (Vol. 62, pp. S44–S48). International Life Sciences Institute.

Hiraoka, M., & Kagawa, Y. (2017). Genetic polymorphisms and folate status. *Congenital Anomalies*, 57(5), 142–149.

Hu N, Strobl-Mazzulla PH y Bronner ME (2014). Epigenetic regulation in neural crest development. *Dev Biol* 396:159-168

Ikeda S, Koyama H, Sugimoto M y Kume S (2012). Roles of One-Carbon metabolism in preimplantation period- Effects on short-term development and longterm programming. *J Reprod Dev* 58(1):38-43.

International statistical classification of diseases and related health problems (ICD) 10° revision, edición 2010. Publicado por la Organización Mundial de la Salud.

Jiang, R., Bush, J. O., Lidral, A. C. (2006). Development of the upper lip: Morphogenetic and molecular mechanisms. *Developmental Dynamics*, 235(5), 1152–1166.

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

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

Kernahan, D. A. (1971). The Striped Y—A symbolic classification for cleft lip and palate. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 47(5), 469–470.

Laanpere, M., Altmäe, S., Stavreus-Evers, A., Nilsson, T. K., Yngve, A., & Salumets, A. (2010, February 1). Folate-mediated one-carbon metabolism and its effect on female fertility and pregnancy viability. *Nutrition Reviews*. Oxford Academic.

- Little, J., Cardy, A., & Munger, R. G. (2004). Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Bulletin of the World Health Organization* (Vol. 82).
- Luo, YL, Cheng, YL, Ye, P, Wang, W, Gao, XH, Chen, Q, (2012) Association between MTHFR polymorphisms and orofacial clefts risk: a meta-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. Apr; 94(4):237-44.
- Lupo, P. J., Danysh, H. E., Symanski, E., Langlois, P. H., Cai, Y., & Swartz, M. D. (2015). Neighborhood-based socioeconomic position and risk of oral clefts among offspring. *American Journal of Public Health*, 105(12), 2518–2525.
- Mangold, E., Ludwig, K. U., & Nöthen, M. M. (2011). Breakthroughs in the genetics of orofacial clefting. *Trends in Molecular Medicine*, 17(12), 725–733.
- McCormack, C., Hutchinson, D., Burns, L., Wilson, J., Elliott, E., Allsop, S., Najman, J., Jacobs, S., Rossen, L., Olsson, C., & Mattick, R. (2017). Prenatal Alcohol Consumption Between Conception and Recognition of Pregnancy. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 41(2), 369–378.
- Meruane, M., Smok, C., & Rojas, M. (2012). Face and neck development in vertebrates. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1373–1388.
- Mills, J. L., Molloy, A. M., Parle-McDermott, A., Troendle, J. F., Brody, L. C., Conley, M. R., Kirke, P. N. (2008). Folate-related gene polymorphisms as risk factors for cleft lip and cleft palate. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 82(9), 636–643.
- Ministerio de Salud (2009). *Guía Clínica: FISURA LABIOPALATINA*, Santiago de Chile.
- Mossey, P. y Little, J. (2009). Addressing the challenges of cleft lip and palate research in India. *Indian J. Plast. Surg.* 42(Suppl.), S9–S18.
- Murthy, J., Gurramkonda, V. B., & Lakkakula, B. V. K. S. (2014). Significant association of MTHFD1 1958G> A single nucleotide polymorphism with nonsyndromic cleft lip and palate in Indian population. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 19(6), e616–e621.

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

Ordoñez M, Názer J, Águila A, Cifuentes L (2003). Malformaciones congénitas y

Osterhues, A., Ali, N. S., Michels, K. B. (2013). The Role of Folic Acid Fortification in Neural Tube Defects: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(11), 1180–1190.

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

Panamonta, V., Pradubwong, S., Panamonta, M., Chowchuen, B. (2015). Global Birth Prevalence of Orofacial Clefts: A Systematic Review. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet Thangphaet*, 98, S11–S21.

patología crónica de la madre. Estudio ECLAMC 1971-1999. *Rev. Med. Chil.* 37 131:404–11.

Paulos, A., Pino, P., Cavada, G., Lagos, C., Broussain, V., & Hasbún, A. (2016). Fisuras labio-palatinas y fortificación de la harina con ácido fólico en Chile. *Revista Médica de Chile*, 144(8), 1012–1019.

Poletta FA, Castilla EE, Orioli IM, Lopez-Camelo JS (2007). Regional analysis on the occurrence of oral clefts in South America. *Am. J. Med. Genet. Part A* 143A:3216–3227.

Ramírez-Chau, C, Blanco R, Colombo A, Pardo R, Suazo J. MTHFR c.677C>T is a risk factor for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in Chile. *Oral Dis.* 2016 oct;22(7):703-8.

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 Diseases*, 22(7), 703–708.

- Rao, A., Ahmed, M. K., Taub, P. J., & Mamoun, J. S. (2016). The Correlation between Maternal Exposure to Air Pollution and the Risk of Orofacial Clefts in Infants: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Oral and Maxillofacial Research*, 7(1), 1–13.
- Rincón RJ, Suazo J y Blanco R (2012). Molecular analysis of Sonic hedgehog (Shh) in the etiology of nonsyndromic cleft lip and palate in Chilean case-parent trios. *Rev Fac Odontol Univ Antioq* 24(1):110-120
- Sadler T (2012). *Langman Embriología Médica*. 12°. ed. Barcelona: Wolters Kluwer. 275p.
- Saleem, K., Zaib, T., Sun, W. & Fu, S. Assessment of candidate genes and genetic heterogeneity in human non syndromic orofacial clefts specifically non syndromic cleft lip with or without palate. *Heliyon* 5, (2019).
- SENDA Chile. (2015). Boletín N° 22: Prevalencia de consumo regular de tabaco durante el embarazo.
- Sepúlveda G, Palomino H, Cortés J. (2008). “Prevalencia de fisura labiopalatina e indicadores de riesgo: Estudio de la población atendida en el Hospital Clínico Félix Bulnes de Santiago de Chile.” *Revista Espanola de Cirugia Oral y Maxilofacial*, 30(1), 26–28.
- Setó-Salvia N y Stanier P (2014). European Genetics of cleft lip and/or cleft palate: Association with other common anomalies. *J Med Genet* 57:381-393
- Singh, S., Singh, V., (2012). A comprehensive review of the genetic basis of cleft lip and palate. *J Oral Maxillofac Pathol* 16(1):64-72.
- Smarius, B., Loozen, C., Manten, W., Bekker, M., Pistorius, L., & Breugem, C. (2017). Accurate diagnosis of prenatal cleft lip/palate by understanding the embryology. *World Journal of Methodology*, 7(3), 93–100.
- Sperber, G. H. (2002b). “Palatogenesis: closure of the secondary palate,” in *Cleft Lip and Palate: From Origin to Treatment*, ed D. F. Wyszynski (New York, NY: Oxford University Press), 14–24.

- Stanier, P. (2004). Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Human Molecular Genetics*, 13(90001), 73R – 81.
- Ten Tusscher, G. W., Stam, G. A., & Koppe, J. G. (2000). Open chemical combustions resulting in a local increased incidence of orofacial clefts. *Chemosphere*, 40(9–11), 1263–1270.
- 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.
- Van Rooij, I. A. L. M., Ocké, M. C., Straatman, H., Zielhuis, G. A., Merkus, H. M. W. M., & Steegers-Theunissen, R. P. M. (2004). Periconceptional folate intake by supplement and food reduces the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Preventive Medicine*, 39(4), 689–694.
- Vieira, A. R., Murray, J. C., Trembath, D., Orioli, I. M., Castilla, E. E., Cooper, M. E., Speer, M. (2005). Studies of reduced folate carrier I (RFC1) A80G and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphisms with neural tube and orofacial cleft defects [2]. *American Journal of Medical Genetics*, 135 A(2), 220–223.
- Watkins, S. E., Meyer, R. E., Strauss, R. P., Aylsworth, A. S. (2014). Classification, Epidemiology, and Genetics of Orofacial Clefts. *Clinics in Plastic Surgery*, 41(2), 149–163.
- Winters, R. (2016, November 1). Tessier Clefts and Hypertelorism. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*. W.B. Saunders.
- Wyszynski, D. F., Duffy, D. L., Beaty, T. H. (1997). Maternal Cigarette Smoking and Oral Clefts: A Meta-analysis. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 34(3), 206–210.
- Zhou, J., Gao, Y., Lan, Y., Jia, S., Jiang, R. (2013). Pax9 regulates a molecular network involving Bmp4, Fgf10, Shh signaling and the Osr2 transcription factor to control palate morphogenesis. *Development*, 140(23), 4709–4718.

10. ANEXOS Y APÉNDICES

1) APROBACION COMITÉ DE ETICA



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.

Ed-30 de mayo de 2017

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 C.E.C.
DE CHILE
DE
ETICA
FACULTAD DE ODONTOLOGIA



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



MINISTERIO DE SALUD
SERVICIO DE SALUD METROPOLITANO CENTRAL
COMITÉ ÉTICO-CIENTÍFICO
Teléfono: 25746958.5743520
ESR/CGNS/matv

(Acta N°110/06) N°564/2017

CERTIFICADO

DR. EMILIANO SOTO ROMO, en calidad de Presidente del Comité Ético-Científico (CEC), del Servicio de Salud Metropolitano Central, constituido por resolución exenta N°1303 de fecha 26 de septiembre del 2002 de la Dirección de dicho Servicio y Acreditado por la SEREMI-RM mediante resolución N° 048975 del 30 de Julio del 2015, certifica que en sesión expedita del 12 de Julio del 2017, El CEC SSMC acusa recibo de carta fechada el 06 de Junio del 2017 y recibida el 06 de Julio del 2017 del **Tecnólogo Médico Don José Suazo Sanhueza, de la Universidad de Chile**, investigador principal del estudio FONDECYT N°1170805 denominado: **"Fisuras orofaciales no sindrómicas en Chile: el rol de biomarcadores parentales del metabolismo del folato/metabolismo monocarbonado"**, quien envía para análisis y aprobación los siguientes con los cambios solicitados por el CEC-SSMC mediante el certificado de plenaria N° 65 del año 2017. El investigador local para el **Hospital Clínico San Borja Arriarán (HCSBA)**, es el Dr. Roberto Pantoja y para el **Hospital El Carmen (HEC)** es el Dr. Pedro Barrios.

Cabe destacar que el rol de subinvestigadora lo ejercerá la Dra. Rosa Pardo y que se realizará en el **Hospital Clínico San Borja Arriarán (HCSBA)**, **Hospital El Carmen (HEC)** y Hospital San Juan de Dios

- 03 copias del Consentimiento informado HCSBA versión 2, fechada el 06 de Mayo del 2017. Documento de 05 páginas.
- 03 copias del Consentimiento informado HEC versión 2, fechada el 06 de Mayo del 2017. Documento de 05 páginas.
- 03 copias de la Hoja denominada "Código", versión 2, fechada el 06 de Julio del 2017, Documento de 02 páginas.
- 03 copias de Hoja denominada "Familia N°" versión 2, fechada el 06 de Julio del 2017. Documento de 02 páginas.

Luego de la presentación y la lectura de los documentos, considerando los criterios relevantes en el análisis de protocolos: utilidad social, validez científica, investigador idóneo, relación riesgo-beneficio favorable, selección equitativa de las personas, protección a la confidencialidad y la utilización de consentimiento informado, **el CEC-SSMC decide Aprobar:**

-Protocolo: **"Fisuras orofaciales no sindrómicas en Chile: el rol de biomarcadores parentales del metabolismo del folato/metabolismo monocarbonado"**, sin fecha y sin versión.

- Consentimiento informado para el HCSBA versión 1, fechada el 02 de Mayo del 2017. Documento de 05 páginas. Se firma, se fecha y se timbra.

- Consentimiento informado para el HEC versión 1, fechada el 02 de Mayo del 2017. Documento de 05 páginas. Se firma, se fecha y se timbra.

- Hoja denominada "Código" versión 2, fechada el 06 de Julio del 2017. Documento de 02 páginas. Se firma, se fecha y se timbra.

- Hoja denominada "Familia N°" versión 2, fechada el 06 de Julio del 2017. Documento de 02 páginas. Se firma, se fecha y se timbra.

Se recuerda a los investigadores que:

- La validación ética dura un año y que de acuerdo a la actual normativa, el investigador tiene la responsabilidad en comunicar al CEC, todo lo relacionado con el estudio: modificaciones, enmiendas, eventos adversos, desviaciones, suspensión del estudio, **término del estudio**, cierre del sitio, etc.

- **Para los estudios que duren menos de un año**, los investigadores tienen el compromiso de hacer llegar el informe de término de la investigación.

- El CEC-SSMC tiene la facultad de realizar visitas en terreno a los sitios de investigación, como parte del seguimiento de los estudios. De acuerdo a la normativa vigente, dichas visitas se avisarán con al menos 48 horas de antelación.

Para ingresar las nuevas versiones de documentos, se solicita a los investigadores hacer llegar:

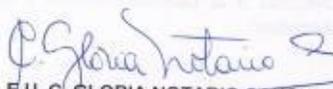
- Carta conductora dirigida al Dr. Emiliano Soto Romo, solicitando la aprobación, (traer en duplicado).

- Fotocopia del presente certificado lo que permitirá facilitar el análisis y acortar los tiempos de respuesta.

- **02 ejemplares** de cada documento a analizar, los cuales se someterán a revisión expedita con la asistencia de un reducido número de miembros. Los documentos deben venir impresos por ambos lados de sus hojas y dejando espacio para la correspondiente validación por parte del CEC-SSMC, donde firma, fecha y timbra cada una de las páginas que lo componen.

Se adjunta fotocopia de la carta enviada por el investigador, firmada, fechada y timbrada.

La sesión expedita de fecha 12 de Julio del 2017, contó con la presencia del Dr. Jaime Bitrán, Dr. Victor Hanna, Sra Victoria Soto, Sra. Carmen Gloria Notario Sánchez y el Dr. Emiliano Soto Romo.


E.U. C. GLORIA NOTARIO SANCHEZ
SECRETARIA EJECUTIVA CEC

SANTIAGO, 12-07-2017
Dirección Servicio de Salud Metropolitano Central
Vialba Subseccional 1061, Santiago, Chile





DR. EMILIANO SOTO ROMO
PRESIDENTE CEC
SERVICIO DE SALUD METROPOLITANO CENTRAL

2) 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 Livingsstone 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: _____

3) APROBACION COMITÉ 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

4) ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA

	BASE DE DATOS ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA TODO TIPO DE COLECCIONES	Cod:
		Revisión: 01
		Fecha:
		Página 1 de 4

Código del donante: _____

Entrevistador/a: _____

El objetivo de este cuestionario es conocer algunos factores de riesgo y determinantes que pudieron ocasionar su malformación o la de su hijo(a).

Esta información contribuirá a conocer porqué los Chilenos presentan este tipo de defectos de nacimiento enfermedades frecuentes en la población chilena y aquellas que no son frecuentes en otros tipos de población, permitiendo identificar factores y marcadores biológicos que nos diferencian y que son característico de nuestra población, con esta información en el futuro se podrían prevenir, diagnóstica más precozmente y tratar de mejor forma estas enfermedades.

Su colaboración es esencial e insustituible, por lo que le agradecería responder todo el cuestionario, siguiendo las instrucciones que le iré mencionando. Su información se tratará de manera confidencial

Entrevistador debe:

- Dibujar el árbol genealógico de familias con varios miembros afectados por la enfermedad del donante.

Simbología: Hombre

Mujer

Caso Índice se identificara coloreándolo, con flecha que lo indique y edad.

Ej:  63 años

- Obtener peso y talla de ficha clínica, realizar estas mediciones en caso de no estar en la ficha o para constatar lo referido por el sujeto, solo en el caso de ser entrevista en hogar.

Se le ha leído y obtenido el consentimiento al entrevistado Si ___ No ___

Fecha de encuesta: __/__/____

ANTECEDENTES SOCIODEMOGRÁFICOS

A1 ¿Cuál es su nombre _____ y apellido(s) _____

A2 Teléfono y/o email: _____

A3 ¿Cuál es su fecha de nacimiento? __/__/__

A4 ¿En qué ciudad o pueblo de Chile? _____

A5 ¿En qué ciudad o pueblo vive usted actualmente? _____

A6 ¿En qué comuna? _____

A7 Ocupación (Marque con una "X")

Profesionales, Técnicos y Afines	<input type="checkbox"/>	Obreros y Jornaleros	<input type="checkbox"/>
Gerentes, Administradores y Directivos	<input type="checkbox"/>	Trabajadores en Servicios Personales	<input type="checkbox"/>
Empleados oficina y afines	<input type="checkbox"/>	Dueña de casa	<input type="checkbox"/>

	BASE DE DATOS	Cod:
	ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA TODO TIPO DE COLECCIONES	Revisión: 01
		Fecha:
		Página 2 de 4

Vendedores y afines		Jubilado	
Agricultores, Ganaderos, Pescadores		Cesante	
Conductores y afines		Otros trabajadores	
Artesanos y Operarios		Estudiante	
Otros Artesanos y Operarios			

A8 ¿Ha estado expuesto a factores ambientales adversos? (Marque con una "X") (Si es mujer indique si la exposición fue durante el embarazo)

Humo o gases tóxicos o contaminantes		Plaguicidas, insecticidas		Monóxido de Carbono (carbón en hogar)	
Acumulación de basura		Radiación		Aguas contaminadas (arsénico, plomo, etc.)	
Animales (Ratones, cucarachas)		Ruidos		Otro _____	
Metales pesados (mercurio, plomo)		Descarga eléctrica		Otro _____	

A9. Nivel Educativo

	Completo	Incompleto
Ninguno		
Básico		
Medio		
Técnico profesional		
Universitario		

PREGUNTAS ASOCIADAS AL ESTILO DE VIDA

Ítem hábitos

B1 ¿Toma usted alcohol?

Si _____ NO _____

¿Qué tipo de alcohol? Vino _____ Cerveza _____ Pisco _____ Ron _____ Otros (especifique) _____
¿A qué edad empezó a tomar alcohol? A los _____ años

B2 ¿Cuántos días por semana toma o tomaba alcohol, incluyendo días del fin de semana?
1 día _____ 2 días _____ 3 a 4 días _____ 5 días o más _____

B3 ¿Cuántos vasos cada día?
1 vaso _____ 2 vasos _____ 3 vasos _____ 4 vasos o más _____

B4 ¿Actualmente, fuma usted cigarrillos?

Si, cuantos al día _____
¿A qué edad comenzó a fumar? A los _____ años

No, dejé de fumar _____

	BASE DE DATOS	Cod:
	ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA TODO TIPO DE COLECCIONES	Revisión: 01
		Fecha:
		Página 3 de 4

¿Qué edad tenía cuando empezó a fumar? _____ años

¿Qué edad tenía cuando dejó de fumar? _____ años

No, nunca he fumado _____

B5 ¿Alguna persona fuma habitualmente dentro de su vivienda?

Si _____ No _____

ANTECEDENTES DE SALUD

C1 ¿Ha sido diagnosticado con alguna de las siguientes condiciones?

Patología	Si	¿Qué edad tenía cuando le diagnosticaron ?	¿Qué tipo de tratamiento recibió o recibe?
Problemas de la vesícula biliar (arenilla cálculos, polipos...) Tipo: _____			
Hipertensión (presión alta)			
Diabetes (azúcar alta en la sangre)			
Colesterol alto			
Insuficiencia renal			
Epilepsia			
Cardiopatías			
Cirrosis hepática			
Enfermedad autoinmune Tipo: _____			
Artrosis			
Alergias Desencadenante: _____ Desencadenante: _____ Desencadenante: _____			
Enfermedad a la tiroides Tipo: _____			
Otras enfermedades _____ _____ _____			

C2 ¿A qué edad fue diagnosticada su enfermedad?
Cuando tenía _____ años.

C3 Tiene usted hijos

No _____ Si _____

	BASE DE DATOS ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA TODO TIPO DE COLECCIONES	Cod:
		Revisión: 01
		Fecha:
		Página 4 de 4

C4 ¿Alguno de sus familiares tiene fisuras orofaciales (labio leporino o paladar fisurado)

No ___ Si ___

¿Quién?

Parentesco	
Madre biológica	
Padre biológico	
Hermanos(as)	
Hijos(as) biológicos(as)	
Otros familiares (especifique) _____	
Otros familiares (especifique) _____	
Otros familiares (especifique) _____	

SÓLO PARA MUJERES

D1 Edad de inicio de menstruación ____ años

D2 Número de Embarazos _____

D3 Número de Hijos _____

D4 Uso de Anticoncepción Si ___ No ___ Edad de Inicio ____ años Edad de Suspensión ____ años
Tipo de Anticoncepción _____

D5 Inicio Menopausia? Si ___ No ___ Edad ____ años

D6 ¿Ha usado Hormonas post Menopausia? Si ___ No ___ Nunca he usado _____

D7 Si ha tenido hijos ¿ha tomado ácido fólico durante el embarazo? Si ___ No ___

Muchísimas gracias por su participación. ¿Tiene alguna pregunta? ¿Quiere que anote algún dato que usted considere importante?
Historial de Revisiones

Autor	Fecha de revisión	Revisión N°	Descripción del cambio realizado