

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS**



**UNIVERSIDAD
DE CHILE**

**“DETERMINACIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS
INVOLUCRADAS EN EL TRANSPORTE Y
METABOLISMO DEL FOLATO/UN CARBONO Y SU
ASOCIACIÓN CON LAS FISURAS OROFACIALES”**

**CARLOS ALBERTO SALAMANCA FIGUEROA
TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS**

**Director de Tesis: Prof. Dr. José Suazo Sanhueza
Co-Director de Tesis: Prof. Dra. Alicia Colombo Flores**

**Santiago Chile
2024**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS**



**UNIVERSIDAD
DE CHILE**

**“DETERMINACIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS
INVOLUCRADAS EN EL TRANSPORTE Y
METABOLISMO DEL FOLATO/UN CARBONO Y SU
ASOCIACIÓN CON LAS FISURAS OROFACIALES”**

**CARLOS ALBERTO SALAMANCA FIGUEROA
TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS**

**Director de Tesis: Prof. Dr. José Suazo Sanhueza
Co-Director de Tesis: Prof. Dra. Alicia Colombo Flores**

**Santiago Chile
2024**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS

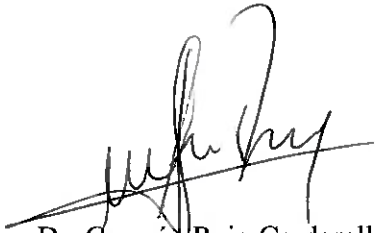
INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS

Se informa al Consejo de Posgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Odontológicas presentada por el candidato

Carlos Alberto Salamanca Figueroa

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias Odontológicas, en examen rendido el día 5 de junio de 2024.

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS



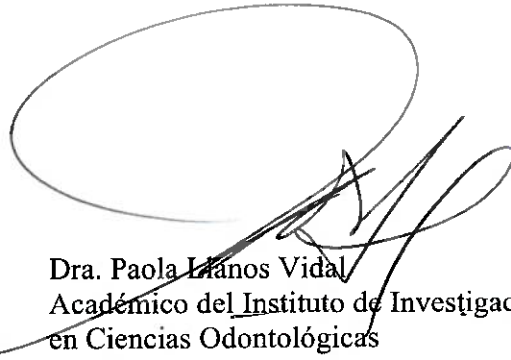
Dr. Germán Reig Cardarella
Coordinador Investigación
Escuela de Tecnología Médica
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Bernardo O'Higgins



Dra. Viviana Toro Ibacache
Académico del Instituto de Investigación
en Ciencias Odontológicas
Facultad de Odontología
Universidad de Chile



Dr. Germán Manríquez Soto
Académico del Instituto de Investigación
En Ciencias Odontológicas
Facultad de Odontología
Universidad de Chile



Dra. Paola Llanos Vidal
Académico del Instituto de Investigación
en Ciencias Odontológicas
Facultad de Odontología
Universidad de Chile
Presidente Comisión de Examen

DEDICATORIA

A mi esposa Allyn, pilar fundamental en cada paso de este viaje, cuyo amor y apoyo inquebrantable han sido la fuerza que me ha impulsado en los momentos más desafiantes.

A mis hijas Agustina, Emilia y Mia, luz de mis días y motivación constante para ser mejor cada día. Esta tesis es también suya, porque en cada página se encuentra el reflejo del amor y la inspiración que ustedes me brindan.

A mis padres, quienes sembraron en mí las semillas del esfuerzo, la perseverancia y la pasión por el conocimiento. Su ejemplo de vida, sus enseñanzas y su amor incondicional han sido guías constantes en mi camino. Les dedico este logro como un testimonio de mi gratitud y amor eternos.

AGRADECIMIENTOS

Primero y, ante todo, doy gracias a Dios por iluminar mi camino y brindarme la fuerza y sabiduría para llegar a este punto de mi vida académica y personal.

Quiero agradecer de manera especial a mi familia, quienes han sido el refugio y la motivación constante para superar cada obstáculo y seguir adelante con determinación. Sin su amor y apoyo incondicional, este logro no habría sido posible.

Mi profundo agradecimiento al Dr. José Suazo, tutor de esta tesis, por su paciencia, dirección y valiosa orientación durante todo el proceso. Su apoyo y confianza en mis capacidades han sido fundamentales para la culminación de este trabajo.

De manera especial, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Alicia Colombo. No solamente me ha brindado su vasto conocimiento y experiencia, sino que también ha sido esencial en la realización de todos los experimentos necesarios para esta tesis. Su entrega, meticulosidad y dedicación en cada etapa experimental han sido cruciales para el éxito de este trabajo.

Quisiera extender un especial agradecimiento a Néstor Guerrero, cuya habilidad y precisión en la preparación de cortes en las muestras de embriones de pez cebra y la toma de fotografías han sido indispensables. Su compromiso y atención al detalle han sido de gran valor para la calidad y precisión de nuestros hallazgos experimentales.

Además, mi gratitud a la comisión evaluadora de tesis, cuya revisión meticulosa, comentarios constructivos y orientación experta han enriquecido significativamente este

trabajo. Su dedicación al proceso de evaluación ha contribuido enormemente a mi crecimiento académico y profesional.

Finalmente, agradezco a la Universidad de la Frontera por brindarme la oportunidad de crecimiento académico a través de la beca para la realización de esta tesis, lo que ha sido esencial para la culminación de este importante capítulo en mi vida.

PRODUCTOS

Publicaciones Científicas

Salamanca C, González-Hormazábal P, Recabarren AS, Recabarren PA, Pantoja R, Leiva N, Pardo R & Suazo J. A SHMT1 variant decreases the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Chile. *Oral Dis.* 26(1):159-165 (2020).

Salamanca C, González-Hormazábal P, Recabarren AS, Recabarren PA, Pantoja R, Leiva N, Pardo R & Suazo J. Genetic variants in S-adenosyl-methionine synthesis pathway and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Chile. *Pediatr Res.* 2021; 89(4):1020-1025.

Cáceres-Rojas G, **Salamanca C**, Krause BJ, Recabarren AS, Recabarren PA, Pantoja R, Leiva N, Pardo R, Santos JL, Suazo J. Nonsyndromic orofacial clefts in Chile: LINE-1 methylation and MTHFR variants. *Epigenomics.* 2020 Oct;12(20):1783-1791.

Suazo J, **Salamanca C**, González-Hormazábal P, Cáceres-Rojas G, Pantoja R, Leiva N, Pardo R. *PEMT* variants are associated with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Chile. *Epigenomics.* 2022; 14(17):987-993.

Inostroza V, **Salamanca C**, Recabarren AS, Pantoja R, Leiva N, Pardo R, Suazo J. Maternal genotypes of folate/one-carbon metabolism gene variants and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate risk in Chile. *Eur J Oral Sci.* 2021 Oct;129(5):e12813.

Suazo J, **Salamanca C**, Cáceres-Rojas G, González-Hormazábal P, Pantoja R, Leiva N, Pardo R. Vitamin B12 Transport Genes and Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate in Chile. *Reprod Sci.* 2022 Oct;29(10):2921-2926.

Presentaciones a Congresos

Defectos en la Enzima *shmt1* induce defectos orofaciales en el pez cebra. **Carlos Salamanca**. Conferencia en VIII Jornadas de Investigación en Odontología. Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. Noviembre de 2022.

Variantes Genéticas Involucradas en las Fisuras Orofaciales y su manejo ortodóncico. **Carlos Salamanca**. Conferencia en la Universidad de Alfenas (UNIFIA), Alfenas, Brasil. Octubre de 2022.

Salamanca C, González-Hormazábal P, Recabarren AS, Recabarren PA, Pantoja R, Leiva N, Pardo R & Suazo J. Variantes Genéticas del Ciclo Futil del Folato y las Fisuras Labiopalatinas no sindrómicas en Chile. XVII Congreso Latinoamericano de Genética, XLVII Congreso Argentino de Genética, LII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile, VI Congreso de la sociedad Uruguaya de Genética, V Congreso Latinoamericano de Genética Humana y V Simposio Latinoamericano de Citogenética y Evolución. Mendoza, Argentina, 6 y 9 de octubre de 2019.

Salamanca C, González-Hormazábal P, Recabarren AS, Recabarren PA, Pantoja R, Leiva N, Pardo R & Suazo J. La variante rs1979277 del gen SHMT1 en padres y su asociación con fisuras orofaciales no sindrómicas en sujetos de la población chilena. LIII Reunión Anual Sociedad de Genética de Chile. Santiago, Chile, 24 y 27 de noviembre de 2020.

TABLA DE CONTENIDO

1	RESUMEN	15
2	ABSTRACT	16
3	INTRODUCCIÓN	17
3.1	Generalidades	17
3.2	El ácido fólico y su metabolismo	22
3.3	El ácido fólico y las fisuras labiopalatinas	24
3.4	El pez cebra como modelo para explorar el efecto en el desarrollo orofacial de genes del metabolismo del folato/un carbono	29
4	HIPÓTESIS	36
5	OBJETIVO GENERAL	36
6	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
7	MATERIAL Y MÉTODOS	37
7.1	OBJETIVO 1	37
7.1.1	Análisis de Asociación Genotipo-Fenotipo	37
7.1.2	Análisis estadístico	38
7.2	OBJETIVO 2	39
7.2.1	Análisis funcional de las variantes genéticas del metabolismo del folato/un carbono mediante herramientas bioinformáticas	39

7.3	OBJETIVO 3	40
7.3.1	Líneas de peces cebra y mantención	40
7.3.2	Ensayo de inhibición tardío de la enzima SHMT1 en el pez cebra	40
7.3.3	Análisis del fenotipo craneofacial en embriones de pez cebra en presencia del inhibidor de la enzima shmt1	41
7.3.4	Análisis Estadístico	42
8	RESULTADOS	44
8.1	Análisis de Asociación genotipo-fenotipo	44
8.2	Análisis funcional de las variantes genéticas del metabolismo del folato/un carbono mediante herramientas bioinformáticas	46
8.3	Análisis del fenotipo en embriones de pez cebra de las variantes genéticas del metabolismo del folato/un carbono	47
9	DISCUSIÓN	56
9.1	Análisis de Asociación genotipo-fenotipo	56
9.2	SHMT1 y su relación con el desarrollo orofacial del pez cebra.	59
10	CONCLUSIONES	65
11	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
12	ANEXOS	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Clasificación clínica de fisuras de labio y/o paladar</i>	18
Figura 2 <i>Etapas tempranas del desarrollo craneofacial en vertebrados</i>	20
Figura 3 <i>Desarrollo de labio y paladar en humanos</i>	21
Figura 4 <i>El Ácido Fólico, Metabolismo y Metilación</i>	23
Figura 5 <i>Ciclo fútil del folato</i>	28
Figura 6 <i>Visualización de estructuras craneofaciales de pez cebra</i>	31
Figura 7 <i>Línea temporal del desarrollo cráneo-facial del pez cebra</i>	34
Figura 8 <i>Enzima SHMT1 Humana</i>	47
Figura 9 <i>Inhibición de shmt1 en pez cebra</i>	50
Figura 10 <i>Morfología de las estructuras cartilagosas del pez cebra a 4.5 dpf</i>	52
Figura 11 <i>Gráfico de Alometría entre la cabeza y el cuerpo del pez cebra</i>	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Principales genes involucrados en el desarrollo cráneo-facial del pez cebra...</i>	32
Tabla 2 <i>Asociación alélica (aditiva) entre SNPs en genes implicados al metabolismo y transporte de folato/un carbono y NSCL/P en una población chilena</i>	45
Tabla 3 <i>Análisis de alometría</i>	53

1 RESUMEN

Las Fisuras Orofaciales no Sindrómicas (NSOFCs) son una de las malformaciones de nacimiento más frecuentes en Chile y el mundo. A pesar que en otras poblaciones se ha demostrado que la suplementación materna con folatos protege contra las NSOFCs, el aumento en el consumo de folatos en Chile no ha logrado disminuir su prevalencia. El objetivo de este estudio fue evaluar la asociación entre variantes de genes del transporte y metabolismo del folato y las NSOFCs en la población chilena y el efecto de estas variantes sobre el desarrollo embrionario de las estructuras orofaciales del pez cebra en la aparición de un fenotipo de NSOFC. Para este propósito, se analizaron los genotipos desde un array de polimorfismos y se compararon sus frecuencias entre casos y controles. Utilizando herramientas bioinformáticas, se estimó el impacto funcional de las variantes identificadas. Los resultados indican que la variante rs1979277 del gen *SHMT1* podría ejercer un efecto protector contra las NSOFCs. Para evaluar esta hipótesis, se realizó un ensayo de inhibición enzimática de *shmt1* durante el desarrollo orofacial del pez cebra. La inhibición de *shmt1*, resultó en fenotipos anormales, incluyendo un acortamiento moderado de la placa etmoidal, comparable a las fisuras orofaciales en mamíferos, lo que implica un papel crítico de *shmt1* en la condrogénesis y la morfogénesis craneofacial. Se requiere realizar ensayos de mutación dirigida en modelos animales para comprobar si los polimorfismos encontrados presentan el efecto protector evidenciado in silico.

2 ABSTRACT

Non-Syndromic Orofacial Clefts (NSOFCs) are among the most common birth defects in Chile and worldwide. Although maternal folate supplementation has been shown to protect against NSOFCs in other populations, increased folate consumption in Chile has not reduced their prevalence. The aim of this study was to evaluate the association between variants in folate transport and metabolism genes and NSOFCs in the Chilean population, as well as the effect of these variants on the embryonic development of zebrafish orofacial structures, leading to an OFC phenotype. For this purpose, genotypes from a polymorphism array were analyzed and their frequencies compared between cases and controls. Using bioinformatic tools, the functional impact of the identified variants was estimated. The results indicate that the rs1979277 variant in the SHMT1 gene may exert a protective effect against NSOFCs. To evaluate this hypothesis, an enzymatic inhibition assay of *shmt1* was performed during zebrafish orofacial development. The inhibition of *shmt1* resulted in abnormal phenotypes, including a moderate shortening of the ethmoid plate, comparable to orofacial clefts in mammals, implying a critical role for *shmt1* in chondrogenesis and craniofacial morphogenesis. Targeted mutation assays in animal models are required to confirm if the identified polymorphisms have the protective effect evidenced *in silico*.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 Generalidades

Las Fisuras Orofaciales (OFC, por su nombre en inglés, orofacial clefts) son una de las malformaciones de nacimiento más frecuentes en Chile y el mundo, cuya etiología es compleja e involucra tanto factores genéticos como ambientales¹. Las OFCs se presentan en aproximadamente 1 de cada 700 nacidos vivos, las cuales se pueden clasificar como fisura labial aislada, fisura de paladar aislada y fisura labiopalatina tanto unilateral como bilateral² (Figura 1). Aproximadamente el 70% de las fisuras orofaciales son no sindrómicas con una contribución genética de 20 a 30%, siendo su etiología y patogénesis complejas y poco entendidas. Además, se han identificado entre 300 a 500 síndromes genéticos que son acompañados de OFC. Por otro lado, ciertos factores ambientales, como la exposición a teratógenos, pueden alterar el desarrollo embrionario normal y contribuir a la aparición de OFC³.

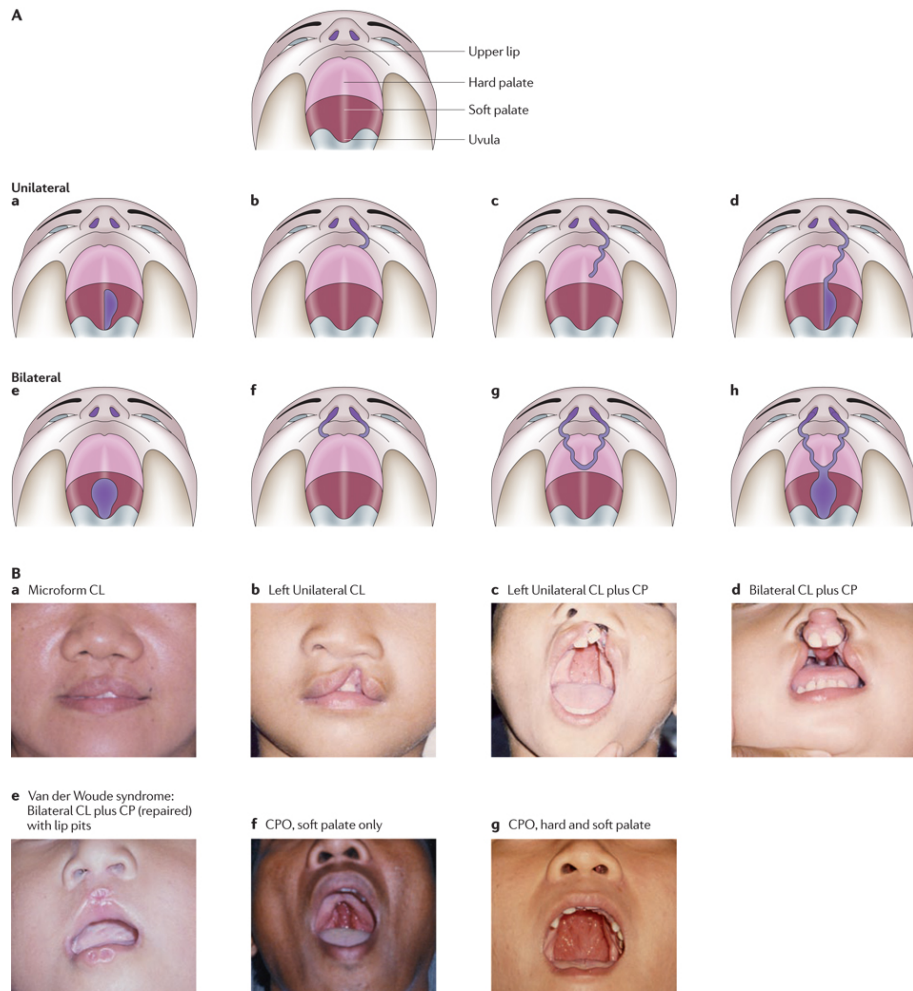


Figura 1. Clasificación clínica de fisuras de labio y/o paladar

(A) Estructuras labio-palatina normal. (a y e) muestra un tipo de fisura unilateral y bilateral del paladar blando, respectivamente. (b y f) muestra un tipo de fisura unilateral y bilateral de labio, respectivamente. (c y g) se muestran fisuras del labio y paladar primario unilateral y bilateral respectivamente. (d y h) muestran fisuras de labio y paladar de forma unilateral y bilateral, que involucran estructuras como labio superior, paladar blando y duro. (B) Imágenes clínicas de OFCs; (a y e) muestran micro formas de fisura de labio. (b) muestra fisura de labio unilateral. (c y d) muestran grados de fisura de labio y paladar unilateral y bilateral respectivamente. (f) muestra una fisura de paladar blando y (g) muestra una fisura completa de paladar (paladar blando y duro). (Modificado de Michael J. Dixon., *et al.*, 2011).

La etiología de las fisuras orofaciales es multifactorial, mostrando una interacción entre componentes genéticos y ambientales. Factores como estrés materno⁴, nicotina⁵, alcohol⁶, fármacos como fenitoína⁷, antiinflamatorios no esteroideos (AINES)⁸, deficiencias nutricionales⁹, edad extrema de los progenitores y agentes patógenos como bacterias, virus y protozoos aumentan el riesgo de OFC¹⁰. Existe además un alto riesgo de recurrencia familiar, lo que se traduce en una elevada probabilidad de que un rasgo presente en un miembro de la familia se manifieste en otros miembros de la familia en la misma o en posteriores generaciones. En parientes de primer grado se estima que el riesgo aumenta 32 veces con relación a un individuo sin historial de OFC¹¹. El rango de concordancia en gemelos monocigóticos es de 40-60%, en comparación con gemelos dicigóticos que es de un 3-5%, lo que destaca el componente genético de las OFCs¹¹.

Las OFCs son producidas por defectos en la fusión y/o extensión de las prominencias craneofaciales, por lo que se ha postulado que genes involucrados en dichos procesos son posibles candidatos en la etiología genética de las OFCs¹². Durante el desarrollo embrionario, la morfogénesis de las estructuras craneofaciales se divide en varias etapas dentro de las cuales encontramos: (i) inducción de la placa neural y formación del tubo neural¹³; (ii) migración celular desde la cresta neural hacia la región anterior de la cara que da lugar a la formación de los arcos faríngeos¹⁴ (Figura 2); (iii) proliferación y diferenciación de las células de la cresta neural (CCNs) a condrocitos comandando la

extensión de las prominencias faciales, arcos faríngeos y el esqueleto craneofacial; (iv) luego estos procesos se fusionan con el tabique nasal medio para formar paladar y la úvula (días 50 a 60)^{15,16} y; (v) conformación de la cara mediante el crecimiento direccional del esqueleto¹⁷ (Figura 3). La coordinación temporal y espacial de estos eventos críticos es regulada por múltiples genes. Alteraciones en esta regulación, puede resultar en una incorrecta formación y unión de las estructuras del labio superior, alveolo y/o paladar primario, dando como resultado fisuras orofaciales.

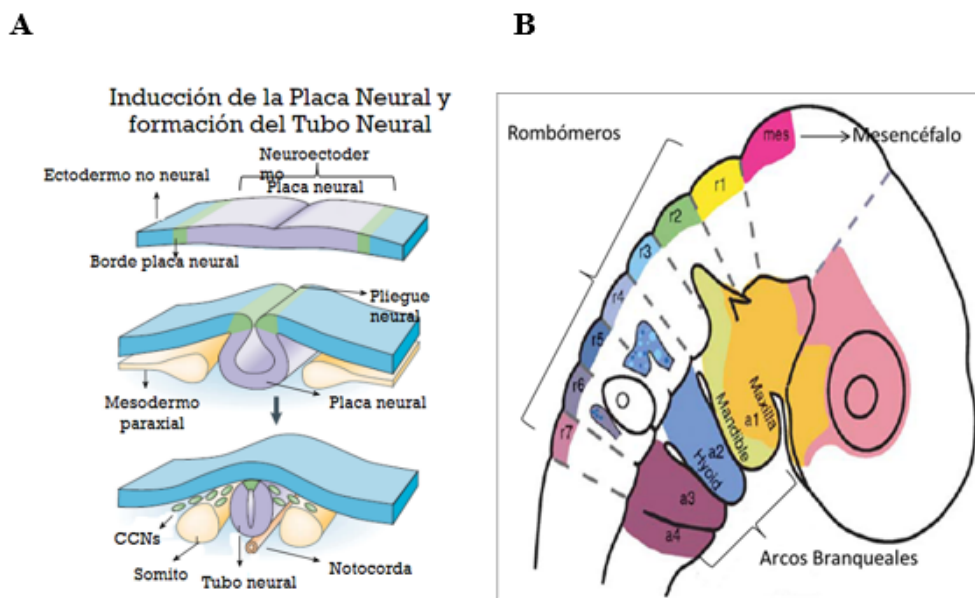


Figura 2. *Etapas tempranas del desarrollo craneofacial en vertebrados*

(A) El desarrollo cráneo-facial se inicia con la inducción de las células de cresta neural (CCNs) y la formación del tubo neural, desde el pliegue neural emergen las CCNs, aquellas precursoras del esqueleto craneofacial se disponen entre los rombómeros y diencéfalo a lo largo del eje dorsal del tubo neural. (B) Posteriormente, estas células migran de forma estereotipada hacia los distintos arcos faríngeos en formación, dando origen a diferentes estructuras del esqueleto orofacial (modificado de Laura S. Gammill & Marianne Bronner-Fraser. 2003; Samantha A. Brugmann, *et al.* 2006).

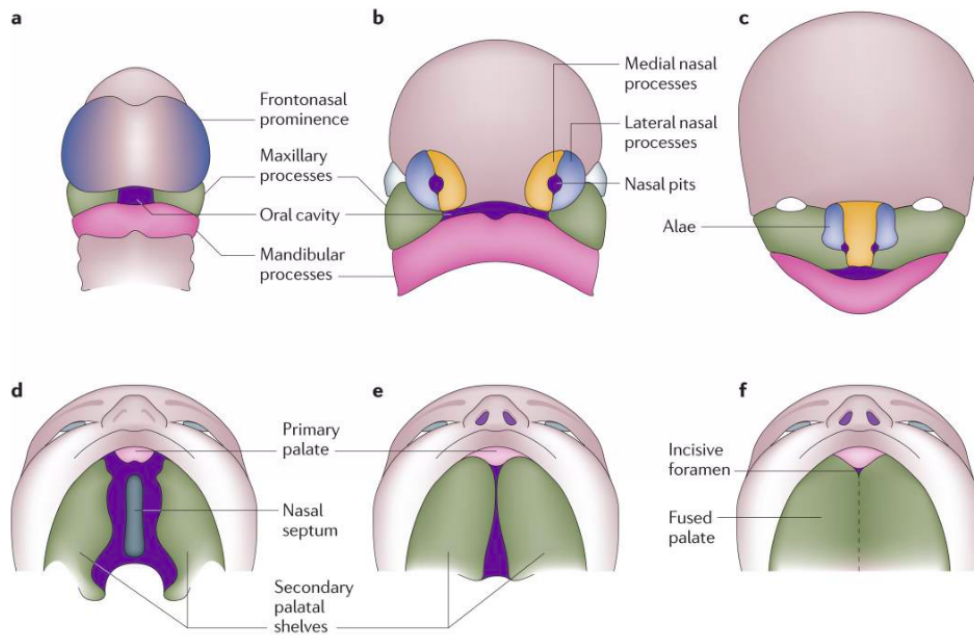


Figura 3. Desarrollo de labio y paladar en humanos

(a) Desarrollo de la prominencia frontonasal y de los procesos maxilares y mandibulares. (b) Formación de las cavidades nasales que desarrollarán los procesos nasales mediales y laterales. (c) Surgimiento de los procesos nasales mediales junto con los procesos maxilares para formar el labio superior y paladar primario. Los procesos mandibulares se unen para formar la mandíbula inferior. (d) El paladar secundario se desarrolla a partir del crecimiento bilateral externo de los procesos maxilares, los cuales crecen verticalmente hacia abajo de los costados de la lengua. (e) Los procesos palatinos se elevan horizontalmente sobre la lengua hasta unificarse. (f) La fusión de los procesos palatinos divide la cavidad oral de la nasal (modificado Michael J. Dixon., *et al.* 2011).

Entre los aspectos epigenéticos, se ha demostrado que la suplementación materna con folatos tiene un efecto protector contra las NSOFCs. Sin embargo, la prevalencia de fisuras orofaciales en Chile no ha disminuido a pesar de la fortificación con folato obligatoria de la harina de trigo desde el año 2000^{19,20}.

Se han identificado variantes genéticas asociadas a genes candidatos responsables del metabolismo y transporte del folato en la población chilena, cuya alteración afecta procesos embrionarios críticos que estarían involucrados en la inducción de NSOFCs^{21,22}.

Sin embargo, su mecanismo de acción aún no ha sido descrito.

3.2 El ácido fólico y su metabolismo

El folato puede aparecer en diversas formas, pero es como dihidrofolato (DHF) como es ingerido principalmente²³. El DHF llega al intestino en forma de poliglutamatos y allí, gracias a la acción del enzima folato hidrolasa que es activa a un pH de 7.5²⁴, es hidrolizado en la superficie del borde ciliado de las células de la mucosa intestinal y transformado en monoglutamatos²⁵. El folato no excretado que permanece en el interior celular actúa como donante y receptor de unidades de un carbono, que son sintetizadas en la célula durante el metabolismo y serán transportadas de una reacción a otra en forma de derivados del folato²⁶. Cuando el tetrahydrofolato (THF) llega al interior celular es transformado en 5-metiltetrahydrofolato -5-MTHF- gracias al enzima 5-MTHF reductasa²⁷. El 5-MTHF se transforma nuevamente en THF y durante este proceso el aminoácido homocisteína emplea el protón expulsado en esta reducción enzimática para generar metionina. En esta reacción están implicados la enzima metionina sintasa junto con la vitamina B12 como coenzima^{26,28,29}, en la denominada vía de la remetilación, que es parte del ciclo de la metionina y está conectada con el ciclo de los folatos³⁰ (Figura 4).

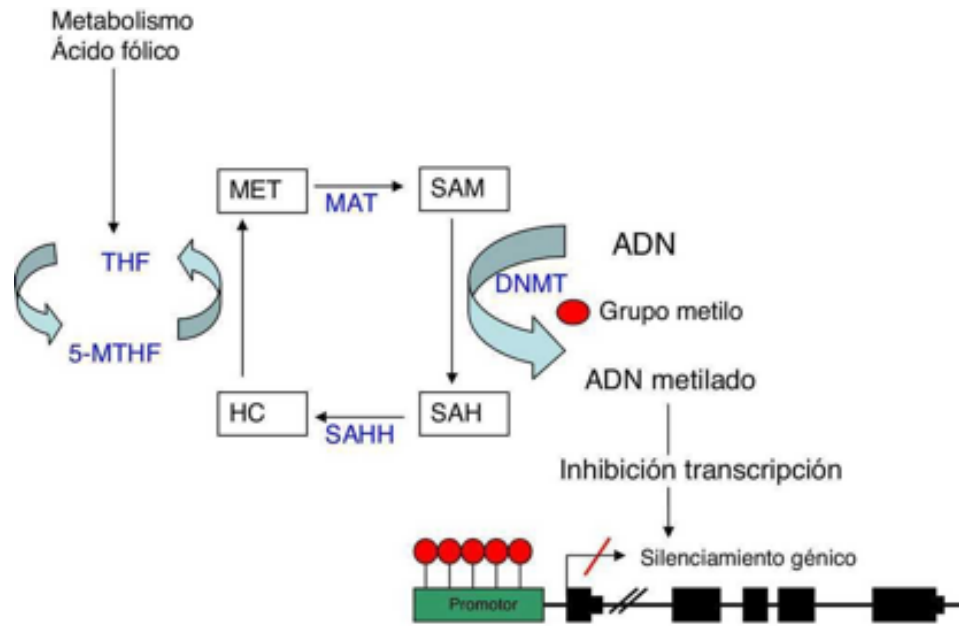


Figura 4. El Ácido Fólico, Metabolismo y Metilación.

La 5,10-metilentetrahydrofolato es requerida para la síntesis de ácidos nucleicos, y la 5-metiltetrahydrofolato es necesaria para la formación de metionina a partir de la homocisteína. La metionina, en la forma de donante de metilo S-adenosilmetionina (SAM), es esencial para muchas reacciones de metilación biológicas, incluyendo la metilación del ADN. La metilentetrahydrofolato reductasa (MTHFR) es una enzima dependiente de la riboflavina y FAD que cataliza la reducción de la 5,10-metilentetrahydrofolato a 5-metiltetrahydrofolato. SAM; S-adenosilmetionina, SAH, 5-adenosilhomocisteína; THF, Tetrahydrofolato. (Tomado de Iridoy *et al.*, 2017).

La importancia de la metionina en parte se debe a su papel en el proceso de la metilación, que consiste en la unión de grupos metilo (-CH₃) a determinadas moléculas como el ADN. En las células eucariotas, los patrones de metilación son específicos de cada tejido y están distribuidos en las islas CpG, que son regiones del ADN donde se concentra un gran número de citosinas (C) unidas por un enlace fosfato (p) a guaninas (G)^{31,32}. En el genoma de los mamíferos, aproximadamente el 70% de las islas CpG están metiladas^{33,34}. Las

zonas metiladas no son reconocidas por los factores de transcripción, lo que implica que los genes regulados por estas regiones no son expresados^{31,35}. Esto permite que la metilación del ADN modifique la expresión génica sin alterar la secuencia del material genético, mecanismo conocido como epigenética³⁶. Los patrones de metilación en las células somáticas son generalmente estables y heredables, sin embargo, son reprogramados ampliamente en las células germinales y durante el desarrollo embrionario temprano, siendo la metilación *de novo* particularmente activa en estos estadios. El patrón de metilación de los gametos es borrado por una desmetilación generalizada cerca del estadio de 8 células. A partir de entonces, la metilación del ADN adquiere patrones específicos durante el desarrollo embrionario³⁵. Este mecanismo epigenético durante el desarrollo embrionario regula la expresión de múltiples vías genéticas que comandan en forma temporal y espacial los distintos procesos de morfogénesis que dan origen a las diferentes estructuras, entre ellas las craneofaciales³⁶.

3.3 El ácido fólico y las fisuras labiopalatinas

La relación entre las CCNs y los niveles de folato es de particular interés debido al papel crítico de estas en el desarrollo embrionario de estructuras craneofaciales. Las CCNs son especialmente susceptibles a deficiencias de folato debido a su alta tasa de división y su papel en procesos críticos como la gastrulación y neurulación³⁷. Esto, a su vez, puede

resultar en defectos del tubo neural y está potencialmente vinculado con la aparición de NSOFCs.

Por otro lado, la suplementación con ácido fólico antes y durante las primeras etapas del embarazo, ha demostrado tener un efecto protector, reduciendo la incidencia de NSOFCs. Este efecto protector se atribuye a la capacidad del folato de asegurar la disponibilidad de recursos metabólicos necesarios para un desarrollo celular óptimo y para la prevención de anomalías en las etapas críticas del desarrollo embrionario^{38,39,40}.

Se describen alrededor de 50 genes que codifican productos involucrados en el metabolismo y transporte del folato, transferencia de grupos metilo al ADN, histonas y otras proteínas y que presentan variantes asociadas a riesgo de OFC⁴¹. Uno de los genes más estudiados en este contexto es el que codifica para la enzima 5,10-metilenetetrahidrofolato reductasa (MTHFR). En el gen codificante de esta enzima se ha descrito un polimorfismo que implica la sustitución de una citosina por una timina en la posición 677 del ADN, lo que conduce a un cambio en el aminoácido 222 de la enzima, de alanina a valina (Ala222Val)⁴². Esta variante de la enzima muestra una actividad reducida, lo que se traduce en bajos niveles plasmáticos de folato y elevados niveles de homocisteína en individuos con el genotipo TT⁴³. Dos meta-análisis han evaluado la relación entre los genotipos maternos de esta variante y OFC no sindrómicas, mostrando una asociación significativa para las madres que portan el genotipo TT^{45,46}. Además, la interacción materna entre los genotipos *MTHFR* c.677C>T y la ingesta materna de folatos

se ha demostrado en el riesgo de OFC⁴⁷. Según la población y el polimorfismo estudiados, los datos indican la existencia de una relación de esta variante de la enzima y la aparición de las OFC⁴⁸.

Karas N, et al.⁴⁹, postularon mediante un enfoque de gen candidato, 9 genes involucrados en el metabolismo y transporte del folato asociados a riesgo de OFC, los cuales fueron descritos mediante *text* y *data mining* usando herramientas bioinformáticas. Los polimorfismos encontrados fueron para el transportador de folato reducido (SLC19A1), la folil poliglutamato sintasa (FPGS), el dihidrofolato reductasa (DHFR), la N-metiltransferasa de glicina (GNMT), la metilentetrahidrofolato deshidrogenasa 1 (MTHFD1), MTHFR, la metionina sintasa reductasa (MTRR), la betaína-homocisteína metiltransferasa (BHMT), la glicina N-Metiltransferasa (GNMT) y los genotipos de ADN (citosina-5-) -metiltransferasa 3 beta (DNMT3B), en los cuales se confirmó que los genotipos variantes de GNMT aumentan el riesgo de OFC. Sin embargo, no está claro cómo la activación o silenciamiento de estos genes podría afectar el desarrollo craneofacial y la formación del paladar.

Además del ciclo mencionado, se ha descrito un proceso menos conocido llamado “ciclo inútil” o ciclo fútil de folato citoplasmático⁵⁰. Aunque este proceso no parece ser la fuente principal de folatos para la síntesis de S-adenosil-metionina (SAM), esta vía parece ser

importante para el mantenimiento del metabolismo del folato/un carbono⁵¹, especialmente en etapas de altas tasas de proliferación, como en el desarrollo embrionario y del cáncer⁵². El ciclo fútil del folato incluye la conversión de 5-formiltetrahidrofolato (5-FTHF) en 5,10-meteniltetrahidrofolato (5,10-CH-THF) por 5,10-meteniltetrahidrofolato sintetasa (MTHFS) en presencia de ATP. El 5,10-CH-THF se convierte a su vez en 5-FTHF por la serina hidroximetiltransferasa citoplasmática (SHMT1)⁵³. Además, SHMT1 citoplasmática cataliza la conversión reversible de tetrahidrofolato (THF) en 5,10-CH₂-THF (5,10-metilen-THF) en una reacción en la que la serina se sintetiza a partir de la glicina (Figura 5). THF es un cofactor para enzimas involucradas en la síntesis de purinas y en una ruta de múltiples pasos se convierte en 5-MTHF⁵³. Se ha detectado una microdelección de la región cromosómica que contiene el gen codificante MTHFS en un paciente con labio leporino y paladar hendido, entre otros defectos craneofaciales⁷. Además, un SNP de este gen se ha asociado con el riesgo de OFC en una población de ascendencia mexicana en Estados Unidos⁴¹. Mientras tanto, el gen *SHMT1* (17p11.2) codifica la enzima SHMT citoplasmática, compuesta de 483 residuos.

CICLO FUTIL DEL FOLATO

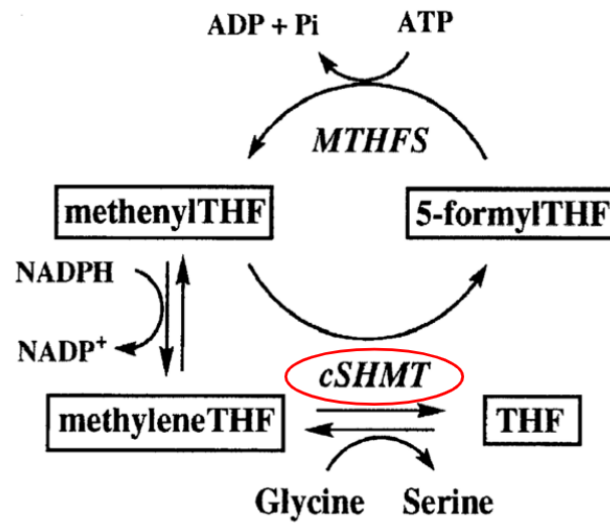


Figura 5. *Ciclo futil del folato*

5-formiltetrahydrofolato (5-formilTHF); meteniltetrahydrofolato sintetasa (MTHFS); meteniltetrahydrofolato (metenilTHF); 5,10-metilenetetrahydrofolato (metilenTHF); serina hidroximetiltransferasa citosólica (cSHMT); tetrahydrofolato (THF) (Girgis *et al.*, 1998).

3.4 El pez cebra como modelo para explorar el efecto en el desarrollo orofacial de genes del metabolismo del folato/un carbono

Para determinar cómo las mutaciones en genes particulares influyen en el riesgo de NSOFC, ha sido ampliamente utilizado el modelo de ratón, debido a la clara similitud de la anatomía craneofacial humana y murina. Sin embargo, la formación de paladar ocurre en una etapa de desarrollo del ratón que es inaccesible para el observador. Además, mientras que la mayoría de los modelos murinos de OFC involucran el paladar secundario, en los humanos las fisuras que involucran el labio y el paladar son más comunes que las de paladar aislado⁵⁴. El pez cebra resulta un modelo alternativo para abordar estudios de los mecanismos genéticos y celulares que producen las OFC, ya que recientemente se ha validado que la morfogénesis de las estructuras orofaciales de pez cebra son comparativas con la de los humanos⁵⁵.

En los mamíferos, el paladar primario se forma a partir de los procesos frontales y el paladar secundario de los crecimientos mediales de las prominencias maxilares que se elevan y fusionan por encima de la lengua⁵⁶, lo mismo ocurre en el pez cebra, donde el techo de la orofaringe es la placa etmoidal formada por la convergencia de las prominencias frontonasales con las prominencias maxilares; posteriormente, la placa etmoidal se une al neurocráneo, que forma la base del cráneo^{55,57,58} (Figura 6).

Una variedad de genes implicados en el programa palatogénico murino y humano son expresados en estructuras craneofaciales análogas en embriones de pez cebra entre las 36 y las 48 horas posteriores a la fecundación (hpf), lo que sugiere que este programa se conserva entre peces y mamíferos⁵⁹ (Tabla 1, Figura 7). De aquí en adelante nos referimos a la placa etmoidal de pez cebra como el paladar. Las ventajas experimentales del pez cebra como organismo modelo incluyen su desarrollo externo, la facilidad de manipulación de genes y su menor costo de mantención en relación a otros modelos como el murino. Además, en los animales transgénicos, las CCNs craneal pueden marcarse fácilmente con colorantes foto convertibles, lo cual es de particular uso en el estudio del desarrollo craneofacial, ya que la mayoría de los huesos de la cabeza se derivan de la cresta neural^{60,61,62}. Estas características han llevado a los investigadores a emplear este modelo para explorar las funciones de desarrollo de los genes implicados en las formas sindrómicas y no sindrómicas de la OFC, analizar las funciones de variantes encontradas en pacientes y evaluar la especificidad tisular de los potenciadores que albergan variantes no codificantes asociadas con NSOFCs⁶³.

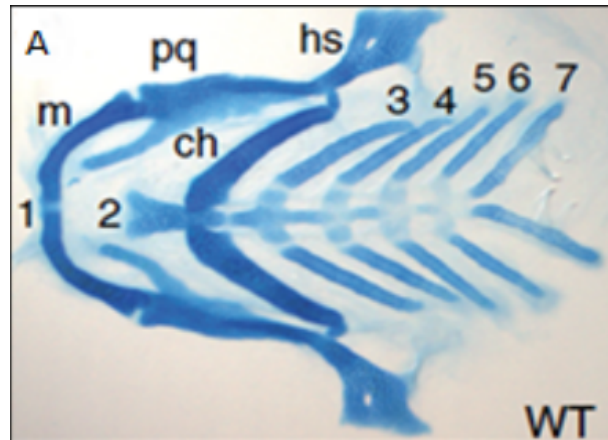


Figura 6. *Visualización de estructuras craneofaciales de pez cebra*

(A) Vista ventral de estructuras orofaciales de un pez cebra wild-type de 96 hpf teñidas con azul de Alcian; Arco de la mandíbula (arco 1), cartílago de Meckel (m); palato cuadrado (pq); arco hioides (arco 2), ceratotil (ch) y los cinco arcos branquiales posteriores (3-7) (Thomas F. Schilling., *et al.* 2009).

La versatilidad del pez cebra para manipular vías genéticas, evaluar efectos de fallas en genes candidatos y de visualizar los defectos mediante imagenología, entre otras ventajas, lo convierten en un excelente modelo para abordar el estudio de las variantes genéticas del metabolismo del folato asociadas al riesgo de NSOFCs⁶⁴.

Tabla 1*Principales genes involucrados en el desarrollo cráneo-facial del pez cebra*

Familia de genes o Gen	Evento morfogénico cráneo-facial en pez cebra	Porcentaje de identidad con los genes humanos (%)	Ref.
Familia <i>hox</i>	-Identidad de las CCNs que migran al primordio facial -Patrón anteroposterior de los arcos faríngeos	72 (<i>hoxa2</i>) y 49 (<i>hoxb2</i>)	Paul A Trainor., <i>et al.</i> 2001; David Chamber., <i>et al.</i> 2002
Familia <i>dlx</i>	-Patrón dorso-ventral de los arcos faríngeos	68 (<i>dlx2a</i>)	Steven M. Sperber., <i>et al.</i> 2008, 66
<i>shh</i>	-Patrón de movimientos morfogénicos medio-lateral cráneo-faciales -Condrogénesis (condensación y proliferación de CCNs en primordio facial) -Palatogénesis	73	Johann K. Eberhart., <i>et al.</i> 2006, Wada N., <i>et al.</i> 2005
Familia <i>bmp</i>	-Patrón de destino ventral del esqueleto craneofacial -Palatogénesis	65 (<i>bmp2a</i>) y 71 (<i>bmp4</i>)	Alexander C., <i>et al.</i> 2011
<i>sox9</i>	-Condrogénesis (diferenciación de CCNs a condrocitos)	77	Yan YL., <i>et al.</i> 2005
<i>sox10</i>	-Inducción y especificación de las CCNs	61	Paola Betancur., <i>et al.</i> 2009
<i>col2a1</i>	-Condrogénesis (formación de matriz del cartílago)	83	Kontusaari S., <i>et al.</i> 1991
<i>gsxe</i>	-Patrón de destino dorso-ventral intermedio cráneo-facial	55	Alexander C., <i>et al.</i> 2011

<i>gsc</i>	-Patrón de destino ventral e intermedio cráneo-facial	71	Monica Dixon Fox., <i>et al.</i> 2009
<i>edn1</i>	-Patrón de destino ventral cráneo-facial	37	Clouthier DE., <i>et al.</i> 2010
Familia <i>wnts</i>	-Crecimiento dirigido del esqueleto craneofacial	73 (<i>wnt5a</i>) y 76 (<i>wnt5b</i>)	Eugene Curtin., <i>et al.</i> 2011

Tabla 1. Se muestran los genes más relevantes del desarrollo orofacial del pez cebra, los eventos morfogenéticos en los que participan y su porcentaje de identidad con sus ortólogos en humano.

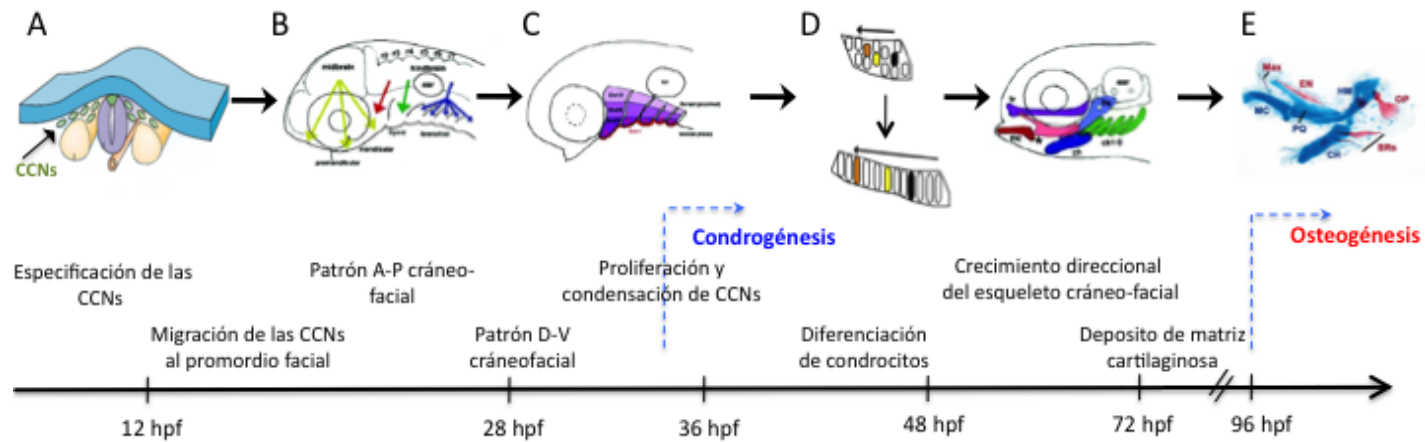


Figura 7. Línea temporal del desarrollo craneo-facial del pez cebra

Se muestran las etapas morfogénicas ocurridas durante el desarrollo craneo-facial del pez cebra. (A) Alrededor de las 10 hpf las células de la cresta neural (CCNs, en verde) son especificadas y comienzan a migrar (fecha). (B) Poblaciones diferenciales de CCNs, localizadas a lo largo del eje antero-posterior del cerebro medio y posterior, (A: estructuras verdes indicadas por la flecha). Para posteriormente migrar de forma estereotipada hacia los distintos arcos branqueales (B) desde las 12 hpf. Una vez que las CCNs llegan al primordio facial, ocurre la especificación del patrón anterior-posterior (A-P) de los arcos branqueales, dando origen a las estructuras pre-mandibulares (flechas amarillas), mandíbula (flecha roja), arco hioides (flecha verde) y los arcos faríngeos (flechas azules). (C) Luego de la formación del patrón A-P, entre las 24-30 hpf tiene lugar la especificación del patrón Dorso-Ventral (D-V), comandada por la expresión diferencial, dentro del eje D-V de los arcos faríngeos de la familia de genes *dlx* (distintas tonalidades de púrpura). Posteriormente, se inicia la condrogénesis, (32 hpf en adelante), que incluye la diferenciación a condrocitos, depósito de matriz extracelular, y (D-E) el crecimiento direccionado de las estructuras orofaciales, entre otros procesos (rojo: cartílago mandibular; azul: cartílago hioides; púrpura: neuro-cráneo; verde: arcos branqueales;). (F) Finalmente, la formación del hueso comienza a partir de las 96 hpf (tinción doble de cartílago [azul] - hueso [rojo]) (Adaptado de Szabo-Rogers., *et al.* 2010; Talbot JC., *et al.* 2012; Gammill & Bronner-Fraser. 2003; Knight RD. 2006).

Se ha demostrado una estrecha relación entre las NSOFCs con el estado materno del metabolismo del folato, donde una deficiencia de este nutriente está asociado a un aumento del riesgo de OFC. Los folatos están involucrados en procesos fundamentales para el desarrollo embrionario temprano normal, como la metilación del ADN, como mecanismo epigenético del control de la expresión génica y la diferenciación celular. Se han identificado alrededor de 50 genes relacionados con el transporte y metabolismo del folato, sin embargo, su mecanismo y asociación con las NSOFCs sigue siendo incierto. Por lo tanto, el propósito de este estudio es entregar información relevante sobre la etiología de las fisuras orofaciales mediante la identificación de las variantes genéticas relacionadas con el metabolismo y transporte del folato/un carbono asociadas a fisuras NSOFC, que sirva de guía para futuras investigaciones que apunten a la prevención y/o posibles intervenciones en sujetos que presentan un alto riesgo para este tipo de malformaciones.

4 HIPÓTESIS

Variantes de genes involucrados en el transporte y metabolismo del folato/un carbono están asociadas al riesgo de NSOFC en la población chilena y presentan un efecto en el desarrollo embrionario de las estructuras orofaciales del pez cebra que se traduce en un fenotipo de OFC.

5 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia de asociación entre variantes genéticas involucradas en el transporte y metabolismo del folato/un carbono y las NSOFC en la población chilena y su posible rol en el desarrollo craneofacial en pez cebra.

6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la presencia de asociación entre variantes polimórficas de genes del metabolismo y transporte del folato/un carbono y NSOFCs en la población chilena en un estudio de casos y controles.
2. Predecir el efecto de las variantes asociadas a NSOFCs en genes candidatos involucrados en el metabolismo del folato/un carbono mediante herramientas bioinformáticas y anotaciones funcionales en bases de datos.
3. Evaluar el efecto de la enzima relacionada a OFCs en el desarrollo orofacial del pez cebra (*Danio rerio*) mediante un ensayo de inhibición enzimática.

7 MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 OBJETIVO 1

7.1.1 *Análisis de Asociación Genotipo-Fenotipo*

Los SNPs (single nucleotide polymorphisms) analizados, corresponden a variantes de genes del transporte y metabolismo del folato, se seleccionaron del archivo de manifiesto de la matriz GSA que contiene 600.000 SNPs en una muestra de 247 casos y 481 controles. Para dicha selección se usaron los siguientes criterios: (1) SNPs ubicados 5 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción y 5 kb río abajo el triplete de detención de acuerdo con el ensamblaje GRCh37 del genoma humano; (2) frecuencia de alelo menor (MAF) menor a 0.05; (3) que no estén en desequilibrio de ligamiento (LD) ($r^2 > 0.8$) con otros SNP contenidos en el array; y (4) que no se aparten del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) en la población estudiada ($p < 0.05$). La aplicación de estos filtros se realizó utilizando PLINK versión 1.9 (genetic tool-set) (<http://www.cog-genomics.org/plink/1.9/>). El uso de estos datos genéticos está aprobado por la Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Protocolo # 2017/07) y todos los participantes o sus representantes legales dieron su consentimiento informado por escrito.

7.1.2 Análisis estadístico

El procesamiento del conjunto de genotipos y los análisis estadísticos se realizó utilizando PLINK 1.9. Se realizó un análisis de regresión logística para evaluar la asociación de SNP bajo los modelos alelo (aditivo), dominante y recesivo. La prueba exacta de Fisher se utilizó para comparar la distribución del genotipo entre casos y controles. Se realizó el análisis de componentes principales. Los componentes principales 1 y 2 se incluyeron en los análisis de regresión logística como covariables para obtener valores de p ajustados para la estratificación de la población. La tasa de descubrimiento falso (FDR) se utilizó como método de corrección por comparaciones múltiples. El límite del valor p ajustado por FDR (valor q) es de 0,05.

7.2 OBJETIVO 2

7.2.1 Análisis funcional de las variantes genéticas del metabolismo del folato/un carbono mediante herramientas bioinformáticas

Utilizamos herramientas bioinformáticas para predecir el efecto funcional de las variantes con resultados significativos en el objetivo 1, para así, ser seleccionadas para su evaluación en el objetivo 3.

Se realizó un análisis funcional usando **HaploReg** para explorar anotaciones de las variantes no codificantes con potencial efecto en la regulación de la expresión génica mediante marcas epigenéticas. Para predecir el efecto de cómo una sustitución de aminoácidos afecta la función de la proteína, utilizamos **SIFT SCORE** y **PolyPhen-2 score**. Se realizó un análisis de la asociación de una variante con la expresión génica usando la plataforma **GTE**x (Genotype-Tissue Expression). Se utilizó **Human Splicing Finder** para la detección de elementos intrónicos y exónicos y **Transfac**, para el potencial efecto de una variante sobre sitios de unión de factores de transcripción, así como la regulación transcripcional.

7.3 OBJETIVO 3

7.3.1 Líneas de peces cebra y mantención

Se utilizaron las líneas de pez cebra wild type Tübingen (WT TU). Estos son mantenidos en el bioterio/acuario del LEO Lab del ICBM, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, acorde a metodologías estándar⁷⁶. Los embriones se obtuvieron por desove natural y se mantuvieron en medio E3 en una incubadora a 28°C, según protocolos establecidos⁷⁵.

7.3.2 Ensayo de inhibición tardío de la enzima SHMT1 en el pez cebra

Para este ensayo se utilizaron embriones en estadio tardío (28-30 horas posteriores a la fertilización (hpf)) del desarrollo, en los cuales se inhibió la función de la enzima shmt1 durante la etapa de la condrogénesis (30-48 hpf) del desarrollo craneofacial⁸²⁻⁸⁵.

Cuando los embriones WT TU alcanzaron el estadio necesario para comenzar el ensayo, fueron decorionados mediante fórceps Dumont n°5, y traspasados a una placa de 24 pocillos (10 a 12 embriones por pocillo), se eliminó el medio E3 1X de cada pocillo y se le agregó la solución del inhibidor a una concentración de 100, 200, 400, 800 µM y 1 mM disuelta en 1 mL de medio E3 1X estéril preparada a partir de una solución stock de SHMT Hit1 de 200 mM/dimetilsulfóxido 0,5% (Sigma, Aldrich) y se agregó a cada pocillo en condiciones protegidas de la luz, ya que este compuesto es fotosensible. Las placas se incubaron a 28,5°C durante toda la noche. Como control, se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5% en medio E3 1X que es el disolvente apolar del inhibidor. Los ensayos de

inhibición se realizaron en triplicado para el inhibidor y para el control⁸². Al día siguiente se eliminó el medio E3 1X con el inhibidor y el DMSO, realizando 4-5 lavados con medio E3 1X estéril para eliminar por completo el inhibidor de los pocillos. Para finalizar, al medio E3 1X de recambio se le agregó 1-phenyl 2 thiourea (PTU) y las larvas se dejaron incubando hasta los 4,5 días post fertilización (dpf) para realizar el análisis de fenotipo.

7.3.3 Análisis del fenotipo craneofacial en embriones de pez cebra en presencia del inhibidor de la enzima *shmt1*

Para describir el fenotipo craneofacial se utilizó la tinción de Azul de Alcian libre de ácido para visualizar las estructuras cartilaginosas⁶⁷. Los experimentos de tinción de alcian se realizaron en embriones de 4,5 dpf, las cuales fueron eutanasiadas por tricaina al 1% y fijadas en paraformaldehído (PFA) 4%⁶⁷. Posterior a la realización de la tinción de cartilago, los embriones fueron disectados mediante fórceps Dumont n°5 y microsurgical knife 15°, 5.0mm (Depth Green), y fueron montados en un portaobjetos con glicerol 100% para su visualización. La captura de imágenes se realizó bajo un microscopio Nikon Eclipse 80i con el objetivo 10x y 40x, utilizando una cámara fotográfica Nikon Digital Sight DS-Fi1, vinculada al software NIS-Elements F3.0. Las imágenes fueron procesadas mediante el software ImageJ (NIH, Boston, MS, EE. UU.). Para el análisis cefalométrico se midieron tres puntos de interés: el ángulo entre el ceratotil y el punto de la línea media de la unión del ceratotil posterior con el basihial; la longitud del etmoides (punto de la

línea media anterior proximal y posterior distal del etmoides); y la longitud del ceratotil (punto más lateral derecho e izquierdo del ceratotil y la unión antero-lateral derecha e izquierda del ceratotil con el basihial)⁷⁰. Para el análisis de la relación entre el tamaño de la cabeza y el tamaño del cuerpo se midió el tamaño de la cabeza y el largo total de cada individuo en todos los grupos. El tamaño de la cabeza se midió desde el extremo anterior/medio del cartílago de Meckel hasta el extremo posterior medial del 7° arco faríngeo, mientras que el largo total se midió desde el extremo más anterior/medial de la cabeza hasta la cola. Los datos se obtuvieron midiendo 6 embriones por condición experimental para el análisis de las estructuras craneofaciales y 20 embriones para el análisis alométrico.

7.3.4 Análisis Estadístico

El análisis de datos de las mediciones de las estructuras craneofaciales se realizaron mediante la prueba no paramétrica Mann-Whitney (OriginPro8 Software), un $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

Para el análisis de la relación alométrica se realizó una regresión lineal, la cual se ajustó para cada grupo por separado, utilizando el tamaño de la cabeza como variable independiente y el largo total como variable dependiente. La relación entre los grupos se realizó mediante la comparación de las pendientes de los grupos para determinar si existe

una diferencia significativa entre la relación alométrica en el grupo control y el grupo tratado con la inhibición de la enzima shmt1.

8 RESULTADOS

8.1 Análisis de Asociación genotipo-fenotipo

Se reclutaron un total de 247 casos de OFCs no sindrómicos y 481 controles sanos. Se analizaron los genes relacionados al metabolismo y transporte de folato/un carbono donde se encontró que el SNP rs1979277 dentro del gen *SHMT1* está asociado con el fenotipo de OFC en el modelo alélico o aditivo (OR 0,61; IC 95% 0,43–0,88; $p = 0,0071$; $q = 0,04756$) (Tabla 2). Este resultado es consistente con el estudio publicado anteriormente realizado en una muestra de 139 casos y 278 controles de población chilena⁵¹. Decidimos seleccionar este SNP ya que tiene evidencia de ser funcional sobre la actividad de la enzima⁷⁹. La evidencia de la funcionalidad de esta variante se basa en estudios que han demostrado cómo esta variante genética altera la actividad de la enzima SHMT1. Estos estudios han indicado que el SNP rs1979277 resulta en un cambio aminoacídico que afecta directamente la eficiencia catalítica de la enzima, influyendo así en el metabolismo del folato y posiblemente en el riesgo de OFC^{80,85,86}.

Tabla 2

Asociación alélica (aditiva) entre SNPs en genes implicados al metabolismo y transporte de folato/un carbono y NSCL/P en una población chilena

Cromosoma	SNP	Posición (PB)	Alelo de riesgo	OR	Límite superior	Límite inferior	P	P-FDR	GEN
17	rs1979277	18232096	A	0.6138	0.4303	0.8755	0.007058	0.04756	<i>SHMT1</i>
10	rs780807	16948177	T	0.5638	0.4058	0.7833	0.000636	0.4161	<i>CUBN</i>
12	rs117181530	117868532	C	2.559	1.466	4.469	0.000952	0.4161	<i>NOS1</i>
17	rs7946	17409560	C	1.741	1.226	2.472	0.001947	0.438	<i>PEMT</i>
17	rs4646409	17410053	T	1.643	1.199	2.252	0.002005	0.438	<i>PEMT</i>
21	rs76668025	44475289	T	6.976	1.927	25.25	0.003078	0.5381	<i>CBS</i>
10	rs10904883	17175484	A	0.6306	0.4587	0.867	0.00453	0.6599	<i>CUBN</i>
10	rs1801228	17088006	G	3.068	1.371	6.87	0.0064	0.6992	<i>CUBN</i>
21	rs118127630	46940657	A	7.531	1.587	35.75	0.01105	0.8407	<i>SLC19A1</i>

8.2 Análisis funcional de las variantes genéticas del metabolismo del folato/un carbono mediante herramientas bioinformáticas

Según dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), la variante rs1979277 está ubicada en el cromosoma 17 en la posición 18232096 pb correspondiente al exón 12 del gen humano *SHMT1* y la sustitución G > A resulta en un cambio de leucina a fenilalanina y se traduce como una variante sin sentido (p.Leu474Phe, número de acceso NP_004160.3). En la figura 8 se observa la visualización 3D de la enzima y el sitio de la mutación. La herramienta LDlink (<https://ldlink.nci.nih.gov/>) indicó que este SNP no está en desequilibrio de ligamiento (LD) ($r^2 > 0.8$) con otras posibles variantes funcionales. Según la puntuación SIFT (0,03) y PolyPhen-2 (0,00) se predice que esta mutación es **BENIGNA**. Sin embargo, estudios previos han sugerido que esta variante podría tener efectos funcionales más allá de los que indican estas puntuaciones bioinformáticas^{98,99}. Además, de acuerdo con la información de la base de datos GTEx, hemos encontrado que la variante rs1979277 se asocia con la disminución de la expresión del gen *SHMT1* en los arcos faríngeos. Esta información complementa las predicciones bioinformáticas y apoya nuestra elección de esta variante para realizar el análisis experimental.



Figura 8. *Enzima SHMT1 Humana*

Visualización 3D de la enzima SHMT1 humana con el sitio de la mutación marcado en rojo.

8.3 Análisis del fenotipo en embriones de pez cebra de las variantes genéticas del metabolismo del folato/un carbono

Para investigar un posible papel de SHMT1 en la morfogénesis orofacial, utilizamos ensayos de inhibición de la enzima en líneas de pez cebra wild type Tübingen acorde con protocolos previamente establecidos^{70,82}. Con el objetivo de determinar la concentración adecuada del inhibidor para obtener defectos en la morfogénesis craneofacial, se realizó una estandarización del ensayo de inhibición, utilizando inicialmente, concentraciones del inhibidor de SHMT Hit 1 de 2 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM y 100 μM . Se realizaron 2 pruebas con esta curva de concentraciones y no se obtuvo efectos en el desarrollo craneofacial. Por ello, aumentamos las concentraciones a 100 μM , 200 μM , 400 μM , 800 μM y 1 mM. Los criterios para obtener una dosis óptima de inhibidor fueron: (i) no inducir

mortalidad y/o necrosis y (ii) obtener un fenotipo de OFC similar a los descritos en la literatura⁷⁹.

Utilizando concentraciones desde 100 μ M del inhibidor, se obtuvo leves cambios en la morfología craneofacial, observándose un acortamiento discreto en los cartílagos etmoides y ceratotil y un leve aumento en el ángulo entre el cartílago ceratotil y el basihial (figura 9G-I). Estos cambios son dosis dependiente, ya que se hacen más evidentes a medida que se aumenta la concentración del inhibidor. La tasa de mortalidad en los embriones a estas concentraciones de inhibidor fue nula y no se observó necrosis. En los embriones tratados con el inhibidor a una concentración de 1 mM mostraron cambios fenotípicos significativos. Se observó un moderado acortamiento del neurocráneo anterior resultando en una hendidura. El acortamiento de la placa etmoidal es particularmente relevante, ya que constituye un fenotipo indicativo de OFC^{55,57,59}. Esta alteración es importante, ya que este fenotipo es producido por el acortamiento de los procesos palatinos (figura 9K, asterisco). El análisis del esqueleto de la mandíbula mostró un acortamiento del cartílago ceratotil (figura 9L). Además, tanto el cartílago de Meckel como el palatoc cuadrado exhibieron una tinción homogénea con azul de alciano, sugiriendo la conservación de su integridad y la forma de la estructura. En contraste, en los controles tratados con vehículo DMSO 0,5 % a 4,5 dpf, la tinción con azul alcian reveló un esqueleto cartilaginoso craneofacial normal respecto a su largo y forma (figura 9D-F).

El análisis morfométrico de las estructuras orofaciales mostró una disminución significativa de la longitud del etmoides ($p=0.0022$) y del cartílago ceratotil ($p=0.0022$), mientras que el ángulo formado en el cartílago ceratotil con el basihial ($p=0,03$) en el grupo de concentración de 1 mM de inhibidor presenta un aumento significativo (figura 9L). Estos hallazgos muestran un acortamiento de las estructuras orofaciales inducido por la inhibición de la enzima *shmt1*. Los resultados sugieren que la inhibición en la función de *shmt1* en la fase post migratoria de las células de la cresta neural, durante la condrogénesis (30-48 hpf), se puede traducir en defectos de la morfología normal del esqueleto cartilaginoso, lo que incluye OFC⁶⁸. Las malformaciones morfológicas orofaciales observadas, se pueden interpretar en el pez cebra como diversos grados de OFC, ya que, tanto el acortamiento de la placa etmoidal (análogo del paladar en mamíferos) y del cartílago ceratotil, así como el aumento del ángulo formado entre el cartílago ceratotil y el basihial representan fisuras orofaciales en este modelo^{55,59}.

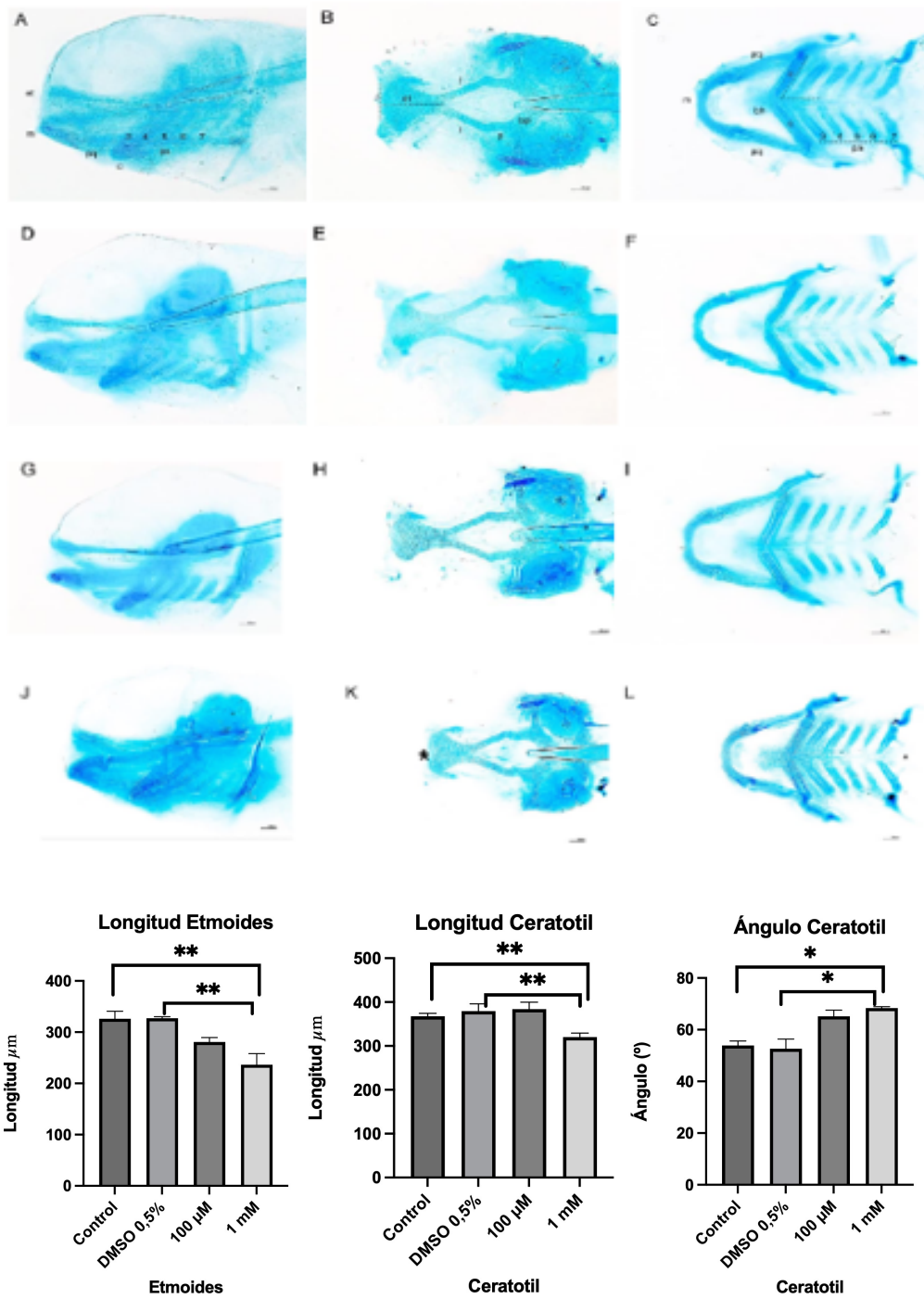


Figura 9. Inhibición de *shmt1* en pez cebra

Vistas de la tinción con azul alcian de las estructuras orofaciales del pez cebra a 4,5 dpf: dorsal (neurocráneo) (A, D, G, J); ventral (viscerocráneo) (B, E, H, K); lateral (C, F, I, L), anterior a la izquierda. Grupo Control (A–C): elementos cartilagosos normales de estructuras craneofaciales cartilagosas compuestas por elementos maxilares (etmoides y trabéculas), mandíbula (cartílago de Meckel y palatocadrado, arco hioides, ceratotil) y arcos branquiales posteriores (3–7). Control DMSO 0,5% (D–F): Estructuras orofaciales normales. No se observan cambios morfológicos en los elementos cartilagosos. Grupo Inhibidor 100 μ M (G–I): Se observa un leve acortamiento del etmoides y del cartílago ceratotil. Además, se evidencia un aumento del ángulo conformado por el cartílago ceratotil y basihial. No se observan cambios morfológicos en los elementos cartilagosos del viscerocráneo. Grupo Inhibidor 1 mM (J–L): Se observa una disminución significativa de la longitud de etmoides y ceratotil ($p=0,0022$), un aumento significativo del ángulo conformado por el cartílago ceratotil y basihial ($p=0,03$). Se observa acortamiento de los elementos del viscerocráneo. Los gráficos muestran la longitud de la placa etmoidal de los embriones con el inhibidor y los embriones del grupo control, la longitud del cartílago ceratotil de los embriones con el inhibidor y los embriones del grupo control y del ángulo conformado por el cartílago ceratotil y basihial (M–O: $n=6$ por condición). (Abreviaciones: et, etmoides; t, trabécula; cartílago de Meckel; pq, palatocadrado; c, ceratotil; pa, arcos faríngeos; pb, placa basal). Barra de escala 100 μ m.

Los resultados observados respecto a la disminución de la longitud de las estructuras craneofaciales luego de la inhibición de la enzima *shmt1*, podrían también explicarse por un efecto de la disminución de la longitud total del cuerpo de los embriones. Para descartar esta posibilidad, comparamos la longitud de la cabeza con la longitud total del cuerpo de los embriones, entre el grupo control y los grupos tratados (Figura 10). Se realizó un análisis de regresión lineal para analizar la relación alométrica entre el tamaño de la cabeza y el largo total en cada grupo ($n=20$). El análisis de alometría realizado explora la relación entre la longitud de la cabeza y la longitud del cuerpo del pez cebra en las diferentes concentraciones del inhibidor de la enzima *shmt1*. La regresión lineal se ajustó para cada grupo por separado, utilizando el tamaño de la cabeza como variable independiente y el largo total como variable dependiente. Una vez que se ajustaron las regresiones lineales para cada grupo, se compararon las pendientes de las dos líneas para determinar si existe

una diferencia significativa entre la relación alométrica en el grupo control y el grupo tratado con la inhibición de la enzima *shmt1* (Figura 11).

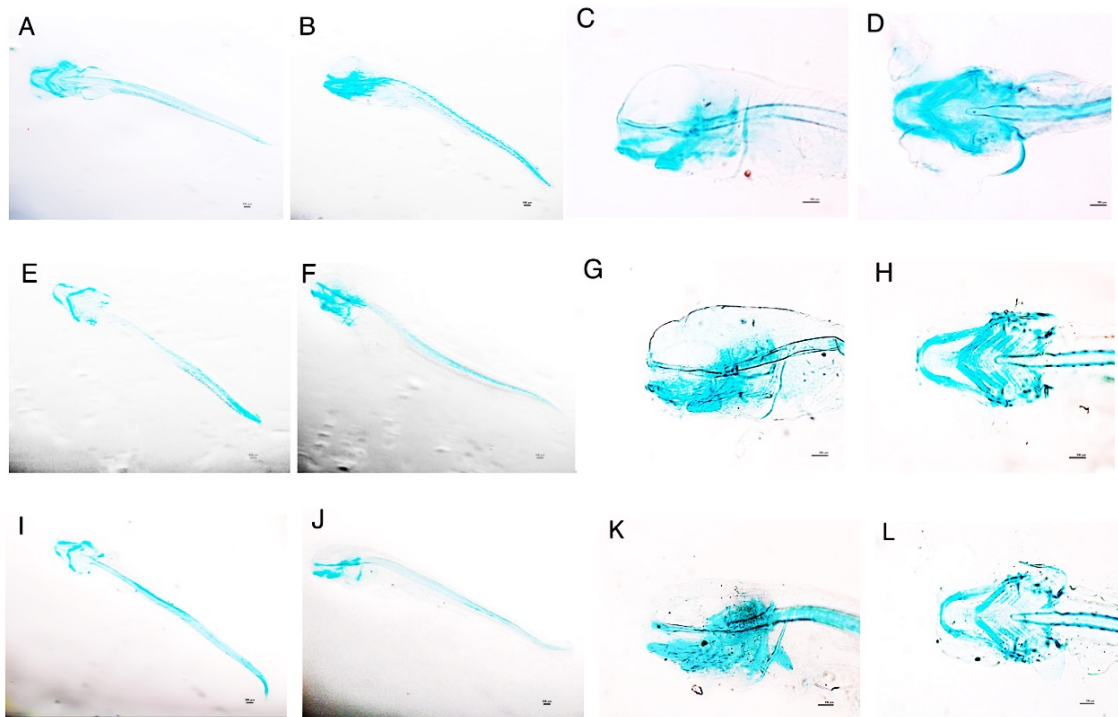


Figura 10. *Morfología de las estructuras cartilagosas del pez cebra a 4.5 dpf.*

Vistas de la tinción de azul de alcian en pez cebra en DMSO 0,5% (A-D), 100 μ M (E-H), 1 mM (I-L), anterior a la izquierda. Grupo Control (DMSO 0,5%): (A) Vista dorsal del pez cebra completo. La imagen muestra la longitud total del organismo, desde la punta de la boca hasta la base de la cola. (B) Vista lateral del pez cebra completo. (C) Vista lateral de la cabeza del pez cebra. (D) Vista dorsal de la cabeza del pez cebra. No se observan cambios morfológicos en los elementos cartilagosos (A-H). Grupo Inhibidor 1 mM (I-L): Se observa un leve cambio morfológico no significativo en los elementos cartilagosos del cuerpo del pez cebra. Se observa una disminución significativa en el tamaño de la cabeza en las vistas lateral y dorsal ($p=0.002$). Barra de escala 100 μ m.

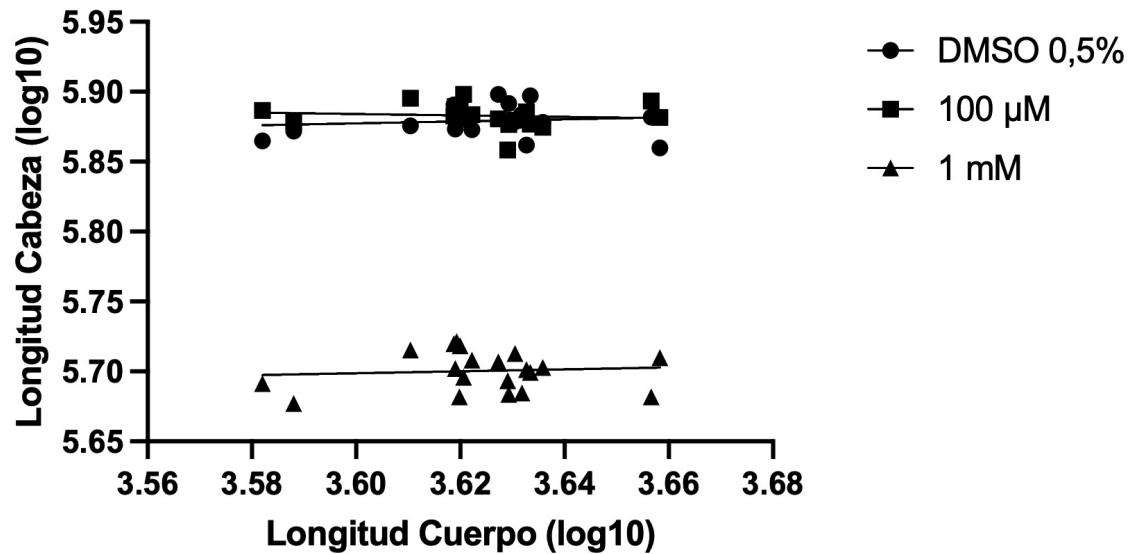


Figura 11. Gráfico de Alometría entre la cabeza y el cuerpo del pez cebra

Relación entre el log10 de la longitud total del pez cebra y el log10 de la longitud de la cabeza en el grupo control (DMSO 0,5%) y los grupos tratados con el inhibidor (100 μM, 1 mM). $p= 0.6, 0.653, 0.707$ en los grupos DMSO 0,5%, 100 μM y 1 mM, respectivamente.

Las ecuaciones alométricas, pendiente y valor de R^2 obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Análisis de alometría

Grupo	Ecuación	Pendiente	R^2
DMSO 0,5%	$Y=0,072*X + 2,6$	0,072	0,016
100 μM	$Y= -0,051*X + 3,1$	-0,051	0,011
1 mM	$Y= 0,069*X + 2,4$	0,069	0,008

Donde "Y" es la longitud de la cabeza y "X" es la longitud del cuerpo. Valores de Pendiente y R^2 para los grupos DMSO 0,5%, 100 μM y 1 mM, respectivamente.

La pendiente calculada en cada grupo experimental indica la relación alométrica entre la longitud de la cabeza y la del cuerpo en los embriones de pez cebra. Nuestro análisis se centró en determinar si existía una correlación significativa entre estas dos medidas en cada uno de los grupos: control (DMSO 0,5%), 100 μ M y 1 mM del inhibidor.

Los valores de p obtenidos para las pendientes de estos grupos fueron 0,6003, 0,6531 y 0,7072 respectivamente. Estos valores indican que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las pendientes observadas en cada grupo y una pendiente de cero o nula, lo cual indica que, dentro de los rangos de concentración del inhibidor, no se observa una correlación estadísticamente significativa entre la longitud del cuerpo y la longitud de la cabeza de los embriones de pez cebra. En otras palabras, los cambios en la longitud de la cabeza no parecen estar asociados de manera significativa con cambios en la longitud del cuerpo bajo estas condiciones experimentales. Por lo tanto, la inhibición de *shmt1* no tiene un impacto significativo en la proporción del crecimiento entre la cabeza y el resto del cuerpo de los embriones de pez cebra.

El valor de R^2 es una medida de qué tanto de la variación en la longitud de la cabeza puede ser explicada por la variación en la longitud del cuerpo⁸⁸. En este caso, los valores de R^2 obtenidos fueron bajos en todos los grupos, lo que refuerza la idea de que la longitud del

cuerpo no es un predictor significativo de la variación en la longitud de la cabeza en este experimento.

La inhibición de la enzima *shmt1* en las concentraciones experimentales utilizadas no afecta significativamente la relación alométrica entre la longitud de la cabeza y la del cuerpo en el pez cebra, lo cual indica que los efectos observados se limitan a una reducción en las estructuras craneofaciales y no implican una disminución general en la longitud total de los embriones.

Nuestros resultados indican que la enzima *shmt1* es necesaria para el desarrollo normal del esqueleto craneofacial en el pez cebra. La inhibición de *shmt1* llevó a defectos significativos en el largo de la placa etmoidal y el cartilago ceratotel. Este acortamiento es característico de las fisuras orofaciales, lo que sugiere que la pérdida de la función de *shmt1* puede tener implicaciones para el desarrollo de OFC en vertebrados.

9 DISCUSIÓN

9.1 Análisis de Asociación genotipo-fenotipo

Existe evidencia que las variantes de los genes implicados en el ciclo del folato están asociadas con OFCs en distintas poblaciones^{93,94,95}. Este hecho fue evaluado previamente en población chilena donde SNP rs1801133 (c.677C>T; p.Ala222Val) del gen *MTHFR* es un factor de riesgo para este defecto congénito⁴⁸.

Hemos analizado la asociación entre los SNP de los genes que codifican los genes relacionados con el transporte y metabolismo del folato en un estudio de casos y controles. Entre estos marcadores, después de la corrección de múltiples comparaciones, solo el SNP rs1979277 del gen *SHMT1* se asoció significativamente con NSCL/P para nuestra muestra (Tabla 2) donde el alelo menor (A) presentó una frecuencia mayor en los controles que en los casos y, por lo tanto, puede considerarse un factor protector.

Como se mencionó anteriormente, *SHMT1* codifica la enzima citoplasmática SHMT que transfiere una unidad de un carbono a 5,10-CH₂-THF desde THF junto con la conversión de glicina en serina⁸⁰. Esta enzima citoplasmática puede modificarse mediante SUMOilación, lo que conduce a su translocación al núcleo para garantizar la disponibilidad de folatos para la biosíntesis de timidilato⁹⁶. En cuanto a la relación entre esta variante y los defectos congénitos, la sustitución rs1979277 G > A fue considerada como un factor de riesgo para defectos del tubo neural en una población india⁹⁷. Sin

embargo, otro informe publicado en Gran Bretaña describe esta variante como un factor protector materno contra los defectos del tubo neural⁹⁸. En comparación con la enzima de tipo salvaje, el polimorfismo p.Leu474Phe disminuye la afinidad del SHMT1 humano por sus sustratos⁷⁸. Las madres portadoras del genotipo AA tienen niveles más bajos de homocisteína plasmática y recuentos más altos tanto de glóbulos rojos como de folatos plasmáticos que aquellas madres con genotipo GG⁷⁹. Así, la disminución de la actividad de esta enzima puede ralentizar la conversión de THF a 5,10-CH₂-THF, aumentando la disponibilidad de THF como cofactor para la síntesis de purinas y su conversión a 5-MTHF, proporcionando unidades de un carbono para la síntesis de SAM⁸⁰.

Esta hipótesis del bloqueo metabólico también está respaldada por otros autores que describieron un efecto protector en relación a los defectos del tubo neural para esta variante⁷⁸. La variante p.Leu474Phe altera la SUMOilación del SHMT citoplasmático, lo que afecta su capacidad para translocar al núcleo⁹⁹. No obstante, una reducción en la actividad nuclear de SHMT1 podría ser compensada por la isoforma mitocondrial de la enzima que, al igual que la forma citosólica, puede translocar al núcleo.

A pesar de que las predicciones bioinformáticas no muestran un impacto significativo de la variante rs1979277 en la actividad enzimática de SHMT1, la evidencia en la literatura sugiere que esta variante desempeña un papel funcional en diversos aspectos de la actividad de SHMT1.

Estudios anteriores han demostrado que, aunque esta variante no altera directamente la actividad catalítica de la enzima, sí afecta el transporte nuclear de SHMT1. Esta alteración en el transporte nuclear conduce a una síntesis de timidilato ineficiente, resultando en la acumulación de la proteína SHMT1 alterada en el citoplasma. Esta acumulación puede inhibir reacciones de metilación celular que son esenciales para la embriogénesis y el desarrollo fetal temprano⁹⁷. Además, los datos obtenidos de la base de datos GTEx sugieren que el polimorfismo rs1979277 en el gen SHMT1 está asociado con una disminución en la expresión del gen. La reducción en la disponibilidad de SHMT1, debido a una menor expresión génica, podría resultar en una actividad enzimática moderadamente reducida, lo que a su vez influiría en el equilibrio del metabolismo del folato y otros procesos metabólicos relevantes para el desarrollo craneofacial⁹².

Un nivel óptimo de actividad de SHMT1, es crucial para el desarrollo normal del paladar y otras estructuras orofaciales⁹⁹. Una actividad enzimática moderadamente reducida podría prevenir una proliferación celular excesiva o una migración inadecuada de células en el paladar en desarrollo, procesos que han sido implicados en la etiología de las fisuras orofaciales¹⁰¹. Además, esta moderación en la actividad de SHMT1 podría favorecer un equilibrio entre la disponibilidad de folatos y la demanda de grupos metilo para procesos críticos, como la metilación del ADN, que son esenciales para el desarrollo normal del tejido craneofacial. En este sentido, la variante rs1979277 y su asociación con una menor expresión de SHMT1 (según GTEx) ilustran cómo las variaciones genéticas pueden influir

en este fino equilibrio. Un nivel óptimo de actividad de SHMT1 podría tener un efecto protector, pero una desregulación en esta actividad, podría tener efectos adversos en el desarrollo humano, particularmente en estructuras complejas como el paladar y otras regiones orofaciales¹⁰²

Algunos autores proponen por otro lado, que la variante rs1979277 tiene un efecto estabilizador en la enzima SHMT1, ya que influiría en la estructura tridimensional de ésta, haciendo que sea más estable y menos propensa a la degradación, esto podría permitir que la enzima funcione durante más tiempo y/o en condiciones más adversas, lo que potencialmente podría mejorar el metabolismo del folato⁸⁶.

9.2 SHMT1 y su relación con el desarrollo orofacial del pez cebra.

Nuestros hallazgos proporcionan evidencia de que la inhibición de shmt1 en embriones de pez cebra tiene un impacto significativo en la morfología craneofacial. En particular, observamos un acortamiento en el cartílago etmoidal y ceratohial que variaron según la dosis de inhibición de esta enzima, lo que se asemeja a la aparición de OFC en mamíferos. Esta observación sugiere un papel crucial de shmt1 en el desarrollo normal del esqueleto craneofacial, lo que concuerda con estudios en otros modelos. Por ejemplo, investigaciones en modelos murinos han demostrado que genes del metabolismo del folato, puede afectar la proliferación y diferenciación celular en el desarrollo craneofacial.

Estos estudios resaltan la importancia de shmt1 en el desarrollo normal del esqueleto craneofacial^{82,84}.

El acortamiento de la placa etmoidal y del cartílago ceratotal podría ser debido a una alteración en la proliferación y/o la diferenciación de las células de la cresta neural que contribuyen a estas estructuras. La enzima shmt1, juega un papel vital en el metabolismo del folato y en la síntesis de ADN, podría ser necesaria para la proliferación de estas células o para su diferenciación en condrocitos. Estos resultados concuerdan con otros autores sobre el papel del folato y la proliferación celular en el desarrollo craneofacial^{70,81,82,86}.

En el modelo de ratón, la enzima shmt1, ha sido estudiada como un factor crítico en la etiología de los defectos del tubo neural sensible al folato. Esta cumple la función de regular la distribución de unidades de un carbono en procesos celulares esenciales como la biosíntesis de timidilato y la remetilación de homocisteína, tanto en el citoplasma como en el núcleo¹⁰¹. Alteraciones en la actividad de shmt1 pueden tener consecuencias significativas a nivel celular. Una actividad reducida de shmt1 podría disminuir la disponibilidad de unidades de un carbono necesarias para la síntesis eficiente de timidilato¹⁰². Esto es crucial, ya que el timidilato es un componente esencial para la síntesis de ADN. Una síntesis deficiente de timidilato puede conducir a la incorporación

de uracilo en el ADN en lugar de timina, provocando una inestabilidad genómica. Esto puede manifestarse en una gran variedad de problemas celulares, incluyendo una reducción en la capacidad de las células para proliferar adecuadamente¹⁰².

Es importante destacar que la enzima *shmt1* no solo es esencial en el metabolismo del folato y la síntesis de ADN, sino que también se ha demostrado que su expresión es particularmente notable en regiones críticas durante el desarrollo del pez cebra⁹¹. Precisamente, el mensajero de *shmt1* se expresa en el tubo neural durante la fase premigratoria de las células de la cresta neural, y en los arcos faríngeos durante la fase postmigratoria de estas células. Este patrón de expresión apoya la hipótesis de que SHMT1 podría tener un papel vital en la proliferación y/o diferenciación de las células de la cresta neural, las cuales son fundamentales para la formación de diversas estructuras craneofaciales.

A pesar de la inhibición de *shmt1* con altas dosis, los fenotipos observados en nuestros experimentos no fueron severos, lo que sugiere la posibilidad de mecanismos compensatorios. Una hipótesis es que otras enzimas del metabolismo del folato, como *shmt2*, podrían tener roles redundantes, compensando parcialmente la falta de actividad de *shmt1*. La enzima SHMT2, al igual que SHMT1, participa en la ruta del metabolismo de un carbono, pero a diferencia de *shmt1*, su expresión y función se localizan principalmente en la mitocondria. En el modelo de pez cebra, la expresión de *shmt2* se ha observado en varias estructuras durante etapas clave del desarrollo embrionario¹⁰³.

Particularmente, estudios han mostrado que SHMT2 se expresa en regiones críticas para el desarrollo neurológico y en tejidos que contribuyen al sistema vascular. Esta distribución es consistente con el papel de SHMT2 en los procesos metabólicos mitocondriales, que son cruciales para el desarrollo y funcionamiento de tejidos con alta demanda energética. Específicamente, la expresión de *shmt2* en el pez cebra se ha documentado en el cerebro en desarrollo, así como en el corazón y en los tejidos musculares, donde la demanda de síntesis de ADN y de grupos metilo es alta¹⁰³.

Además, en respuesta a una función reducida de *shmt1*, otras enzimas y vías metabólicas relacionadas con el ciclo del folato, como las enzimas de la vía de remetilación y síntesis de timidilato, podrían compensar con su actividad y así mantener la disponibilidad de metabolitos. Estas enzimas clave como *mthfr*, *mtr* y *tym*s, se expresan también en regiones relevantes para el desarrollo craneofacial y podrían aumentar su actividad en respuesta a la función reducida de *shmt1*. Este mecanismo compensatorio asegura la continuidad de procesos metabólicos esenciales para el desarrollo craneofacial^{94,96-98}.

La expresión del gen *shmt1* en regiones clave que contribuyen al desarrollo de las estructuras craneofaciales subraya la importancia de su papel en este proceso. Comprender cómo la inhibición de esta enzima puede resultar en el acortamiento de estas estructuras es crucial. Por lo tanto, es esencial continuar investigando cómo la expresión de *shmt1* podría afectar la proliferación y/o diferenciación de las células de la cresta neural para obtener una comprensión más completa de la biología subyacente a estos fenómenos del desarrollo.

Es interesante observar que, en el estudio de asociación en humanos, el SNP en SHMT1 asociado con una menor actividad enzimática evidenciada de manera informática, parece tener un efecto protector, mientras que la inhibición de la actividad enzimática en el pez cebra se relaciona con el fenotipo de OFC. Esta aparente contradicción podría explicarse considerando las diferencias en los mecanismos de compensación y vías metabólicas entre las especies. Además, debemos considerar la diferencia entre una reducción moderada y controlada de la actividad de la enzima (como podría ser el caso con el polimorfismo rs1979277) versus la inhibición completa o severa de la enzima (como en el caso del tratamiento con inhibidores en el pez cebra). Es posible que un nivel moderado de actividad de shmt1, como el asociado con el polimorfismo rs1979277, sea adecuado para mantener un desarrollo normal del paladar, a la vez que ofrece protección contra fisuras orofaciales al restringir una actividad excesiva que podría ser perjudicial.

Esto podría suceder, por ejemplo, si la SHMT1 demasiado activa contribuye a la proliferación celular excesiva o a la migración inadecuada de células en el paladar en desarrollo^{86,93}. Por otro lado, una inhibición de shmt1, como la inducida en los experimentos realizados, podría llevar la actividad de la enzima por debajo del umbral necesario para un desarrollo normal, resultando en fisuras orofaciales. Así, es posible que haya un nivel óptimo de actividad de SHMT1 que sea necesario para el desarrollo normal del paladar, y tanto la actividad excesiva como la actividad insuficiente de SHMT1 pueden

resultar en malformaciones orofaciales⁹³. Sin embargo, se requieren más investigaciones para confirmar esta hipótesis y para entender completamente cómo la actividad de SHMT1 influye en el desarrollo del paladar.

El enfoque de este estudio, combinando análisis genético humano con un modelo animal como el pez cebra, resalta las fortalezas de un enfoque integrado para entender la genética del desarrollo craneofacial. Al emplear un ensayo de inhibición, buscamos comprender el impacto directo de la ausencia de la función de *shmt1* en el desarrollo craneofacial basándonos en la asociación genética encontrada en humanos.

Sin embargo, para explorar más a fondo los efectos de las variantes funcionales específicas que hemos identificado, podríamos utilizar alguna técnica de edición genética como CRISPR-Cas9 para crear modelos de pez cebra que reflejen estos cambios genéticos específicos, ensayos de inmunofluorescencia para la fosfohistona H3 (pH3) y ensayos de TUNEL para analizar proliferación y apoptosis, respectivamente, así como hibridación *in situ* para la detección de la expresión de genes específicos involucrados en la diferenciación del desarrollo craneofacial en pez cebra. Estos estudios deberían considerar las posibles diferencias en la estructura y función de los genes y proteínas entre especies, para proporcionar una comprensión más precisa de cómo las variantes genéticas afectan el desarrollo craneofacial.

10 CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran la asociación entre la variante rs1979277 del gen SHMT1 y las fisuras orofaciales no sindrómicas (NSOFCs) en la población chilena. Esta asociación, indicada por un OR de 0.61, sugiere un efecto protector de esta variante, respaldando hallazgos anteriores en poblaciones similares.

A través de análisis bioinformáticos y experimentales, reportamos que la variante rs1979277 modifica la actividad de la enzima SHMT1, lo que afecta el metabolismo del folato y tiene implicaciones directas en el desarrollo craneofacial. A pesar de que algunas herramientas bioinformáticas califican esta mutación como benigna, la evidencia funcional indica que esta variante influye en la disponibilidad de unidades de carbono y la metilación del ADN, procesos esenciales para el desarrollo craneofacial.

Los ensayos de inhibición de la enzima SHMT1 en pez cebra han proporcionado evidencia directa de que la inhibición en la actividad de esta enzima durante etapas críticas del desarrollo puede resultar en fenotipos análogos a las fisuras orofaciales en humanos. El uso de concentraciones elevadas del inhibidor de SHMT1 condujo a cambios morfológicos significativos, resaltando la relevancia de esta enzima en la morfogénesis orofacial.

Este estudio subraya la importancia de continuar investigando el papel de las variantes genéticas en el metabolismo del folato y su relación con las malformaciones craneofaciales. Los hallazgos sugieren que intervenciones dirigidas a la actividad de SHMT1 podrían ser exploradas mediante estrategias terapéuticas, incluyendo un ajuste personalizado en la suplementación de ácido fólico para prevenir las NSOFCs. Además, se recomienda realizar estudios adicionales que utilicen técnicas de edición genética como CRISPR-Cas9 para replicar y estudiar el efecto funcional de rs1979277 para validar estos resultados y permitir una comprensión más profunda de los mecanismos subyacentes y su aplicación en la prevención o tratamiento de las fisuras orofaciales.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferguson M. Palate development. *Development*. 1988; 103:41–60.
2. Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet*. 2009; 374(9703):1773-85.
3. Muenke M. The pit, the cleft and the web. *Nat Genet*. 2002; 32(2):219-20
4. Nazer J, Cifuentes L. Prevalencia al nacimiento de malformaciones congénitas en las maternidades chilenas participantes en el ECLAMC en el período 2001-2010. *Revista médica de Chile*. 2014; 142(9): 1150-6.
5. Wyszynski D. Maternal Cigarette Smoking and Oral Cleft: A Meta-analysis. *Cleft Palate-Craniofacial J*. 1997; 34(3):206–10.
6. Molina-Solana R. Current concepts on the effect of environmental factors on cleft lip and palate. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2013; 42:177–84.
7. Singh S. *et al*. A comprehensive review of the genetic basis of cleft lip and palate. *J OralMaxillofac Pathol*. 2012; 16(1):64-72.
8. Hernandez RK, Werler MM, Romitti P, Sun L, Anderka M; National Birth Defects Prevention Study. Nonsteroidal antiinflammatory drug use among women and the risk of birth defects. *Am J Obstet Gynecol*. 2012; 6(3):228.e1-8.
9. González G. Asociación entre la prevalencia al nacimiento de nacidos vivos con fisuras orales y el terremoto de magnitud 8,8 y tsunami en la región del Maule. Universidad de Chile, Facultad de Odontología, Santiago, Chile, 2012.

10. Correa AP, Herkrath FJ, Rebelo MA, Vettore MV. Parental age as a risk factor for non-syndromic oral clefts: a meta-analysis. *J Dent*. 2012; 40(1):3-14.
11. Borrero D, Gutiérrez S, Izaguirre L. Caracterización fenotípica de la morfología facial en un grupo de población africana con fisura labiopalatina no sindrómica. *Univ Odontol*. 2010; 29(62):11-8.
12. Montenegro MA, Rojas M. Aspectos Moleculares en la Formación de la Cara y del Paladar. *Int. J. Morphol*. 2005; 23(2): 185-94.
13. Betancur P, Bronner-Fraser M, Sauka-Spengler T. Genomic code for Sox10 activation reveals a key regulatory enhancer for cranial neural crest. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107(8):3570-5.
14. Santagati F, Minoux M, Ren SY, Rijli FM. Temporal requirement of Hoxa2 in cranial neural crest skeletal morphogenesis. *Development*. 2005; 132(22):4927-36.
15. de Aquino SN, Messetti AC, Bagordakis E, Martelli-Júnior H, Swerts MS, Graner E, Coletta RD. Polymorphisms in FGF12, VCL, CX43 and VAX1 in Brazilian patients with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *BMC Med Genet*. 2013; 16:14:53.
16. Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Spinelli G, Lunardi S, Carinci F. Lack of association between common polymorphisms of epidermal growth factor

receptors and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009; 73(7):929-31.

17. Minoux M, Rijli FM. Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. *Development.* 2010; 137:2605-21.
18. Jahanbin A, Shadkam, E, Miri H, Shirazi A, Abtahi, M. Maternal folic acid supplementation and the risk of oral clefts in offspring. *J Craniofac Surg.* 2018; 29:534–41.
19. López-Camelo JS, Castilla EE, Orioli IM. Folic acid flour fortification: Impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries. *Am. J. Med. Genet.* 2010; 152:2444–58.
20. Nazer, H. Prevalence of congenital mal- formations at birth in Chilean maternity hospitals. *Rev Med Chile.* 2014; 142:1150–6.
21. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011; 12(3):167-78.
22. Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet.* 2002; 61(4):248-56.
23. Finnell, R.H., Greer, K.A., Barber, R.C., Piedrahita, J.A. Neural tube and craniofacial defects with special emphasis on folate pathway genes. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1998; 9(1):38-53.

24. Horne DW, Krumdieck CL, Wagner C. Properties of folic acid γ -glutamyl hydrolase (conjugase) in rat bile and plasma. *J Nutr.* 1981; 111:442-9.
25. Lucock, M. Folic acid-vitamin and panacea or genetic time bomb? *Nat Rev Genet.* 2005; 6(3):235-40.
26. Ross, M. Gene–environment interactions, folate metabolism and the embryonic nervous system. *Wiley Interdiscip. Rev Syst Biol Med.* 2010; 2(4):471-80.
27. Zakrzewski SF, Sansone A. Mechanism of reduction of dihydrofolate to tetrahydrofolate. Studies with 7-methyldihydrofolate as a model compound. *J Bio. Chem.* 1967; 242(24):5661-6.
28. Elmore CL, Wu X, Leclerc D, Watson ED, Bottiglieri T, Krupenko NI, Krupenko SA, Cross JC, Rozen R, Gravel RA, Matthews RG. Metabolic derangement of methionine and folate metabolism in mice deficient in methionine synthase reductase. *Mol Genet Metab.* 2007; 91(1):85-97.
29. Zeisel, S. Importance of methyl donors during reproduction. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89(2):673-7.
30. Burjel L, Cordoba M, Ribeiro L, Thomas C. Homocisteinemia basal y post sobrecarga de metionina. Experiencia en una Unidad de Prevención y Seguimiento de Riesgo Cardiovascular. *Acta Bioquím Clin Latinoam.* 2007; 41(1):21-25.
31. Jones, P. DNA methylation and cancer. *Cancer Res.* 1986; 46(2):461-6.

32. Fatemi M, Pao MM, Jeong S, Gal-Yam EN, Egger G, Weisenberger DJ, Jones PA. Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(20):e176.
33. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.* 1996; 10(4):471-80.
34. Robertson K, Jones P. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis.* 2000; 21(3):461-7.
35. Ulrey CL, Liu L, Andrews LG, Tollefsbol TO. The impact of metabolism on DNA methylation. *Hum Mol Genet.* 2005; 14(1):139-47.
36. Rodríguez, D. Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Rev Invest Clin.* 2004; 56(1):56-71.
37. Patterson D, Graham C, Cherian C, Matherly LH. A humanized mouse model for the reduced folate carrier. *Mol Genet Metab* 2008; 93:95-103.
38. Shaw G, Wasserman C, O'Malley C, Tolarova M, Lammer E. Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *Lancet.* 1995; 346(8972):393-6.
39. Chevrier C, Perret C, Bahuau M, Zhu H, Nelva A, Herman C, Francannet C, Robert-Gnansia E, Finnell RH, Cordier S. Fetal and maternal MTHFR C677T

- genotype, maternal folate intake and the risk of nonsyndromic oral clefts. *Am J Med Genet A*. 2007; 143(3):248-57.
40. Boyles AL, Wilcox AJ, Taylor JA, Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM, Drevon CA, Vollset SE, Lie RT. Folate and one-carbon metabolism gene polymorphisms and their associations with oral facial clefts. *Am J Med Genet A*. 2008; 146A(4):440-449.
 41. Blanton SH, Cortez A, Stal S, Mulliken JB, Finnell RH, Hecht JT. Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A*. 2005; 137A(3):259-62.
 42. Matthews R, Sheppard C, Goulding C. Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase: biochemistry and molecular biology. *Eur J of Pediatr*. 1998; 157(2):54-9.
 43. Molloy AM, Mills JL, Kirke PN, Whitehead AS, Weir DG, Scott JM. Whole-blood folate values in subjects with different methylenetetrahydrofolate reductase genotypes: differences between the radioassay and microbiological assays. *Clin Chem*. 1998; 44:186–8.
 44. Zhao M, Ren Y, Shen L, Zhang Y, Zhou B. Association between MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and NSCL/P risk in Asians: a meta-analysis. *PLoS One* 2014;9:e88242.

45. Luo YL, Cheng YL, Ye P, Wang W, Gao XH, Chen Q. Association between MTHFR polymorphisms and orofacial clefts risk: a meta-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012; 94:237–44.
46. Pan Y, Zhang W, Ma J, Du Y, Li D, Cai Q, Jiang H, Wang M, Zhang Z, Wang L. MTHFR polymorphisms and nonsyndromic orofacial clefts susceptibility: a meta-analysis based on 17 case–control studies. *Am J Med Genet A.* 2012; 158A:2162–9.
47. Van Rooij IA, Swinkels DW, Blom HJ, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. Vitamin and homocysteine status of mothers and infants and the risk of nonsyndromic orofacial clefts. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 89:1155–1160.
48. 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; 22(7):703-8.
49. Karas Kuželički N, Šmid A, Kek T, Eberlinc A, Geršak K, Mlinarič-Raščan I. Common polymorphism in the glycine N-methyltransferase gene as a novel risk factor for cleft lip with or without cleft palate. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2018; 47(11):1381-8.
50. Misselbeck, K., Marchetti, L., Priami, C. The 5-formyltetrahydrofolate futile cycle reduces pathway stochasticity in an extended hybrid-stochastic model of folate-mediated one- carbon metabolism. *Sci Rep.* 2019; 4322(9):1-10.

51. Salamanca C, González-Hormazábal P, Recabarren AS, Recabarren PA, Pantoja R, Leiva N, Pardo R, Suazo J. A *SHMT1* variant decreases the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Chile. *Oral Dis.* 2020; 26:159–165
52. Girgis S, Suh JR, Jolivet J, Stover PJ. 5-Formyltetrahydrofolate regulates homocysteine remethylation in human neuroblastoma. *J Biol Chem.* 1997; 272:4729–34.
53. Dayan A, Bertrand R, Beauchemin M, Chahla D, Mamo A, Filion M, Skup D, Massie B, Jolivet J. Cloning and characterization of the human 5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase-encoding cDNA. *Gene.* 1995; 165:307–311.
54. Bush J, Jiang R. Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development. *Development.* 2012; 139:231–43.
55. Dougherty M, Kamel G, Grimaldi M, Gfrerer L, Shubinets V, Ethier R, Hickey G, Cornell RA, Liao EC. Distinct requirements for *wnt9a* and *irf6* in extension and integration mechanisms during zebrafish palate morphogenesis. *Development.* 2013; 140:76–81.
56. Cuervo R, Covarrubias L. Death is the major fate of medial edge epithelial cells and the cause of basal lamina degradation during palatogenesis. *Development* 2004; 131:15-24.

57. Wada N, Javidan Y, Nelson S, Carney TJ, Kelsh RN, Schilling TF. Hedgehog signaling is required for cranial neural crest morphogenesis and chondrogenesis at the midline in the zebrafish skull. *Development*. 2005; 132:3977–88.
58. Eberhart JK, Swartz ME, Crump JG, Kimmel CB. Early Hedgehog signaling from neural to oral epithelium organizes anterior craniofacial development. *Development*. 2006; 133:1069–77.
59. Swartz ME, Sheehan-Rooney K, Dixon MJ, Eberhart JK. Examination of a palatogenic gene program in zebrafish. *Dev Dyn*. 2011; 240:2204–20.
60. McGurk PD, Lovely CB, Eberhart JK. Analyzing craniofacial morphogenesis in zebrafish using 4D confocal microscopy. *J Vis Exp*. 2014:e51190.
61. Rochard LJ, Ling IT, Kong Y, Liao EC. Visualization of Chondrocyte Intercalation and Directional Proliferation via Zebrafish Clonal Cell Analysis in the Embryonic Meckel's Cartilage. *J Vis Exp*. 2015:e52935.
62. Maldonado, E. Experimentación en el pez cebra, un modelo de biología del desarrollo. Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. *Mensaje Bioquímico*. 2003;27.
63. Duncan KM, Mukherjee K, Cornell RA, Liao EC. Zebrafish models of orofacial clefts. *Dev Dyn*. 2017; 246(11):897–914.

64. Hruscha A, Krawitz P, Rechenberg A, Heinrich V, Hecht J, Haass C, Schmid B. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development*. 2013; 140:4982–4987.
65. Gudmundsson S, Wilbe M, Filipek-Górniok B, Molin AM, Ekvall S, Johansson J, Allalou A, Gylje H, *et al.*, TAF1, associated with intellectual disability in humans, is essential for embryogenesis and regulates neurodevelopmental processes in zebrafish. *Sci rep*. 2019; 9(1):10730.
66. Huang P, Xu L, Liang W, Tam CI, Zhang Y, Qi F, Zhu Z, Lin S, Zhang B. Genomic deletion induced by Tol2 transposon excision in zebrafish. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(2):e36.
67. Javidan Y, Schilling T. Development of cartilage and bone. *Methods Cell Biol*. 2004; 76:415-36.
68. Ferguson, J.L., Shive, H.R. Sequential Immunofluorescence and Immunohistochemistry on Cryosectioned Zebrafish Embryos. *J Vis Exp*. 2019; (147):e59344.
69. Signore IA, Jerez C, Figueroa D, Suazo J, Marcelain K, Cerda O, Colombo Flores A. Inhibition of the 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA Reductase Induces Orofacial Defects in Zebrafish. *Birth Defects Research A* 2016; 106:814–30.

70. Dutton KA, Pauliny A, Lopes SS, Elworthy S, Carney TJ, Rauch J, Geisler R, Haffter P, Kelsh RN. Zebrafish *colourless* encodes *sox10* and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates. *Development* 2001; 128: 4113-25.
71. Akimenko MA, Ekker M, Wegner J, Lin W, Westerfield M. Combinatorial expression of three zebrafish genes related to distal-less: part of a homeobox gene code for the head. *J Neurosci.* 1994; 14(6):3475-86.
72. Yan YL, Hatta K, Riggleman B, Postlethwait JH. Expression of a Type II Collagen Gene in the Zebrafish Embryonic Axis. *Developmental Dynamics* 1995; 203:363-76.
73. Thisse, C., Thisse, B. High-resolution *in situ* hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc* 3, 2008;59–69.
74. Aleström P, D'Angelo L, Midtlyng PJ, Schorderet DF, Schulte-Merker S, Sohm F, Warner S. Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. *Lab Anim.* 2020; (3):213-24.
75. Westerfield. Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish *Danio* (Brachydanio) *rerio* 2000. Disponible en https://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html.
76. Shin YS, Song SJ, Kang S, Hwang HS, Jung YS, Kim CH. Novel synthetic protective compound, KR-22335, against cisplatin-induced auditory cell death. *J Appl Toxicol.* 2013; 34(2):191–204.

77. Lawson N, Weinstein B. *In Vivo* Imaging of Embryonic Vascular Development Using Transgenic Zebrafish. *Developmental Biology*. 2002; 248(2):307–18.
78. Fu T, Hunt S, Schirch V, Safo K, Chen B. Properties of human and rabbit cytosolic serine hydroxymethyltransferase are changed by single nucleotide polymorphic mutations. *Arch Biochem Biophys*. 2005; 442, 92–101.
79. Heil S, Van der Put N, Waas E, den Heijer M, Trijbels F, Blom J. Is mutated serine hydroxymethyltransferase (SHMT) involved in the etiology of neural tube defects? *Mol Genet Metab*. 2001; 73:164–172.
80. Skibola C, Smith M, Hubbard A, Shane B, Roberts A, Law G, Morgan G. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002; 99:3786–91.
81. Wen-Ni C, Jen-Ning T, Bing-Hung C, Huei-Sheng H, and Tzu-Fun Fu. Serine Hydroxymethyltransferase Isoforms Are Differentially Inhibited by Leucovorin: Characterization and Comparison of Recombinant Zebrafish Serine Hydroxymethyltransferases. *Drug Metab Dispos*. 2007; 35(11):2127-37.
82. Marani M, Paone A, Fiascarelli A, Macone A, Gargano M, Rinaldo S *et al.*, A pyrazolopyran derivative preferentially inhibits the activity of human cytosolic serine hydroxymethyltransferase and induces cell death in lung cancer cells. *Oncotarget*. 2015; 7(4):4570-83.

83. Ducker G, Ghergurovich J, Mainolfi N, Suri V, Jeong S, Hsin-Jung Li S *et al.*, Human SHMT inhibitors reveal defective glycine import as a targetable metabolic vulnerability of diffuse large B-cell lymphoma. *PNAS*. 2017; 114(43):11404-9.
84. Scaletti E, Jemth AS, Helleday T, Stenmark P. Structural basis of inhibition of the human serine hydroxymethyltransferase SHMT2 by antifolate drugs. *FEBS Letters*. 2019; 593:1863–73.
85. Efremova O, Ponomarenko I, Churnosov M. Maternal polymorphic loci of rs1979277 *serine hydroxymethyl transferase* and rs1805087 *5-methylenetetrahydrofolate* are correlated with the development of fetal growth restriction: A case-control study. *Int J Reprod Biomed*. 2022; 19(12):1067-74.
86. Xiying, M., Wenbo, W., Wangyi, F., & Qinghuai, L. Association of Apolipoprotein E Polymorphisms with Age-related Macular Degeneration Subtypes: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *Arch Med Res*. 2017; 48(4):370–7.
87. Sanchez F, Gutierrez JL. La alometría, una ley de potencias ubicua en la estructura de los seres vivos. *Inter disciplina*. 2020; 8(20):11-22.
88. Zeng H, He D, Zhao Y, Liu NG, Xie H. Association between MTHFR polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C) and recurrent implantation failure: a systematic review and meta-analysis. *Arch gynecol obstet* 2021; 303(4):1089–1098.

89. Cáceres-Rojas G, Salamanca C, Krause BJ, Recabarren AS, Recabarren PA, Pantoja R, Leiva N, Pardo R, Santos JL, Suazo J. Nonsyndromic orofacial clefts in Chile: LINE-1 methylation and MTHFR variants. *Epigenomics*, 2020; 12(20):1783–1791.
90. Knight R, Javidan Y, Zhang T, Nelson S, Schilling T. AP2-dependent signals from the ectoderm regulate craniofacial development in the zebrafish embryo. *Development* 2005; 132(13): 3127–3138.
91. Yan YL, Willoughby J, Liu D, Gage J, Wilson C, Miller C *et al.*, A pair of Sox: distinct and overlapping functions of zebrafish sox9 co-orthologs in craniofacial and pectoral fin development. *Development* 2005; 132(5):1069–1083.
92. Palomares AR, Ruiz-Galdon M, Liu K, Reyes-Engel A, Rodriguez-Wallberg KA. Profiling the Influence of Gene Variants Related to Folate-Mediated One-Carbon Metabolism on the Outcome of In Vitro Fertilization (IVF) with Donor Oocytes in Recipients Receiving Folic Acid Fortification. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(19):11298.
93. Bhaskar L, Murthy J, Venkatesh Babu, G. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and orofacial clefts. *Arch Oral Biol*. 2011; 56: 723–37.
94. Blanton S, Henry R, Yuan Q, Mulliken J, Stal S, Finnell R, Hecht J. Folate pathway and nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2011; 91(1): 50–60.

95. Wang P, Wu T, Schwender H, Wang H, Shi B, Wang ZQ, Yuan Y, Liu DJ, Wang MY, Li J, Zhou ZB, Zhu HP, Beaty TH. Evidence of interaction between genes in the folate/homocysteine metabolic pathway in controlling risk of non-syndromic oral cleft. *Oral Dis*. 2018; 24(5): 820-8.
96. Palmer AM, Kamynina E, Field MS, Stover PJ. Folate rescues vitamin B₁₂ depletion-induced inhibition of nuclear thymidylate biosynthesis and genome instability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114(20): E4095-E4102.
97. K Rebekah P, Tella S, Buragadda S, Tiruvatturu MK, Akka J. Interaction between Maternal and Paternal SHMT1 C1420T Predisposes to Neural Tube Defects in the Fetus: Evidence from Case-Control and Family-Based Triad Approaches. *Birth Defects Res*. 2017; 109(13): 1020-9.
98. Relton CL, Wilding CS, Laffling AJ, Jonas PA, Burgess T, Binks K, Tawn EJ, Burn J. Low erythrocyte folate status and polymorphic variation in folate-related genes are associated with risk of neural tube defect pregnancy. *Mol Genet Metab*. 2004; 81(4): 273-81.
99. Woeller CF, Anderson DD, Szebenyi DM, Stover PJ. Evidence for small ubiquitin-like modifier-dependent nuclear import of the thymidylate biosynthesis pathway. *J Biol Chem*. 2007; 282(24): 17623-31.
100. López-Camelo JS, Castilla EE, Orioli IM; INAGEMP (Instituto Nacional de Genética Médica Populacional); ECLAMC (Estudio Colaborativo Latino

Americano de Malformaciones Congénitas). Folic acid flour fortification: impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries. *Am J Med Genet A*. 2010; 152A(10):2444-58.

101. Beaudin AE, Abarinov EV, Noden DM, Perry CA, Chu S, Stabler SP, Allen RH, Stover PJ. Shmt1 and de novo thymidylate biosynthesis underlie folate-responsive neural tube defects in mice. *Am J Clin Nutr*. 2011; 93(4):789-98.

102. Martiniova L, Field MS, Finkelstein JL, Perry CA, Stover PJ. Maternal dietary uridine causes, and deoxyuridine prevents, neural tube closure defects in a mouse model of folate-responsive neural tube defects. *Am J Clin Nutr*. 2015; 101(4):860-9.

103. Thyme B, Pieper M, Li H, Pandey S, Wang Y, Morris S, Sha C, Choi W, Herrera J, Soucy R, Zimmerman S, Randlett O, Greenwood J, McCarroll A, Schier F. Phenotypic Landscape of Schizophrenia-Associated Genes Defines Candidates and Their Shared Functions. *Cell*. 2019; 177(2):478-491.

12 ANEXOS



MINISTERIO DE SALUD
SERVICIO DE SALUD M. CENTRAL
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO
Teléfono: 25746958.5743520
ESR/CGNS/matv

(Acta N°110/05) 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
 Victoria Subercaseaux #381, Santiago, Chile




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