



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN

**ANÁLISIS DE DOS POLIMORFISMOS DE LA METILENTETRAHIDROFOLATO
REDUCTASA (677C>T Y 1298A>C) EN UNA POBLACIÓN INFANTIL DEL
ESTADO DE HIDALGO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

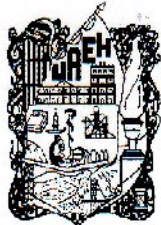
BIÓL. ERNESTO CHÁVEZ CALZADA

DIRECTOR: DRA. MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ



MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO.

2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

MAESTRÍA EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN

M. EN A. JULIO CESAR LEINES MEDÉCIGO

DIR. ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

PRESENTE

Por este conducto le comunico que, después de revisar el trabajo intitulado "ANÁLISIS DE DOS POLIMORFISMOS DE LA METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (677C>T Y 1298A>C) EN UNA POBLACIÓN INFANTIL DEL ESTADO DE HIDALGO" que presenta el alumno de la Maestría en Biodiversidad y Conservación, **Biol. Ernesto Chávez Calzada**, el Comité Revisor de tesis ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Comité Revisor.

PRESIDENTE: Dr. Roberto Ávila Pozos

SECRETARIO: Dra. Laura Rosa Cornejo Roldán

VOCAL: Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

PRIMER SUPLENTE: Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
Mineral de la Reforma, Hidalgo, a 06 de diciembre de 2011.

DR. ORLANDO ÁVILA POZOS
DIRECTOR DEL I.C.B.I.

Agradecimientos

A mi familia...

A mis amigos...

A mis maestros...

Gracias a todos ustedes, que por falta de espacio y sobra de soltura no menciono.

Estoy agradecido con CONACYT por dar sustento para mi mejora profesional

Gracias a Dr. Roberto Ávila por el tiempo dedicado y la paciencia para conmigo

Gracias Dr. Juan Carlos Gaytán por los excelentes consejos y su buena disposición

Gracias Dra. Laura Cornejo por mostrarme el largo camino de la excelencia

Para mi maestra (Dra. Carmen Sánchez), gracias por la oportunidad y por instruirme más allá de lo académico.

Dedicatoria

Para mi mejor ejemplo!

Quisiera ser tu caminito de la escuela, para cuidarte de los monstruos y las fieras,

Quisiera ser tu mochilita de trabajo, para andar contigo para arriba y para abajo,

Quisiera ser tu zapatito rojo, la lluvia de tus ojos, tus piernas al correr

Quisiera ser tu héroe de historitas tu amigo de banqueta, tu compañero fiel,

Quisiera, quisiera....

Jugar contigo todo el tiempo que tú quieras, ser el hilito que sostiene tu cometa,

Quisiera, quisiera....

Cuidarte las espaldas, ser tu ángel de la guarda, poderte proteger aunque me muera...

Quisiera ser tu caballito de madera, para poder llevarte cabalgando a las estrellas...

Pero lo cierto es que no puedo aunque quisiera, hay si pudiera... si yo pudiera...

ÍNDICE

<i>Índice de figuras</i>	<i>iv</i>
<i>Índice de cuadros</i>	<i>vi</i>
RESUMEN	<i>vii</i>
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.-ANTECEDENTES:	2
2.1.- DEFINICIÓN DE LABIO HENDIDO CON O SIN PALADAR HENDIDO	2
2.1.1.- EMBRIOLOGÍA	2
2.1.2.- INCIDENCIA	4
2.2.- ETIOLOGÍA MULTIFACTORIAL	5
2.2.1.- ANTECEDENTES FAMILIARES	6
2.2.2.- EDAD Y NÚMERO DE GESTAS	6
2.2.3.- AGENTES AMBIENTALES.....	7
2.2.3.- FACTORES SOCIOECONÓMICOS.....	7
2.3.- GENES ASOCIADOS AL LABIO HENDIDO CON O SIN PALADAR HENDIDO	8
2.3.1.- OFC1 (LOCUS 6P23 P24)	8
2.3.2.- LOCUS OFC2 (2P13).....	9
2.3.3.- OFC5 (GEN MSX1)	10
2.3.4.- OFC6 (GEN IRF6).	10
2.3.5.- OFC7 (GEN PVRL1)	11
2.3.6.- OFC8 (GEN TP73L).....	11
2.3.7.- OFC9 (LOCUS 13Q33.1-Q34).....	11
2.3.8.- OFC10 (GEN SUMO1).....	12
2.3.9.-RARA (LOCUS 17Q21.1).....	12
2.4.- MTHFR (1P36 LOCUS)	12
2.4.1.-VARIANTE 677C>T	13
2.4.2.-VARIANTE 1298A>C	15
2.5.-SNP Y ENFERMEDADES MULTIFACTORIALES	16

2.6.-ESTUDIOS SOBRE LOS POLIMORFISMOS DE LA MTHFR.....	17
3.-JUSTIFICACIÓN:	21
4.-OBJETIVOS:	23
4.1.- <i>General:</i>	23
4.2.- <i>Específicos:</i>	23
5.- HIPÓTESIS:	25
6.-MATERIALES Y MÉTODOS:	26
6.1- <i>Definición del tamaño de muestra</i>	26
6.2.- <i>Toma de muestras</i>	27
6.2.1.- <i>Muestras Biológicas</i>	27
6.2.2.- <i>Datos clínicos</i>	27
6.2.3.- <i>Genotipificación</i>	28
6.3.- <i>Análisis Genético</i>	29
6.3.1.- <i>Equilibrio de Hardy-Weinberg</i>	29
6.3.2.- <i>Estructura genética</i>	31
6.4.- <i>Estudio de casos-controles y análisis de agregación familiar</i>	32
6.4.1.- <i>Selección de casos (tríos) y controles</i>	32
6.5.- <i>Métodos estadísticos</i>	33
6.5.1.- <i>Estadística descriptiva</i>	33
6.5.2.- <i>Estadística inferencial</i>	34
6.5.3.- <i>Asociación de variables con Malformación</i>	36
6.5.4.- <i>Análisis simultáneo de los polimorfismos de la MTHFR</i>	36
6.5.5.- <i>Identificación de los haplotipos de riesgo</i>	38
6.6.- <i>Test de Desequilibrio de Transmisión</i>	40
7.-RESULTADOS:	41
7.1.- <i>Análisis de variabilidad y estructura genética de los polimorfismos</i>	41
7.2 <i>Análisis estadístico para casos y controles</i>	44

7.2.2.-Estadística inferencial	52
7.2.2.1.- Análisis de varianza	52
7.3 Análisis de riesgo relativo para los polimorfismos y los factores ambientales.....	59
7.4.- Análisis de equilibrio de ligamiento	63
7.4.-Análisis de Haplotipos	64
7.5.- Heredabilidad y penetrancia.....	67
7.6.- Valores de TDT.....	68
8.-DISCUSIÓN:	71
8.1 Análisis de la variabilidad y estructura genética de los polimorfismos.....	71
8.2 Análisis estadístico para casos y controles.....	74
8.3 Análisis de riesgo relativo para los polimorfismos y los factores ambientales.....	78
8.3.1.- La distribución de los genotipos y frecuencias alélicas	78
8.3.2.- Datos del cuestionario clínico	79
8.4 Análisis de Haplotipos.....	80
9.- CONCLUSIONES:	83
10.-LITERATURA CITADA.....	85
ANEXOS	91
Anexo A:.....	91
Anexo B:.....	99

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1.-Vistas frontales de cabezas de embriones humanos en la quinta y sexta semana de gestación,.....	2
Figura 2.- Vista anterior del embrión a las 7.2 semanas, con labio hendido unilateral...	3
Figura 3.- Vistas frontales de cabezas de embriones mostrando la fusión de los procesos medionasales para formar el labio superior intacto.....	4
Figura 4.- Incidencia de LH c/s PH en América Reporte de la OMS.....	5
Figura 5.-El gen MTHFR.....	13
Figura 6.- Zonas sociodemográficas establecidas para el Estado de Hidalgo establecidas para este estudio.....	267
Figura 7.- Dendograma por el método de UPGMA de Casos, Padres y Madres.....	42
Figura 8.- Tipos de fisuras presentes en los niños pertenecientes al grupo de casos.	45
Figura 9.- A) Distribución en cada zona de las malformaciones identificadas en el estudio.....	46
Figura 10.- Distribución de malformaciones por sexo en el grupo de casos.....	47
Figura 11.-Distribución de sexos en porcentaje para cada una de las malformaciones reportadas en el estudio.	48
Figura 12.- Grados de parentesco, reportados por los individuos con historial familiar positivo.	49
Figura 13.- Porcentajes de número de gestas en el grupo de los casos,	50
Figura 14.- Distribución de edades maternas (A) y paternas (B).....	52
Figura 15.- Valores de Razón de momios.....	61
Figura 16.- Red de haplotipos de conjuntos de familias	66
Figura 17.- Valores de penetrancia del polimorfismo 677C>T.....	68
Figura 18.- Genealogías del grupo de los casos	69

ÍNDICE DE CUADROS:

Cuadro 1.- Prueba de X ² para ambos polimorfismos en el grupo de los casos.....	41
Cuadro 2.-Comparación de distancias genéticas de Nei (1978).....	41
Cuadro 3.- Estadísticos F de Wright para el grupo de familias de casos.....	43
Cuadro 4.- Distribuciones genotípicas y alélicas de las variantes MTHFR en los grupos de estudio.....	44
Cuadro 5.- Tabla resumen del procedimiento ANOVA de un factor y Prueba de Levene	53
Cuadro 6.- Coeficientes de la función discriminante.....	55
Cuadro 7.-Matriz de correlaciones de las variables obtenidas del cuestionario clínico..	56
Cuadro 8.- Varianza explicada por cada componente.....	57
Cuadro 9.- Correlación de las variables con los componentes.....	58
Cuadro 10.- Comparación entre casos y controles (X ²) de las variables de riesgo y su razón de momios (OR).....	59
Cuadro 11.- Razón de riesgo para ambos polimorfismos estudiados.....	62
Cuadro 12.- Valores de la Razón de momios (OR) para los alelos mutados y sus valores de X ² con su respectivo valor de P.	63
Cuadro 13.-Análisis de desequilibrio de ligamiento.....	64
Cuadro 14.-Frecuencias de Haplotipos en los diferentes grupos de estudio.....	64
Cuadro 15.- Razón de momios entre casos y controles para los diferentes haplotipos reportados en el estudio (*haplotipo de mayor riesgo).	65
Cuadro 16.- Valores de heredabilidad para ambos polimorfismos	67
Cuadro 17.- Valores de TDT y sus respectivos valores de “p” para cada uno de los polimorfismos estudiados.	70

RESUMEN

El labio hendido (LH) con o sin paladar hendido (c/s PH) es un caso común de anomalía congénita al cual se le atribuyen diferentes orígenes, tanto ambientales como genéticos. Dentro de las posibles modificaciones metabólicas que pueden originar alteraciones en el desarrollo embrionario, como las fisuras orales, se encuentran variantes mutadas de la 5,10- metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR), que es la enzima que metaboliza la forma predominante de folato circulatorio. Se han identificado que dos polimorfismos en el gen MTHFR: 677C>T y 1298A>C reducen la actividad de dicha enzima, aumentando el riesgo de tener hijos con malformaciones congénitas.

En el presente trabajo, se realizaron dos estudios: uno basado en Casos-Controles y un estudio de agregación familiar (tríos). Se analizaron además las relaciones entre las variables de riesgo y el LH c/s PH, utilizando técnicas estadísticas para determinar la correlación entre dichos factores, tanto ambientales como genéticos. Los resultados obtenidos sugieren los factores de riesgo significativos para la manifestación de LH c/s PH, tanto genético-hereditarios (una línea materna de mayor homología; la combinación heterocigotas de los padres; antecedentes familiares; consanguinidad; multiparidad), como ambientales (las enfermedades en el primer trimestre y/o exposición a fármacos durante el mismo; ocupación y/o nivel de escolaridad de al menos uno de los progenitores).

PALABRAS CLAVE: Labio hendido con o sin paladar hendido, gen MTHFR, factores de riesgo, polimorfismos 677C>T y 1298A>C.

1.- INTRODUCCIÓN

Un caso común de anomalía congénita es el labio hendido (LH) con o sin paladar hendido (c/s PH) al cual se le atribuyen diferentes orígenes, tanto ambientales como genéticos; los niveles bajos de folato predisponen a algunos sujetos a presentar fisuras faciales, asociando la presencia de polimorfismos en los genes codificantes de enzimas de la ruta este metabolito, como la 5,10- metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), que es la enzima que cataliza la forma predominante de folato circulatorio. Se han identificado que dos polimorfismos en el gen MTHFR: 677C>T y 1298A>C reducen la actividad de dicha enzima, lo que disminuye la concentración de folatos en el plasma y la metilación del DNA genómico, aumentando el riesgo de tener hijos con defectos de tubo neural (DTN) y otras condiciones y enfermedades asociadas, como fisuras orales.

En el presente trabajo, se realizaron dos estudios: uno basado en Casos-Controles, en niños afectados versus niños sin la malformación, monitoreados en el Hospital del Niño DIF de Pachuca, Hidalgo, así como el padre y la madre de cada uno, para verificar la herencia de los dos polimorfismos del gen MTHFR en una población infantil del estado de Hidalgo. Adicionalmente, se realizó un estudio de agregación familiar (tríos) tanto en los individuos afectados como en sus padres. Las relaciones entre las variables de riesgo y el LH c/s PH se evaluaron a partir de un cuestionario clínico y la genotipificación para ambos polimorfismos del gen de la MTHFR, utilizando técnicas estadísticas para determinar la correlación entre los factores de riesgo ambientales y genéticos.

2.-ANTECEDENTES:

2.1.- Definición de Labio Hendido con o sin Paladar Hendido

El Labio Hendido con o sin Paladar Hendido (LH c/s PH) es la falta de fusión entre el proceso maxilar del lado afectado con su respectivo proceso nasomedial, este último derivado de la placoda olfatoria (Moore, 2004).

2.1.1.- Embriología

Durante la quinta semana de gestación, el engrosamiento del ectodermo ocurre bilateralmente en la parte ventrolateral del proceso frontonasal y comienza la formación de dos invaginaciones denominadas placodas olfatorias, que formarán las fosas olfatorias (Figura 1). En esta etapa las fosas olfatorias y el estomodeo (orificio que dará origen a la boca) se encuentran en continuidad, formándose un surco en los procesos nasomedial y el estomodeo, mientras que a ambos lados de los procesos nasomediales el tejido va proliferando (Sedano, 2007).

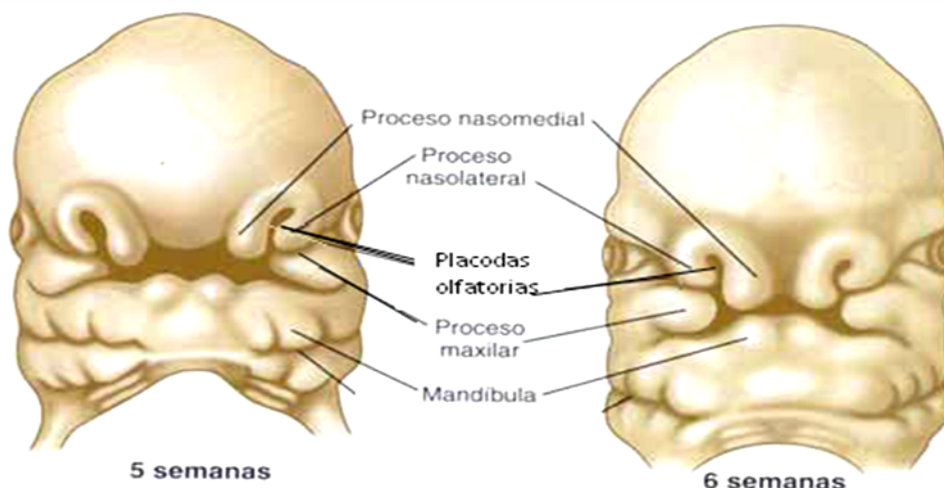
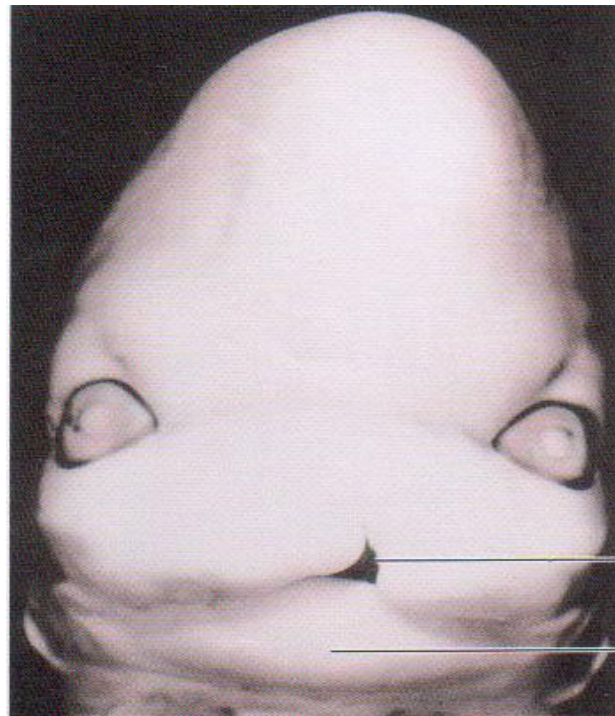


Figura 1.-Vistas frontales de cabezas de embriones humanos en la quinta y sexta semana de gestación, mostrando el movimiento y proliferación de los principales procesos que conforman la cara (Carlson, 2009).

El LH c/s PH ocurre entre la cuarta y la séptima semana de gestación, siendo la sexta semana la de mayor riesgo para su manifestación (Stainer, 2004; Figura 2).



Labio hendido unilateral

Labio inferior

Figura 2.- Vista anterior del embrión a las 7.2 semanas, donde muestra el surco que persiste dejando a las fosas olfatorias y el estomodeo en continuidad, resultando en labio hendido unilateral (Tomada de Moore, 2004).

El labio superior completo se forma a partir de: los primordios maxilares, el primordio nasolateral y el nasomedial; el rápido crecimiento de los procesos maxilares y los procesos nasomediales dan como resultado una fusión entre éstos (Figura 3).

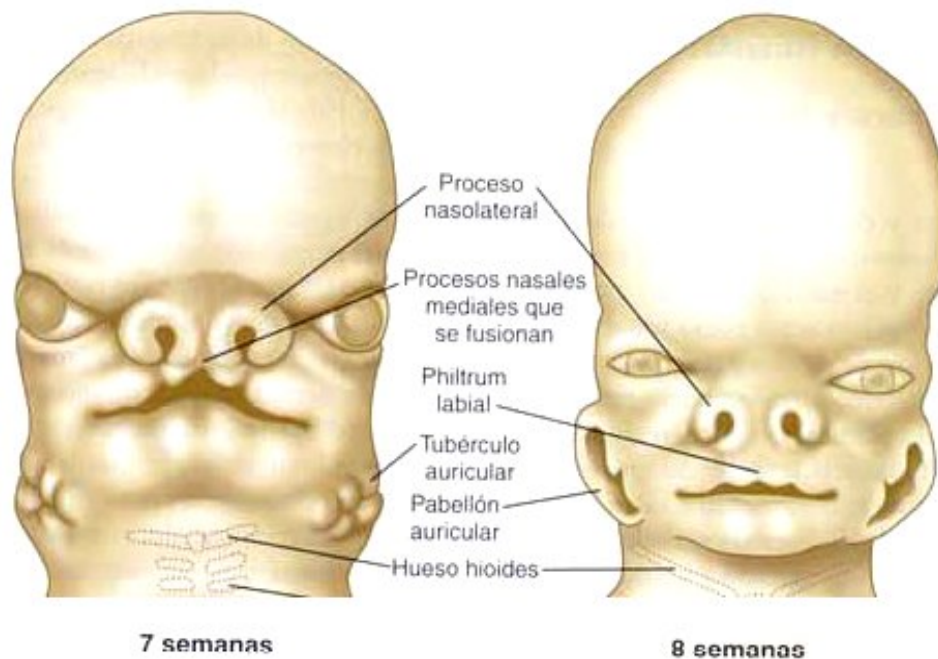


Figura 3.- Vistas frontales de cabezas de embriones humanos en la séptima y octava semana de gestación, mostrando la fusión de los procesos medionasales para formar el labio superior intacto.

2.1.2.- Incidencia

La frecuencia a nivel mundial de LH c/s PH es de uno a dos por cada 1,000 recién nacido vivos (Gorlin, 2001), Por su parte la OMS en “*Global registry and database on craniofacial anomalies*” (2003), refiere tasas de prevalencia para diferentes países por cada 10,000 nacidos vivos: Bolivia 22.94, Japón 16.04, China 12.17, España 7.34, Francia 7.22, Estados Unidos 8.94, Italia 6.74, Israel 3.37, Brasil 11.93. En particular para México, refiere 12.53. Mientras que la incidencia en los grupos humanos restantes se considera constante y se encuentra cercano a 0.5:1,000 (Rodríguez, 2006). No obstante Sedano (2007) refiere una proporción de 1:450 nacidos vivos en países sudamericanos.

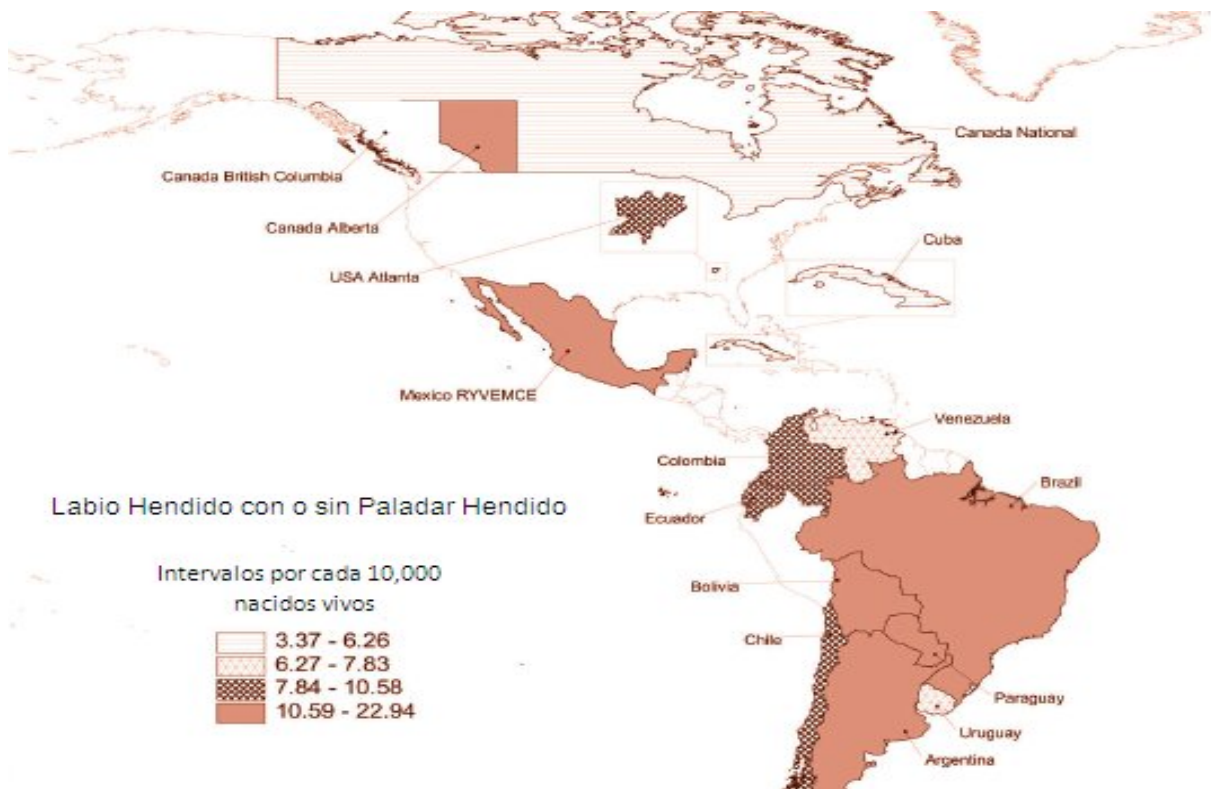


Figura 4.- Incidencia de LH c/s PH en América Reporte de la OMS (*Global registry and database on craniofacial anomalies, 2003*).

2.2.- Etiología multifactorial

La etiología de esta anomalía es de carácter multifactorial y en su aparición juegan un papel importante los factores genéticos y ambientales (Bender, 2000; Stanier, 2004). Se ha identificado que el 70% de los sujetos presentan LH c/s PH no sindrómico, es decir, sin asociación con otras malformaciones (Schutte y Murray, 1999).

Pérez (1993), refiere la presencia de LH c/s PH con antecedentes de otras malformaciones en la familia, apoyando la etiología multifactorial. Entre los parientes de personas con labio hendido, la frecuencia de malformaciones es de 3 a 4% para los hermanos y los hijos, en el caso de parientes de segundo grado comprende entre 0.6 y 1% y un 0.4% en parientes de tercer grado (OMS, 1970)

2.2.1.- Antecedentes familiares

La predisposición hereditaria, combinada con ciertos factores ambientales, puede condicionar la aparición de esta malformación. Se ha reportado intervalos del 33 al 36% positivos con historia familiar en los casos de fisuras de LH c/s PH, (Sacsquispe, 2004).

Fraser (1970) resume los riesgos estándar para LH c/s PH, considerando si los padres no están afectados y tienen un niño afectado, con una probabilidad de 4% de que el próximo hijo tuviera la misma condición, tenga o no un familiar afectado. También una probabilidad de 2% de que el niño afectado también presente otra malformación y 4% si los padres presentan parentesco.

Si uno de los padres está afectado y no tienen niños afectados, la probabilidad de que el próximo hijo presente la alteración es de 4%. Adicionalmente, si tienen un niño afectado, la probabilidad de un próximo niño afectado también, es del 17%

El riesgo también se incrementa por la severidad de la fisura: el hermano subsecuente de un niño con labio hendido unilateral tiene un riesgo de presentar la deformidad cercano al 2.5%; cuando el niño afectado tiene LH c/s PH unilateral el riesgo del hermano es de 4.2% y con LH c/s PH bilateral es de 5.7%.

2.2.2.- Edad y número de gestas

Otras variables que tienen alta incidencia incluyen: edad materna y paterna, ocupación de la madre y padre. El incremento de la edad materna (35 a 40 años) está asociado con el incremento del riesgo para la presencia de hendiduras y otras anormalidades. La edad del padre es aparentemente más significativa que la de la madre, pero el

riesgo ciertamente es mayor cuando ambos padres están por encima de los 30 años de edad (OMS, 1970)

Adicionalmente, la presencia de esta malformación se ha relacionado también con el número de gestaciones de la madre, mostrando mayor prevalencia en donde las madres refieren multiparidad; Sacsquispe (2004) identifica que en el grupo de casos con fisuras, las madres tienen un número de gestación igual o mayor a tres, además registra que el 31.7% consumió algún medicamento.

2.2.3.- Agentes ambientales

Se ha documentado de igual manera que diversos tipos de agentes químicos se ven implicados en la patogénesis de las fisuras de labio y paladar. Investigaciones epidemiológicas han relacionado variables como las ocupaciones paternas, la edad del padre, la contaminación del hogar con solventes y otros agentes químicos y la etiología del LH c/s PH (McDonald, 1988; Sadler, 2003; Thulstrup, 2006).

Amidei (1994) en un estudio en Colorado (Estados Unidos), trabajó con variables antropológicas, como: el género, el grupo étnico y la variación geográfica, encontrando que en el sexo masculino hay mayor incidencia, en cuanto al grupo étnico la raza blanca es la más susceptible y el mayor porcentaje de afectados se presentó en áreas no metropolitanas.

2.2.3.- Factores socioeconómicos

Se ha reportado una asociación entre la alta incidencia de fisuras orales y el bajo nivel socioeconómico familiar, presumiblemente relacionado con la malnutrición que se da en estas condiciones (OMS 1970). La etiología del LH c/s PH establece correlaciones

positivas con factores socioeconómicos bajos, esto evidencia la existencia de una asociación entre el estado de salud y el estatus social (Escoffié, 2010), es decir, individuos con mejor nivel socioeconómico disfrutaban de mejor salud; en el estudio de Murray (1997), en Filipinas, la incidencia de LH c/s PH es de 1:500 en las poblaciones indigentes, mientras que para los nativos de estratos socioeconómicos altos es de 1:1000 nacidos.

2.3.- Genes asociados al Labio hendido con o sin paladar hendido

Con base en lo referido anteriormente, es evidente que el labio hendido con o sin paladar hendido no sindrómico es un trastorno heterogéneo (Murray, 1995). Además varias regiones cromosómicas (1q, 2p, 4q, 6p, 14q, 17q, 19q) se han relacionado con su etiología; los estudios de ligamiento y de asociación realizados en la última década, han llevado a la identificación de más de diez loci, conocidos como "loci OFC" (por sus siglas en inglés; *orofacial cleft*. fisuras orofaciales).

2.3.1.- OFC1 (locus 6p23 p24)

Este gen se reporta localizado en el brazo corto del cromosoma 6, describiéndolo además como un "gen importante" y el principal responsable de la aparición de fisuras craneofaciales. El análisis de ligamiento al locus HLA, que se asigna a 6p21.3, ha dado lugar a resultados controversiales, tanto positivos como negativos (Van Dyke, 1980; Watanabe, 1984). Eiberg *et al.*, (1987), estudiaron 58 árboles genealógicos de las familias danesas con LH c/s PH no sindrómico, sugiriendo un modelo de herencia autosómica dominante. La finalidad del estudio fue detectar la presencia de la vinculación con 42 marcadores polimórficos, obteniendo resultados significativos para tres marcadores: F13A en 6p23 y 2p25 en ACP1 y PGD1 en 1p36.

Estudios en modelos animales, muestran que el gen EDN1, que codifica para la endotelina-1, podría estar involucrado en la etiología del LH c/s PH; en particular

Pezzetti *et al.*, (2000), destacaron la posibilidad de que el gen ECE1 que codifica para una enzima que lleva a cabo la escisión de la endotelina.

2.3.2.- Locus OFC2 (2p13).

El gen TGF β , que codifica para la región alfa del factor de crecimiento transformador, fue el primero en asociarse con LH c/s PH (Ardinger, 1989). Adicionalmente, otros trabajos que verificaron esta asociación, presentan resultados positivos en diferentes poblaciones (Chenevix-Trench, 1992); sin embargo, estos hallazgos no fueron confirmados en estudios posteriores (Hecht, 1991).

Recientemente, se informaron resultados negativos en un estudio realizado por Marazita (2002), quien verificó una posible asociación entre los marcadores para el gen TGF β con LH c/s PH en las poblaciones caucásicas y china.

En un estudio (Warrington, 2006) se observó una asociación significativa para las variantes raras en PVR y PVRL2 genes en las poblaciones de América del Sur y Texas. Sin embargo, tras la secuenciación del gen, no se definió la contribución real a las variaciones individuales en la manifestación del LH c/s PH.

Beiraghi (1994) investigó las regiones cromosómicas 4q25 y 4q13.3 en una muestra de estudio que consta de cinco familias multigeneracionales con una alta incidencia de LH c/s PH, evidenciando resultados positivos para los marcadores D4S192 y D4S175. La susceptibilidad del locus en el cromosoma 4q25 región 4q31.3 fue confirmada por un estudio posterior realizado por Mitchell *et al.*, (1995). Otro estudio demostró la vinculación entre el labio y paladar hendido y el marcador D4S1629, localizado en el brazo corto del cromosoma 4, en la población china (Marazita, 2002).

2.3.3.- OFC5 (*gen MSX1*)

La función del gen MSX1 en el desarrollo craneofacial a través de estudios en modelos con ratones y humanos, sugieren que mutaciones en el gen MSX1 son las responsables de la expresión de las características fenotípicas, tales como defectos en el desarrollo de los huesos nasales, frontal y parietal, y agenesia labiopalatina (Satoko y Maas, 1994). Los estudios de asociación y vinculación confirman así el papel de MSX1 en la etiología de LH c/s PH en diferentes poblaciones. Un estudio realizado por Blanco (2001) indica resultados positivos obtenidos con un estudio caso-control en la población chilena.

2.3.4.- OFC6 (*gen IRF6*).

El gen IRF6 en la región cromosómica 1q32 pertenece a una familia de nueve factores de transcripción que regulan la expresión de interferón alfa y beta después de la infección viral (Kondo, 2002). Las mutaciones en el gen IRF6 son la causa de la aparición del síndrome de Van der Woude, que presenta labio hendido autosómico dominante y/o fístulas del labio inferior y el paladar (Murray, 1990). La contribución de la etiología genética IRF6 de LH c/s PH es conocido para diversas poblaciones (Blanton, 2005). Srichomthong (2005) observó asociación entre el gen y enfermedad para el polimorfismo rs2235371 en la población de Tailandia y Pegelow (2008) en la población sueca. Mientras que el estudio de Jugessur *et al.*, (2008) en la población noruega, menciona la evidencia que las madres homocigotas para el alelo más frecuente en el polimorfismo rs4844880, tienen 1.8 veces más de riesgo de tener hijos afectados por el LH c/s PH.

2.3.5.- *OFC7 (gen PVRL1)*

Suzuki (1998) identificó el gen PVRL1 y confirmó su participación en la etiología del labio y paladar hendido, con herencia autosómica recesiva, promueve el síndrome de displasia ectodérmica del paladar. La manifestación clínica de este síndrome consiste en malformaciones como el labio hendido y/o paladar hendido; sindactilia y otros defectos de las manos; la displasia ectodérmica y, en muchos casos, el retraso mental.

El gen PVRL1 codifica para la nectina, una molécula expresada durante el desarrollo del paladar y en los mecanismos responsables de la formación del mismo. Muchos estudios han demostrado la asociación entre el gen PVRL1 y el labio hendido con o sin paladar hendido no sindrómico, en diferentes poblaciones, tales como Venezuela (Sozen, 2001), las variantes Italianas W185X y R199Q (Scapoli, 2004; Scapoli, 2006) y China (Tongkobpetch, 2008), donde no se encontró asociación entre los polimorfismos de dicho gen y la manifestación de la patología en la población.

2.3.6.- *OFC8 (gen TP73L)*

El gen TP73L codifica para la proteína tumoral p63 (Celli, 1999). Se han demostrado que las mutaciones en el gen TP73L condicionan la aparición de síndromes que presentan fisura facial (Ilanakiev, 2000). Van Bokhoven (2002), ha examinado las mutaciones en el gen p63 que causan el desarrollo de estos síndromes y establece una correlación con el genotipo.

2.3.7.- *OFC9 (locus 13q33.1-q34)*

La asociación entre la región cromosómica 13q33.1-q34 y labio y paladar hendido ha sido demostrada por un estudio de Radhakrisna (2006), sobre una muestra que consta

de dos familias indias multigeneracionales. Además, se demostró que el labio y paladar hendido es muy común en los pacientes con trisomía del cromosoma 13 (Berge, 2001).

2.3.8.- OFC10 (gen SUMO1)

La expresión del gen SUMO1 en el labio superior, el paladar y el borde medial del epitelio del paladar primario al secundario, en el estadio 13.5 en desarrollo embrionario de ratones, además de otros estudios en modelos animales han confirmado el papel de SUMO1 y malformaciones craneofaciales (Alkuraya, 2006).

2.3.9.-RAR α (locus 17q21.1)

Los experimentos en modelos animales, indican que el ácido retinoico modula el desarrollo de la cabeza y que su receptor es importante en la palatogénesis (Studer, 1994). Chenevix-Trench (1992) ha confirmado que los genes TGF β y RAR α no actúan de forma sinérgica en la determinación de labio y paladar hendido, pero una posible mutación en ambos genes parece predisponer a la hendidura en el 50% de los casos estudiados.

Shaw (1993) muestra, una asociación positiva, mientras que otros estudios han demostrado que es posible descartar por completo una relación entre tres alelos de RAR α y la enfermedad (Vintiner, 1993; Stein, 1995).

2.4.- MTHFR (1p36 locus)

El gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) se localiza en el brazo corto del cromosoma uno; contiene aproximadamente 2,2 Kilobases (Kb) y codifica para una proteína (la 5-10-metilentetrahidrofolato reductasa; 5-10MTHFR) de 77 Kilodaltones

(kDa; Nitsche, 2003). Se ha demostrado que la mutación 677C>T en el gen influye para que la enzima MTHFR sea termolábil, con actividad reducida asociada con altos niveles de homocisteína en plasma (Kluijtmans, 1998).

Goyette *et al.*, en 1994 aislaron el DNA del gen MTHFR (localizado en el cromosoma uno, 1p36.3; Figura 5), e identificaron mutaciones que afectan la eficiencia de la enzima (Goyette, 1995). Posteriormente se demostró que dos de esas mutaciones en el gen MTHFR (677C>T y 1298A>C), reducen la actividad de la MTHFR (van der Put, 2001).

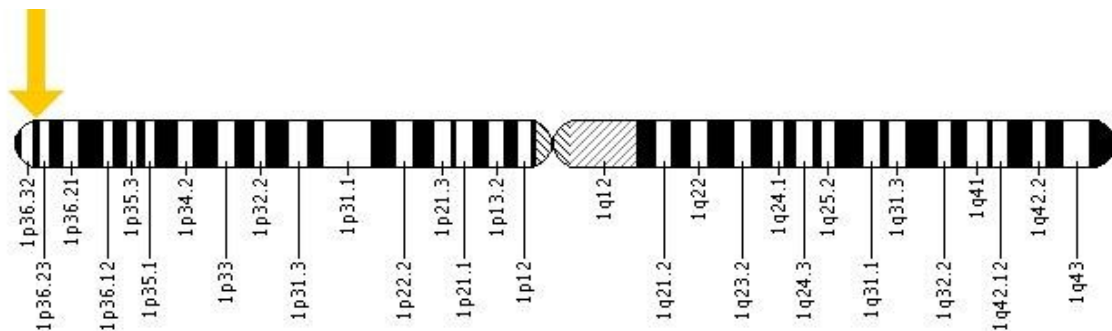


Figura 5.-El gen MTHFR se encuentra entre los pares de bases 11.769.246 a 11.788.568 en el cromosoma uno.

2.4.1.-Variante 677C>T

La variante más estudiada en este sentido es la forma termolábil y deficiente de la enzima que se produce por la sustitución de una citosina (forma silvestre) por una timina (forma mutada). Dicha sustitución ocurre en la posición 677 del gen de la MTHFR y origina un cambio en la secuencia de aminoácidos de una alanina (codón GCC) por una valina (codón GTC; van der Put, 1997).

Los individuos homocigotos CC mantienen la secuencia silvestre en ambos alelos; los denominados heterocigotos (CT) presentan un alelo silvestre y el otro mutado, mientras que los homocigotos TT muestran mutación en ambos alelos del gen; estos cambios producen el polimorfismo Ala225Val (Nitsche, 2003).

La condición de homocigosis 677TT, es la responsable de la disminución de la actividad de la MTHFR y se ha asociado con un incremento en la concentración de Hcy plasmática (van der Put, 1997), la actividad enzimática también está disminuida en los individuos heterocigotos, aunque en mucho menor grado (Guéant-Rodriguez, 2006).

Esta deficiencia de actividad puede disminuir también la concentración de folatos en el plasma y la metilación del DNA genómico, aumentando el riesgo de tener hijos con afecciones como el labio hendido (van der Put, 1997; Botto, 2000; van Rooij, 2002). Martinelli (2001) propone que la mutación 677C>T en el gen MTHFR en las madres, es un factor de susceptibilidad que aumenta el riesgo de desarrollar algún tipo de anomalía, pero en los hijos registra que los resultados no son significativos.

La prevalencia del polimorfismo 677T varía geográficamente en diferentes poblaciones humanas. Se ha encontrado frecuencias para la población italiana (44 a 47%), para hispanos de Atlanta y California (41.1 y 42%), franceses (36%) y japoneses (34%; Guéant-Rodriguez, 2006; Sánchez-Urbina, 2006).

En particular, para la población mexicana se ha reportado una alta prevalencia de la variante T y del genotipo TT en diversos grupos étnicos (Aguirre-Rodríguez, 2008). La

frecuencia alélica de 677T es del 30-60% y cambia en diferentes zonas de México; esto refleja la heterogeneidad étnica de la población, donde el grado de mestizaje es diverso (Baptista, 2005).

Aguirre-Rodríguez *et al.*, (2008) proponen un gradiente geográfico a lo largo de la República Mexicana, inferido a partir de las frecuencias alélicas del polimorfismo 677C>T, dado que la prevalencia más alta ha sido reportada en una población del sureste mexicano y la más baja al noreste del país.

2.4.2.-Variante 1298A>C

El polimorfismo 1298A>C en el gen MTHFR, produce la sustitución de glutamato por alanina en el aminoácido 429 en la enzima, dentro del dominio regulatorio de la MTHFR (van der Put, 1998). Se ha reportado también que la homocigosis del polimorfismo 1298CC (mutado), induce una disminución en la actividad enzimática (Guéant-Rodríguez *et al.*, 2006; van der Put, 1998).

La frecuencia del alelo 1298C también varía geográficamente en diferentes poblaciones humanas; en algunas poblaciones de Canadá (35%), países bajos (33%), europeos que viven en los Estados Unidos (28,8%), Italia (25%), Puerto Rico (23%), y los hispanos de ascendencia mexicana (18,9%; González-Herrera, 2007). Mientras que la frecuencia del alelo 1298C se reporta desde 24% (Blanco-Muñoz, 2007) hasta 14.7% en una población control mexicana y la frecuencia genotípica para el homocigoto CC es de 2.3%, lo cual es una proporción baja, comparada con la reportada en otras poblaciones como la francesa, de 11.5% (Guéant-Rodríguez, 2006).

De acuerdo con algunos estudios, los individuos heterocigotos compuestos para los alelos 677C>T y 1298A>C, los cuales presentan un genotipo 677CT/1298AC (van der Put, 1998), promueven una reducción en la actividad *in vitro* de la MTHFR y un perfil bioquímico similar al observado en individuos con homocigosis para el alelo 677T, con incremento en los niveles de homocisteína y disminución de los niveles de folato (Gutiérrez-Revilla, 2004). De igual manera, otros investigadores sugieren una relación entre la expresión de diferentes polimorfismos en la MTHFR y la manifestación de la patología en individuos con LH c/s PH (Mills, 1999; Brandalize, 2007).

2.5.-SNP y enfermedades multifactoriales

Los polimorfismos genéticos son variantes del genoma que aparecen en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y adquieren una frecuencia en la población tras múltiples generaciones. Muchas enfermedades son determinadas genéticamente debido a variantes que son de baja frecuencia en la población general y en las cuales los portadores de la variante tienen alta probabilidad de manifestar la enfermedad; a esta condición se los conoce como de “alta penetrancia”. En el caso contrario, los polimorfismos de alta frecuencia en la población con baja probabilidad de influir en el riesgo de presentar una enfermedad, se conocen como polimorfismos de “baja penetrancia” (Iniasta, 2005).

La mayor parte de las enfermedades comunes son multifactoriales y están causadas por un número indeterminado de factores ambientales y/o genéticos (Iniasta, 2005). Para las enfermedades complejas, los alelos de riesgo son menos deterministas y éste

se mide de manera más probabilística (Salas, 2007). En los últimos años, la determinación de SNP (*single nucleotide polymorphisms*) ha experimentado un gran desarrollo, por lo que el estudio de polimorfismos genéticos responsables de la susceptibilidad a enfermedades humanas complejas como el caso del LH c/s PH es un campo creciente y de interés en la investigación genómica (Iniesta, 2005).

2.6.-Estudios sobre los polimorfismos de la MTHFR

En los últimos años, varios estudios clínicos y experimentales han demostrado que los suplementos de ácido fólico durante el período periconcepcional pueden prevenir la aparición y recurrencia de malformaciones (Hayes, 1996; Czeizel, 1999). Una razón fundamental es que se ha reconocido que la absorción de ácido fólico solo o en combinación con algunas vitaminas (B6, B12) durante el período periconcepcional, disminuye los niveles de homocisteína en plasma, reduciendo enormemente el riesgo de defectos de labio hendido, de cierre del tubo neural y la aparición de anomalías de los aparatos urinario y cardiovascular (Jacques, 1999; Krapels, 2004).

van Rooij *et al.*, (2003) demostró que existe asociación entre LH c/s PH y la concentración sérica de ácido fólico, la homocisteína y las vitaminas B6 y B12, evidenciando la correlación entre los niveles de las concentraciones plasmáticas de estas moléculas y la probabilidad del desarrollo de mutaciones en genes implicados en la vía metabólica del folato.

Adicionalmente, se ha destacado también el papel que desempeña el metabolismo de la ruta de los folatos. En particular las funciones asociadas a la enzima MTHFR, ya que su mal funcionamiento se asocia con hipometilación del DNA (Chen *et al.*, 2001).

La reacción de metilación de la homocisteína puede ser inhibida por la reducción en la producción de 5-metilentetrahidrofolato, debido a la presencia de variantes alélicas en el gen MTHFR (van der Put *et al.*, 2001). La limitada disponibilidad de la vitamina B12, debido a la absorción o la baja ingesta de la misma en la dieta podría ser un factor limitante para esta reacción. También se ha referenciado que el genotipo de la madre en la MTHFR afecta a la expresión del fenotipo LH c/s PH (Martinelli, 2001; Pezzetti, 2004).

Scapoli (2005) estudió el papel de dos miembros de la familia del receptor de folato (FOLR1, FOLR2), que es un protagonista esencial para el transporte intercelular y el proceso de internalización de folato en las células madre, haciendo que esté disponible para el feto y en dicho estudio se descartó una posible participación de dichos receptores en la etiología de LH c/s PH.

En México, estudios de caso-control identificaron que el papel del ácido fólico es importante para disminuir el riesgo de defectos de tubo neural y LH c/s PH (González-Vargas, 2007; Chávez-Corral, 2008), anomalías que pueden presentar etiologías similares ya que son defectos de la línea media (Czeizel *et al.*, 1999).

Blanco-Muñoz *et al.*, (2007), en un estudio en los estados con alto índice de defectos de tubo neural (Puebla, Estado de México y Guerrero) identifican que las madres de

niños con anencefalia, presentaban la mutación homocigota 677TT en mayor frecuencia con respecto al grupo de mujeres que sirvieron como control. Se concluyó que la presencia del alelo 677T en las mujeres es de riesgo para la presencia de esta malformación.

Dávalos-Rodríguez *et al.*, (2009) en un estudio de casos-controles, identificaron la frecuencia alélica 677T en niños jaliscienses con LH c/s PH (39%), pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al evaluar contra el grupo control (41%), mientras que la frecuencia del genotipo 677CT en el grupo de los casos fue mayor (57%), con respecto de los controles (51%). Sin embargo, la razón de riesgo obtenida fue de 0.99. Concluyen que el genotipo homocigoto TT de los niños mexicanos con LH c/s PH no califica como un factor de riesgo.

En otros estudios, se han reportado datos para alguno o ambos polimorfismos, que sugieren que: a) las variantes 677C>T y 1298A>C y sus haplotipos son factores de riesgo en familias (tríos: padre, madre e hijo; Jugessur, 2003); b) la hiperhomocisteinemia materna (relacionada anteriormente con el funcionamiento de la MTHFR) como un factor de riesgo; c) los polimorfismos 677CT-TT y 1298AC-CC no son independientes en la manifestación de varias patologías, incluyendo el LH c/s PH (Verkleij-Hagoort *et al.*, 2007); y d) los polimorfismos mutados de este gen (MTHFR) pueden asociarse con muchas otras patologías como preclampsia, cáncer, trombofilias, enfermedades cardiovasculares, Alzheimer, entre otras (Castillo-Quan, 2009).

Considerando que los polimorfismos mutados 677C>T y 1298A>C, descritos para el gen de esta enzima reducen su eficiencia y que la población mexicana presenta una de las frecuencias más altas del alelo 677T en el mundo (50%; Mutchinick *et al.*, 1999), es de gran importancia identificar el papel de los polimorfismos en relación con la expresión de enfermedades y otros padecimientos asociados.

3.-JUSTIFICACIÓN:

La prevalencia de los polimorfismos del gen de la MTHFR en el mundo es variable; estudios previos en la población mexicana están encaminados a identificar la asociación entre las variantes 677C>T y 1298A>C con una serie de padecimientos como la presencia de defectos del tubo neural, preclampsia, padecimientos cardiovasculares, cáncer de colon y las fisuras labiopalatinas. Hablando de estas últimas el Labio Hendido con o sin Paladar Hendido ocupa un lugar importante, no solo por la alta frecuencia con que aparecen en la población humana, sino también porque afectan la funcionalidad facial y la vida social del individuo. Dada la complejidad del problema, es fácil comprender la importancia de los estudios genéticos destinados a identificar las causas de la aparición de esta malformación, con el fin de aplicar medidas preventivas eficaces.

La recurrencia de las formas no sindrómicas (LH), pone en evidencia la importancia de los factores genéticos. Pero, los resultados publicados a la fecha muestran datos controversiales. En este contexto, el papel del gen de la MTHFR como responsable de procesos que regulan la biosíntesis de las bases de purina y pirimidina es una variable importante en la expresión de LH c/s PH, además puede hacer sinergia con otros factores de riesgo, tanto biológicos como ambientales; por lo tanto, la elucidación sobre cómo interactúan los componentes genéticos y ambientales en la expresión de esta malformación es fundamental, tanto en la prevención como en el tratamiento de la misma.

La heterogeneidad en la frecuencia poblacional de las variantes alélicas del gen MHTFR en nuestro país y la importancia de estos polimorfismos como factor de riesgo en enfermedades de alta morbilidad y mortalidad en el Estado de Hidalgo son datos desconocidos y/o poco estudiados hasta el momento; por lo tanto, son clave y de gran importancia estudios de genética epidemiológica referente a variantes específicas del gen MTHFR y su posible sinergia con factores ambientales de riesgo relacionados con la manifestación de LH c/s PH.

En el presente trabajo, se espera identificar la relación entre los dos polimorfismos más comunes del gen de la MTHFR y factores de riesgo detectados específicamente (a partir de un cuestionario clínico), en los casos de estudio *versus* un grupo control.

4.-OBJETIVOS:

4.1.-General:

Analizar dos polimorfismos (677C>T y 1298A>C) y posibles factores de riesgo documentados, empleando diseños de casos versus controles y de tríos en una muestra representativa del estado de Hidalgo, para identificar factores de riesgo y la posible asociación entre estos que expliquen la presencia de Labio Hendido con o sin Paladar Hendido.

4.2.-Específicos:

- 1) Estimar la diversidad y estructura genética para ambos polimorfismos seleccionados del gen de la MTHFR, en los grupos de casos y controles, utilizando algoritmos de genética de poblaciones, para verificar las frecuencias y distribución de alelos y genotipos de ambos polimorfismos.
- 2) Describir la asociación entre los polimorfismos encontrados y la manifestación de Labio Hendido con o sin Paladar Hendido en los casos y los controles, aplicando análisis estadísticos.
- 3) Relacionar la frecuencia de los polimorfismos detectados y los posibles factores de riesgo documentados mediante un cuestionario clínico, en casos y en controles, utilizando técnicas de estadística multivariada, para verificar posibles asociaciones específicas de riesgo genotipo-fenotipo.

- 4) Contrastar los valores de riesgo relativo para los polimorfismos de la MTHFR y los factores de riesgo documentados, aplicando algoritmos de genética epidemiológica, como una estrategia que valide configuraciones específicas de riesgo dentro de las familias y con los factores documentados.

5.- HIPÓTESIS:

1. La frecuencia de los polimorfismos difiere entre los casos y los controles y existe un índice de riesgo mayor para los variantes heterocigotos y homocigotos mutados del gen MTHFR, explicando su posible participación en la etiología del LH c/s PH.
2. La frecuencia de las variantes polimórficas, junto con factores específicos de riesgo ambiental, influyen en la incidencia del LH c/s PH.
3. Existen relaciones específicas de herencia, para los polimorfismos mutados del gen MTHFR dentro de los tríos familiares con LH c/s PH, con valores específicos de riesgo de padecer la malformación.

6.-MATERIALES Y MÉTODOS:

6.1- Definición del tamaño de muestra

A partir de un conjunto de 212 pacientes del Hospital del Niño DIF “María Elena Sañudo de Núñez” Hidalgo (censo reportado por la clínica craneofacial, 2010), se realizó un muestreo estratificado de acuerdo a la zona sociodemográfica de procedencia (INEGI) de los pacientes (casos de estudio), con lo que la muestra final resultante fue de 30 pacientes, con un nivel de significancia de 5%, para una variabilidad máxima de 1%.

El tamaño de muestra utilizado se definió de la siguiente manera: $\alpha=0.05$, una variabilidad del uno por ciento y el tamaño de muestra de 30 infantes, dividida en: 10 individuos para la zona 10 (mayor cantidad de casos), 10 individuos para la zona siete (cantidad importante de casos) y 10 para el resto de las zonas que reciben el nombre de *multizona* (como muestra representativa del resto del Estado; Figura 6).

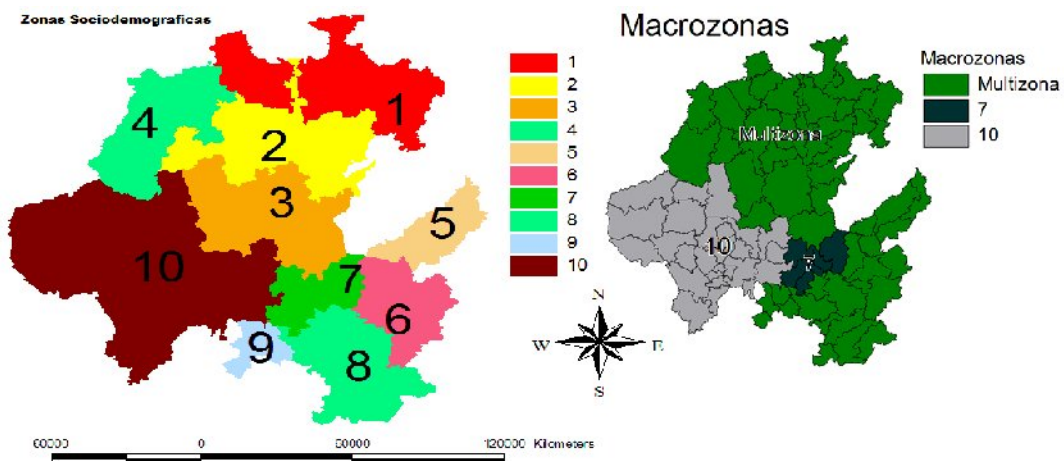


Figura 6.- Izquierda: Zonas sociodemográficas establecidas para el Estado de Hidalgo; derecha: Densidad de muestreo en zonas establecidas para este estudio.

6.2.-Toma de muestras

6.2.1.-Muestras Biológicas

La extracción de sangre se realizó por punción dactilar en una mano (extracción mínimamente invasiva) en las madres, padres e hijos involucrados en el estudio (de tres a cinco gotas de sangre); se realizó de acuerdo al tamaño de muestra definido previamente para cada grupo (N=30) y las muestras se recolectaron en tarjetas forenses (FTA®; Anexo A).

Al grupo de afectados se le definió como *casos*; además se seleccionaron dentro del mismo hospital individuos con características similares de edad y posición socioeconómica, para que fueran el grupo de *controles*. Las muestras de sangre obtenidas se colocaron en las tarjetas FTA® previamente etiquetadas, posteriormente se trasladaron al laboratorio, manteniéndose a temperatura ambiente hasta la extracción de DNA para la genotipificación.

6.2.2.- Datos clínicos

Se utilizó un cuestionario (previamente validado por el especialista en genética clínica del hospital), para recoger una serie de datos sociodemográficos y de factores de riesgo para LH c/s PH, el cual se aplicó a las madres de los pacientes (tanto casos como controles). Dicho instrumento incluyó preguntas sobre la historia reproductiva, características sociodemográficas (edad, nivel de estudios, ocupación), así como factores de referencia para el periodo periconcepcional (tres meses antes y un mes después de la concepción), presencia de enfermedades crónicas, padecimientos agudos durante el embarazo, la presencia de LH c/s PH en los padres, hermanos o familiares, la exposición de los padres a plaguicidas, tóxicos o medicamentos, la existencia de parentesco entre los padres, el nivel

de estudios, la ocupación de la madre y exposición a hipertermia durante el embarazo, la ingesta de ácido fólico durante el embarazo, características del cuidado prenatal, entre otros (Anexo B).

6.2.3.- Genotipificación

Se utilizó DNA genómico, extraído de las muestras de sangre obtenidas de los individuos y padres del grupo denominado casos, así como para los individuos nombrados controles. La extracción se realizó mediante el kit FTA *Purification Reagent*®. El genotipo de cada individuo se analizó con amplificación direccional *in vitro* del DNA (reacción en cadena de la polimerasa o PCR), utilizando los oligonucleótidos cebadores y las mismas condiciones reportadas por Blanco-Muñoz *et al.* (2007) y van der Put (2000; Anexo A, Cuadro III), para los dos polimorfismos más comunes del gen MTHFR (677C>T y 1298A>C).

Posteriormente, se realizaron análisis de restricción con las enzimas *Hinfl* y *MbolI*, en cada muestra de DNA genómico de los individuos, previamente amplificada por PCR. Para el análisis de los polimorfismos 677C>T y 1298A>C se siguieron los métodos descritos por Frosst *et al.*, (1995) y van der Put *et al.*, (1997), respectivamente. El revelado del patrón de polimorfismos se realizó en sistemas electroforéticos sumergidos con geles de agarosa al 3% y amortiguador TBE 1X; los patrones de corrimiento se visualizaron por tinción con bromuro de etidio y transluminación UV₆₆₀ (respecto a la amplificación de DNA), mientras que las reacciones enzimáticas se visualizaron con geles de poliacrilamida al 40% y con el mismo método de tinción.

La discriminación de bandas (y verificación de las variantes mutadas) en los geles es de la siguiente manera: la mutación 677C>T crea un sitio de restricción para la enzima *Hinf I*,

resultando dos fragmentos de 172 y 56 pares de bases (pb), tras la digestión enzimática del fragmento de 228 pb. Las personas con genotipo CC presentan una sola banda de 228 pb, mientras que aquellas con genotipo CT presentan 3 fragmentos de 228, 172 y 56 pb. Por último, las personas con genotipo homocigoto mutado (TT) muestran un patrón formado por dos bandas de 172 y 56 pb.

La presencia de la mutación 1298A>C elimina un sitio de restricción para la enzima *Mbo II*, utilizándose el mismo procedimiento de visualización anteriormente descrito. Un fragmento de 241 pb se obtendrá si el genotipo no mutado (silvestre; 1298AA) está presente. Dos fragmentos, uno de 204 pb y otro de 37 pb se visualizan para el genotipo MTHFR de mutación homocigota (1298CC), mientras que los tres fragmentos antes descritos se obtienen en el caso de los heterocigotos (van der Put, 2000).

6.3.-Análisis Genético

6.3.1.- Equilibrio de Hardy-Weinberg

El Equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) fue evaluado entre grupos para ambos polimorfismos detectados (677C>T y 1298A>C), mediante la prueba de X^2 para la comparación de las distribuciones alélicas y genotípicas. Es importante determinar si un gen específico se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg para validar la neutralidad del mismo. El equilibrio H-W se define cuando en una población las frecuencias alélicas y genotípicas no cambian de una generación a la siguiente. Estas condiciones se cumplen cuando la población presenta:

- a. Panmixia: es decir, que las cruces entre los individuos son totalmente al azar y, por lo tanto, existe en cada generación una mezcla aleatoria de los gametos;

- b. Se compone de individuos pertenecientes a una especie diploide, se reproducen sexualmente y las generaciones no se traslapan; y
- c. Están ausentes los fenómenos de deriva genética, migración, mutación y selección natural.

El cumplimiento de todas estas condiciones es muy difícil, debido a que el apareamiento está influenciado por varios factores, como por ejemplo, la proximidad geográfica o los factores culturales, también hay poblaciones finitas y muchas generaciones superpuestas, como es el caso de la especie humana. Por otra parte, los fenómenos de mutación y la selección son necesarios para asegurar la variabilidad genética de la población y su evolución. Es poco probable entonces, que una población no se vea afectada por la migración, ya que cada individuo que pertenece a una población puede desplazarse dentro de un radio específico (vagilidad), llevando consigo sus genes, excepto cuando existan evidentes obstáculos geográficos (Barrai, 1987).

El equilibrio H-W determina qué frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo, en función de las frecuencias de los alelos que los forman. Antes de realizar un análisis de asociación se debe comprobar si se cumple el principio de H-W en la muestra de controles. En un estudio de asociación es necesario verificar que los SNP's analizados se encuentran en equilibrio H-W, ya que desviaciones de este equilibrio pueden ser indicativas de errores de genotipificación o bien de la existencia de factores que podrían afectar a las frecuencias alélicas (por ejemplo, migración reciente) diferentes del rasgo en estudio. Si no se examina puede dar lugar a asociaciones no fidedignas. La comprobación del H-W se

realiza sobre el grupo control, ya que desviaciones del H-W en casos pueden ser indicativos de una asociación.

6.3.2.- Estructura genética

Se realizaron estimaciones de variación genética, a partir de la información obtenida de los polimorfismos estudiados, obteniendo las correspondientes frecuencias alélicas y genotípicas, calculadas con los programas TFPGA (versión 1.3, 1997) y POPGEN (versión 1.32; 1997)

Se obtuvo un análisis de distancias genéticas utilizando las matrices de distancia de Nei (1978) para determinar la relación genética entre los casos y los grupos de padres, mediante el método de promedios aritméticos no ponderados (UPGMA, por sus siglas en inglés), este método compara el acervo de alelos distintos de un grupo con relación a otro más cercano o próximo, mediante un análisis de diferencias por pares.

La estructura genética de los polimorfismos analizados se obtuvo a partir de la estimación de los estadísticos "F" de Wright (1951), que especifican tres niveles de organización genética dentro y entre poblaciones, descritos a través de los correspondientes estadísticos específicos: F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} .

El estadístico F_{IS} describe el nivel de endogamia o apareamiento entre individuos con relaciones cercanas; los valores para este índice van de -1 a 1, donde los valores aproximados a -1 indicarían niveles importantes de exogamia y los cercanos a 1, endogamia. El F_{IT} se interpreta a su vez como las relaciones genéticas entre cada individuo con el total de poblaciones de la muestra; es decir, se evalúa un balance entre deriva y flujo génico de los individuos dentro y entre poblaciones; este parámetro toma valores entre -1 y

1. Por último, el F_{ST} es la proporción de la desviación del equilibrio contenida dentro de las poblaciones y representa una medida de diferenciación entre ellas; este parámetro toma valores de 0 a 1, en el que los valores cercanos a 0 indican panmixia (nula diferenciación) y 1 la fijación de alelos alternativos (diferenciación total).

6.4.-Estudio de casos-controles y análisis de agregación familiar

El modelo de casos-controles es un diseño empleado en investigaciones clínicas, que tienen por objeto la identificación de factores/índices de riesgo, relativos a la manifestación de alguna patología. La selección de sujetos de estudio se hace en función de la presencia o ausencia del evento de estudio. La relación entre uno o varios factores y la presencia de la enfermedad se estudian comparando la frecuencia de exposición entre los casos y los controles; así, si la frecuencia de exposición es mayor en el grupo de casos que en los controles, se puede decir que hay una asociación entre la causa y el efecto (Lazcano-Ponce, 2001).

Para este estudio, se planteó un modelo de casos *versus* controles, utilizando un tamaño de muestra mínima total de 48 cromosomas (con posible mutación; modelo 2N por individuo), para cada grupo (30 niños casos y 24 niños control), en individuos monitoreados en el Hospital del Niño DIF, de Pachuca, Hidalgo (fórmula para muestreo estratificado en Anexo B).

6.4.1.- Selección de casos (tríos) y controles

Se seleccionaron individuos casos (afectados) con sus respectivos padres y controles (sanos) para determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos 677C>T y 1298A>C, para el gen MTHFR. Los participantes fueron seleccionados en el Servicio de

Genética del Hospital del Niño DIF Hidalgo. Se realizaron controles periódicos entre los participantes del estudio, con una distribución de edades homogéneas entre 2 meses y 10 años. Además, el grupo de casos y el grupo de controles contaron con variables de inclusión o de exclusión para el estudio, tomando en cuenta factores de exclusión, como: el LH c/s PH síndromico, paladar hendido aislado, el no consentimiento de participación en el estudio, padres no nacidos en el Estado de Hidalgo, hasta cuestiones específicas como cuadros clínicos e historial. Se informó a todos los participantes del objetivo del estudio y se pidió consentimiento escrito para la utilización de las muestras biológicas (carta de consentimiento informado; Anexo B). Adicionalmente, el protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital del Niño DIF.

6.5.-Métodos estadísticos

6.5.1.- Estadística descriptiva

Se realizó el cálculo de medidas de tendencia central (variables continuas) y para las variables categóricas se obtuvieron las correspondientes frecuencias y porcentajes, comparando los dos grupos con ayuda de la prueba de X^2 . Se consideraron como valores estadísticamente significativos aquellos que presentaron una $P < 0,05$. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS (versión 12.0).

6.5.1.1.- Prueba de X^2

Una de las aplicaciones de esta prueba estadística es para evaluar las diferencias entre la distribución de los datos para dos muestras diferentes. Este trabajo compara dos grupos de observaciones (grupo de casos, es decir, pacientes con LH c/s PH y el grupo control, de

individuos sanos) y las dos variaciones genéticas de cada polimorfismo estudiado (677C>T y 1298A>C, para el gen MTHFR).

6.5.2.- Estadística inferencial

Con el fin de verificar una posible asociación entre los polimorfismos, el fenotipo LH c/s PH y los datos obtenidos a partir del cuestionario clínico (variables ambientales), se realizó la correspondiente validación estadística.

Se efectuó un análisis de varianza (ANOVA; de un factor) para identificar variables en las que la varianza difiere entre casos y controles, además de otros análisis multivariados para determinar los factores con más peso sobre la manifestación de LH c/s PH en los infantes considerados como casos.

Con la finalidad de verificar cuáles variables son las que separan los grupos; se emplearon dos métodos multivariados (Análisis Discriminante y Análisis de Componentes Principales), los cuales permiten la priorización de datos con una gran cantidad de variables.

6.5.2.1.- Análisis Discriminante

Es un método que se usa principalmente para clasificar unidades experimentales en dos o más, de manera que se pueda realizar una regla discriminante que clasifique las unidades experimentales en una o varias categorías posibles (McCune y Grace, 2002). El principal objetivo de un análisis discriminante es establecer una óptima separación de grupos, basada en una transformación lineal de la variable predictiva, además de utilizar la variable de grupo para clasificar de antemano (variable dependiente) y las variables que se supone diferencian a los grupos, se utilizan como variables independientes.

En este análisis se utilizaron todas las variables que resultaron informativas a partir del ANOVA de un factor, para verificar cual de los caracteres era el más consistente para la discriminación entre grupos. La técnica empleada en este modelo fue la de paso a paso, la cual permite evaluar variable por variable, utilizando los valores propios estandarizados.

6.5.2.2.- Análisis de Componentes Principales

Las variables se combinaron mediante un análisis de componentes principales, para reducir el número de variables y trabajar con aquellas que contribuyan significativamente a la varianza estructurada del grupo de datos analizados. Este procedimiento permitió evaluar la posible asociación de las variables evaluadas con los grupos de estudio definidos y/o parámetros establecidos como factores de riesgo, tanto genéticos como ambientales.

El objetivo principal de este método es reducir la dimensionalidad (número de variables) del conjunto de datos (variables interrelacionadas), para encontrar variables significativas, las cuales son útiles para explicar las agrupaciones de conjunto de datos, resultando que entre más cercanos se encuentren los grupos, más parecidos son entre sí (Feinstein, 1996).

6.5.2.3.- Análisis de Correlaciones

Se utilizó para analizar la relación existente entre las variables y conocer si alguna de éstas influye directamente sobre otra distinta. Debido a que estos métodos se emplean principalmente para conocer las posibles relaciones y significación entre series de datos o cuando, simultáneamente, se usan dos variables continuas, o variables discretas cuantitativas. Este estadístico se representa mediante el coeficiente de correlación (r) de Pearson, que está definido en un intervalo entre cero y uno, el cual corresponde a la

cantidad de información compartida por dos características o variables de los datos de la muestra (Johnson, 2000).

6.5.3.- Asociación de variables con Malformación

Se realizó un análisis del grado de riesgo de variables obtenidas del cuestionario, los genotipos y las frecuencias alélicas respecto a la manifestación de LH c/s PH; la medida más utilizada para cuantificar la asociación entre la exposición y la presencia de enfermedad es la Razón de Momios (*odds ratio* "OR", en inglés), la cual se estima mediante el cociente de la probabilidad de exposición entre los casos y la probabilidad de exposición entre los controles, calculando intervalos de confianza de 95%.

La interpretación de OR es: si es igual a uno, la exposición no se asocia con la enfermedad, si es menor a uno, la exposición disminuye la probabilidad de desarrollar la enfermedad y si el valor es mayor a uno, la exposición aumenta las posibilidades de desarrollar la enfermedad; en cualquiera de los casos las estimaciones de OR se deben realizar con su 95% de intervalo de confianza respectivo, para confirmar o rechazar la asociación de la exposición con la enfermedad.

La variable principal del estudio fue la expresión de los dos polimorfismos estudiados para la MTHFR (677C>T y 1298 A>C); los que a su vez se correlacionaron con los parámetros identificados como factores de riesgo, mediante técnicas de estadística multivariada.

6.5.4.- Análisis simultáneo de los polimorfismos de la MTHFR

Con frecuencia son varios los polimorfismos que se analizan simultáneamente en un gen, porque el polimorfismo realmente responsable de influir o modificar el riesgo de la

enfermedad puede ser desconocido. Se analizan entonces diferentes polimorfismos para verificar su posible influencia (incluso sinérgica) en la manifestación de dicha enfermedad. Entre diferentes polimorfismos localizados en el mismo cromosoma, suele observarse cierto grado de asociación estadística denominada *desequilibrio del ligamiento*.

El desequilibrio de ligamiento también puede definirse en términos cuantitativos, como la correlación estadística observable entre diferentes polimorfismos cercanos situados en el mismo cromosoma; esta asociación tiene su origen en la meiosis. Al final del proceso habrá dos gametos, cada uno con una copia de cada par de cromosomas. Estos cromosomas no son idénticos a los cromosomas de los progenitores debido a la recombinación (fragmentos de copias diferentes cromosomas se intercambian durante la meiosis). De esta manera, los cromosomas heredados por la descendencia serán una combinación del legado genético entre la madre y el padre. La frecuencia de entrecruzamientos por cromosoma es pequeña, la probabilidad de que entre dos loci cercanos se dé una recombinación es baja y por ello se observa el desequilibrio del ligamiento, que tiende a disminuir en sucesivas generaciones hasta llegar al equilibrio (independencia estadística, Iniesta, 2005).

Aún así, la probabilidad de tener una recombinación entre loci cercanos es muy baja, pues por lo general estas regiones cromosómicas se transmiten en bloque y los polimorfismos asociados con la enfermedad también, por lo que analizar los conjuntos de loci podría ser útil para evaluar el polimorfismo causal.

Para determinar el desequilibrio de ligamiento en los dos polimorfismos estudiados se calcula el estadístico D, que es la desviación entre la frecuencia de haplotipos esperada (en el supuesto de no asociación) y la frecuencia observada. Así, sean P_1 y P_2 las

probabilidades de dos alelos, donde P_{12} representa la probabilidad observada de la pareja.

Entonces:

$$D = P_{12} - P_1 P_2$$

También se calculó el estadístico D' que es equivalente a D a escala en un intervalo $[-1,1]$ y el coeficiente de correlación entre los alelos evaluados.

6.5.5.- Identificación de los haplotipos de riesgo

El desequilibrio del ligamiento permite localizar polimorfismos relacionados con la enfermedad. Si aparece una mutación que genera un polimorfismo que se supone responsable de la misma, es posible que otros polimorfismos cercanos estén asociados con aquella igual. Tomando en cuenta que lo que se transmite de padres a hijos son los cromosomas, se puede identificar el conjunto de variantes que se transmiten en cada cromosoma, de forma que sea fácil la identificación de la variante causal. Al conjunto de variantes que se transmiten conjuntamente para una vía paterna específica, se le denomina 'haplotipo' (Iniesta, 2005).

6.5.5.1.- Análisis de haplotipos

Algunas personas tienen haplotipos inciertos debido a la falta de información cromosómica. Por lo tanto, el conteo de los haplotipos de la muestra no es sencillo y los valores perdidos en los datos incrementan la incertidumbre.

Hay muchos métodos diferentes para calcular la frecuencia de haplotipos. Uno de los más utilizados es el método iterativo de dos etapas, denominado algoritmo EM (algoritmo de esperanza-maximización).

Posterior al análisis descriptivo de los haplotipos, se realizó un análisis de asociación entre los haplotipos y la presencia de la malformación, tanto para los casos, los padres y las madres; además del total (los tres grupos mencionados).

6.5.5.2.- Red de Haplotipos

A partir de la información genética obtenida se generó una red de haplotipos, utilizando el programa TCS (Versión 1.21, 2005), a partir de la matriz de distancias genéticas euclidianas calculadas con el programa Arlequin (Versión 3.01, 2006), para los haplotipos distintos encontrados en las diferentes familias participantes en el estudio.

6.5.6.- Asociación con la manifestación de LH c/s PH

Se realizó un análisis de Razón de Momios para verificar el nivel de riesgo de padecer LH c/s PH y se estima mediante el cociente de la probabilidad de exposición entre los casos y la probabilidad de exposición entre los controles, calculando intervalos de confianza al 95%.

La interpretación de OR es: si es igual a uno, la presencia del haplotipo no se asocia con la enfermedad, si es menor a uno, la presencia del haplotipo disminuye la probabilidad de presentar la enfermedad y si el valor es mayor a uno, la presencia del haplotipo aumenta las posibilidades de desarrollar aquélla; en cualquiera de los casos las estimaciones de OR se deben realizar con su 95% de intervalo de confianza respectivo, para confirmar o rechazar la asociación del haplotipo con el padecimiento.

6.5.7.-Estudio de Herencia

Se realizó también un estudio de herencia familiar, utilizando los 30 tríos formados por el paciente (caso), padre y madre respectivos, para verificar la herencia de los polimorfismos asociados al daño genético. Se realizó con base en la técnica reportada por Falconer

(1964), que utiliza la prueba de regresión media de la progenie sobre un progenitor y se obtiene dividiendo la covarianza media de la progenie-progenitor por la varianza de los progenitores, para inferir la heredabilidad en sentido estricto, además de calcular valores de penetrancia según el método de Kaplan-Meier con el programa MetCalc (Versión 12, 1993).

6.6.- Test de Desequilibrio de Transmisión

Con el método descrito por Spielman *et al.* (1993), a través de la prueba conocida como Test de Desequilibrio de Transmisión (TDT, por sus siglas en inglés de: "*Transmission disequilibrium test*") se evaluó la transmisión de alelos desde los padres heterocigotos hacia los hijos enfermos; dicha transmisión se aporta en un valor esperado (probabilidad de transmisión=50%). Si el gen no está asociado con la enfermedad, existe la misma probabilidad de transmisión. Por el contrario, si el alelo está asociado con un mayor riesgo de enfermar, entonces será encontrado más frecuentemente en los hijos enfermos y con una probabilidad de transmisión aparente superior a 50% (Schaid, 1999; Martin, 2005). En un conjunto de tríos caso-padres, el estadístico TDT se calcula de la siguiente forma:

$$TDT = (b - c) / (b + c).$$

7.-RESULTADOS:

7.1.- Análisis de variabilidad y estructura genética de los polimorfismos

7.1.1.- Equilibrio de Hardy-Weinberg

Las muestras referentes al grupo de los controles se ajustan a la distribución teórica del equilibrio de Hardy-Weinberg (Cuadro 1). Para el polimorfismo 677C>T, se determinó un valor de X^2 de 0.19, con una p de 0.93 y para el polimorfismo 1298A>C el valor de X^2 es de 0.43, $p=0.80$. Esto verifica que ambos loci están en equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) y se validan los polimorfismos de este grupo como control comparativo con respecto del grupo de casos.

Cuadro 1.- Prueba de X^2 para ambos polimorfismos en el grupo de los casos, donde se muestran la comparación de las frecuencias esperadas con las observadas.

	677C>T		1298A>C	
	Esperados	Observados	Esperados	Observados
Homocigoto silvestre	CC 0.303	0.292	AA 0.593	0.583
Heterocigoto	CT 0.484	0.5	AC 0.354	0.375
Homocigoto mutado	TT 0.194	0.208	CC 0.053	0.042
Valores de X^2	0.19, $p=0.93$		0.43, $p=0.80$	

7.1.2.- Estructura genética

La matriz de distancias de Nei (1978) muestra las diferencias genéticas existentes entre pares de grupos de estudio, donde el grupo casos y las madres presentan la menor distancia genética y los valores más altos de identidad genética (Cuadro 2).

Cuadro 2.-Comparación de distancias genéticas de Nei (1978). La identidad genética se encuentra sobre la diagonal y las distancias genéticas se encuentran por debajo de la diagonal.

Grupo de estudio	Casos	Padres	Madres
Casos	*****	0.9395	0.9779
Padres	0.0624	*****	0.9614
Madres	0.0224	0.0394	*****

Se obtuvieron las distancias entre los casos, padres y madres con ayuda del programa TFPGA (versión 1.3) para identificar la relación entre entidades genéticas, mostrando que los casos se encuentran más relacionados al grupo de las madres por tener la menor distancia genética (Figura 7). Estos resultados sugieren una homología genética significativa en la línea materna de transmisión filial de los polimorfismos, para el gen MTHFR.

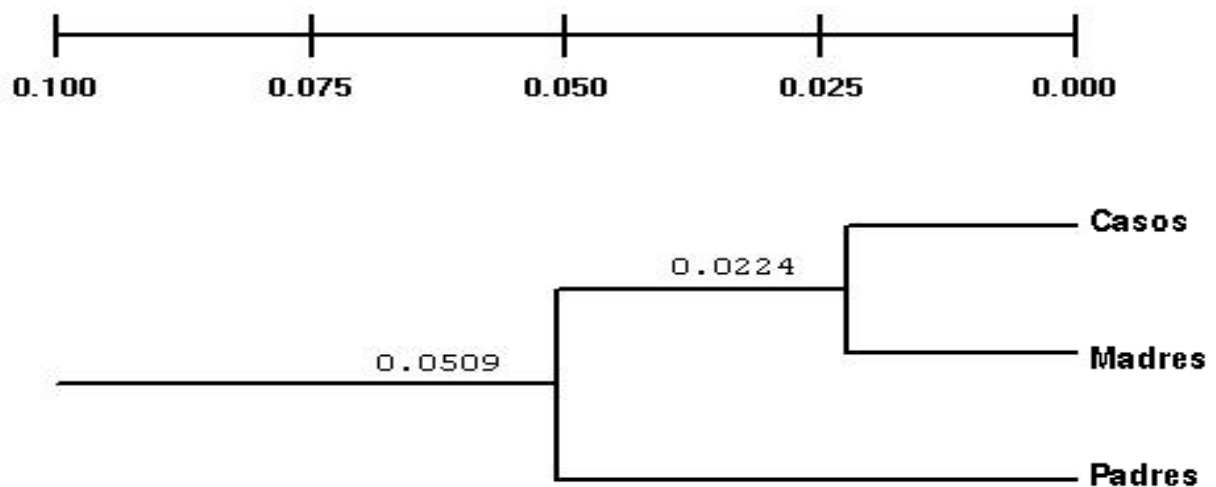


Figura 7.- Dendrograma por el método de UPGMA (método de pares de grupos sin peso a partir de la media aritmética) de Casos, Padres y Madres, usando las distancias genéticas de Nei (1978) sin peso, con 1000 repeticiones.

7.1.3.- Estadísticos *F* de Wright

La estructura genética de los grupos analizados no está determinada por alguna relación particular de heterocigosidad, descrita por los valores para los estadísticos *F*, aunque para familias se encuentran cálculos más consistentes (Cuadro 3). La variabilidad aportada a nivel de individuo es mínima, con los valores más bajos en el polimorfismo 1298 A>C en el grupo de las familias; la variabilidad es baja, aportada a nivel de grupos de estudio principalmente (valores de F_{ST}).

Cuadro 3.- Estadísticos F de Wright para el grupo de familias de casos.

Grupo	Familias	
	677C>T	1298A>C
Tamaño de muestra	180	180
F _{IS}	-0.0852	0.0009
F _{IT}	-0.0672	0.015
F _{ST}	0.0166	0.0141

7.1.4.- Frecuencias Genotípicas y Alélicas

Para el análisis de casos y controles, las frecuencias más altas fueron para el heterocigoto del polimorfismo 677C>T (56.7% para casos y 50% para controles) y en el homocigoto silvestre, para el polimorfismo 1298A>T (53.3% y 58.3% respectivamente, para casos y controles), mientras que la frecuencia alélica en el polimorfismo 677T en los casos fue alta (0.52%) y en los controles el alelo 677C se presentó con una frecuencia mayor (0.55%); respecto al polimorfismo 1298A>C, el alelo 1298A (0.75 casos y 0.76 controles) presentó los valores más altos para ambos grupos.

Para el estudio de casos, padres y madres, las frecuencias de los padres respecto al número de heterocigotos presentan las frecuencias más altas (56.7% padres, 46.7% madres), pero para el polimorfismo 1298A>C en los padres el heterocigoto presenta la frecuencia mayor (43.3%) y las madres presentan la frecuencia más alta en el homocigoto silvestre (50%); los alelos 677T y 1298A presentaron los valores de frecuencia más altos en padres (0.55 y 0.61 respectivamente) y en el grupo de las madres, los valores más altos se presentaron en los alelos 677C y 1298A (0.6 y 0.7 respectivamente; Cuadro 4). Esto sugiere una distribución diferencial de alelos y genotipos dentro de las familias de los casos, que podría influir también en la frecuencia de manifestación de la enfermedad en las siguientes

generaciones, así como combinaciones particulares de genotipos de riesgo, que se manifiesten con mayor frecuencia en los individuos afectados.

Cuadro 4.- Distribuciones genotípicas y alélicas de las variantes MTHFR en los grupos de estudio.

	677C>T			1298A>C			Frecuencias alélicas			
	CC	CT	TT	AA	AC	CC	677C	677 T	1298A	1298C
Casos y controles	24.1	53.7	22.2	55.6	40.7	3.7	<u>0.51</u>	0.48	<u>0.76</u>	0.24
Casos	20.0	56.7	23.3	53.3	43.3	3.3	0.48	<u>0.52</u>	<u>0.75</u>	0.25
Controles	29.2	<u>50.0</u>	20.8	<u>58.3</u>	37.5	4.2	<u>0.55</u>	0.44	<u>0.77</u>	0.23
Casos, padres y madres	24.4	<u>53.3</u>	22.2	<u>47.8</u>	42.2	10.0	<u>0.51</u>	0.48	<u>0.68</u>	0.31
Padres	16.7	<u>56.7</u>	26.7	40.0	<u>43.3</u>	16.7	0.45	<u>0.55</u>	<u>0.61</u>	0.38
Madres	36.7	<u>46.7</u>	16.7	<u>50.0</u>	40.0	10.0	<u>0.6</u>	0.4	<u>0.7</u>	0.3

7.2 Análisis estadístico para casos y controles

7.2.1.- Estadística descriptiva para el grupo de casos

De un total de 30 menores afectados, el 56.7% son varones y el 43.3% son mujeres, mientras que el grupo control estuvo conformado por un 37.5% de varones y 62.5% de mujeres (Anexo B).

Los tipos de fisura para todos los casos se distribuyeron en 5 grupos. La más frecuente fue la fisura del labio y paladar hendido unilateral izquierdo y la menos frecuente fue el labio y paladar hendido bilateral (Figura 8).

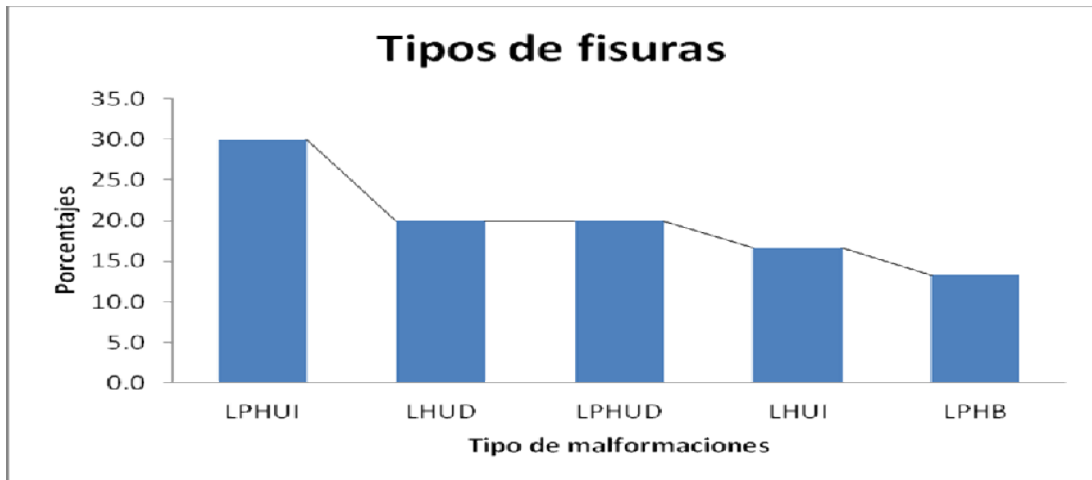


Figura 8.- Tipos de fisuras presentes en los niños pertenecientes al grupo de casos. LPHUI=labio y paladar hendido izquierdo, LHUD=Labio hendido derecho, LPHUD=labio y paladar hendido derecho, LHI=Labio hendido izquierdo y LPHB=labio y paladar hendido.

Las malformaciones por zona presentaron configuraciones diferentes; las más comunes para la zona siete fueron el labio y paladar hendido unilateral izquierdo (40%), seguidas del labio y paladar hendido unilateral derecho (30%), con respecto a la zona 10, las más frecuentes fueron el labio y paladar hendido unilateral izquierdo y el labio y paladar hendido bilateral (30% para ambas malformaciones), mientras que para la multizona el labio hendido unilateral izquierdo y labio hendido unilateral derecho presentaron los mismos valores (30%), siendo éstas las más comunes en la zona. (Figura 9A).

No obstante lo anterior, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las distribuciones de las malformaciones por zona estudiada ($X^2=8.96$ $p=0.34$). Respecto a las malformaciones y su distribución entre las zonas, en la zona siete se encontró 50% del total de labio y paladar hendido unilateral derecho de todo el estudio, mientras que en la zona 10 se presentaron el 75% del total de casos con labio y paladar hendido bilateral y en la multizona se presentó el 60% de todos los casos de labio y paladar hendido unilateral izquierdo (Figura 9B). Estos datos sugieren que, si bien no son diferencias significativas, si

existen tendencias particulares para la presencia de tipos específicos de malformaciones en cada una de las zonas analizadas.

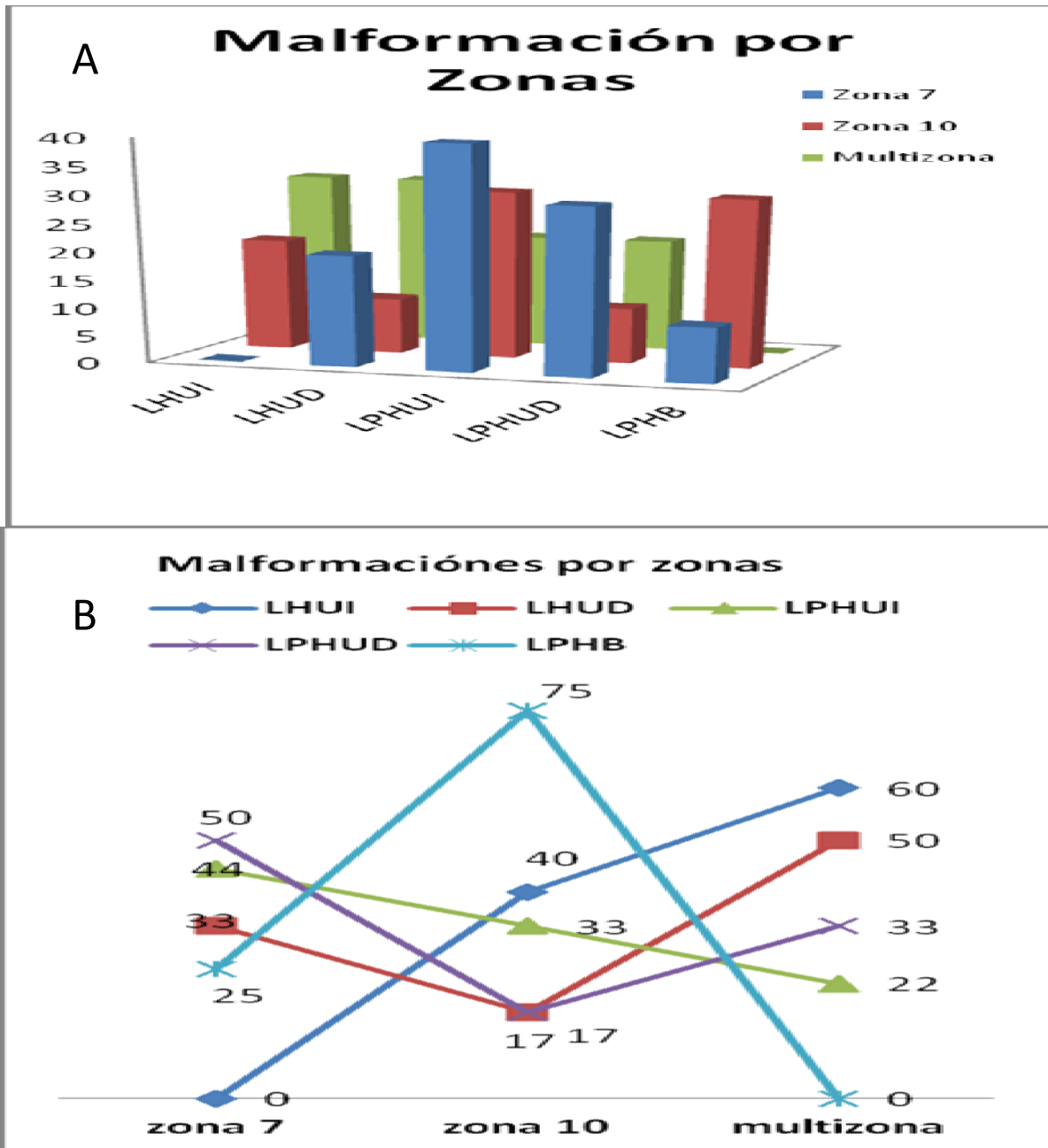


Figura 9.- A) Distribución en cada zona de las malformaciones identificadas en el estudio. B) Distribución de cada malformación de forma porcentual por cada una de las zonas. LHUI: labio hendido unilateral izquierdo; LHUD labio hendido unilateral derecho; LPHUI: labio y paladar hendido unilateral izquierdo; LPHUI: labio hendido unilateral izquierdo; LPHUD: labio hendido unilateral derecho; LPHB: labio y paladar hendido bilateral.

La distribución de las fisuras respecto del sexo muestra los mayores porcentajes de aparición para el LPHUI (29.4%), seguido de LHUD (23.5%), mientras que para las mujeres los valores más altos fueron para el LPHUI y LPHUD (30.8% para ambos; Figura 10).

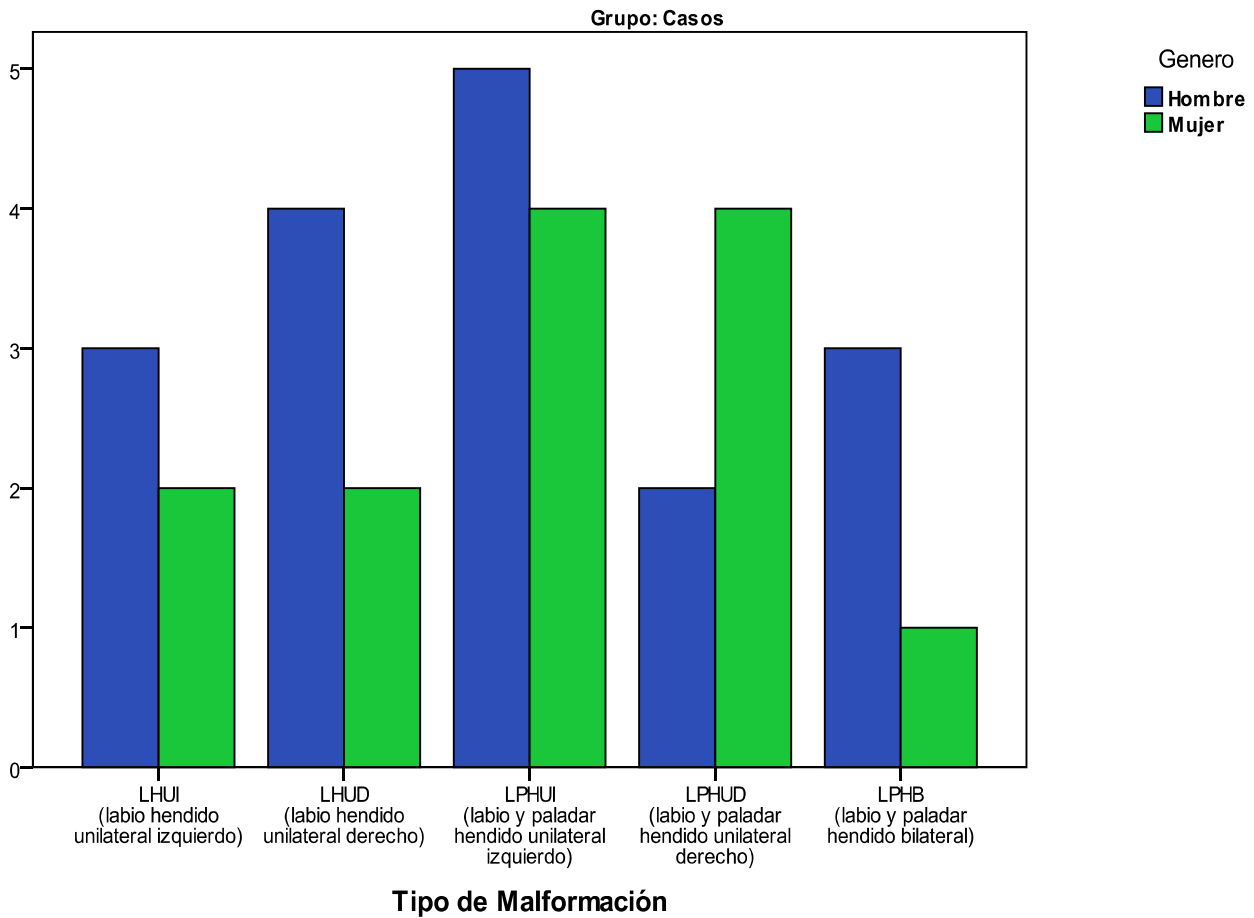


Figura 10.- Distribución de malformaciones por sexo en el grupo de casos.

Considerando el tipo de fisura según el género, el total de los pacientes con labio hendido unilateral izquierdo están conformados por un 60% de hombres y un 40% de mujeres; respecto a los pacientes con labio hendido unilateral derecho, el 66.7% estuvo conformado por mujeres y el 33.3% por hombres, mientras que para el labio y paladar hendido unilateral izquierdo los valores son parecidos, con un 55.6% para los hombres y 44.4 para las

mujeres; respecto al labio y paladar hendido derecho las mujeres presentan el 66.7% y los hombres el 33.3%; en el caso del labio y paladar hendido bilateral, los hombres presentan el 48.1% y las mujeres el 52.9% (Figura 11).

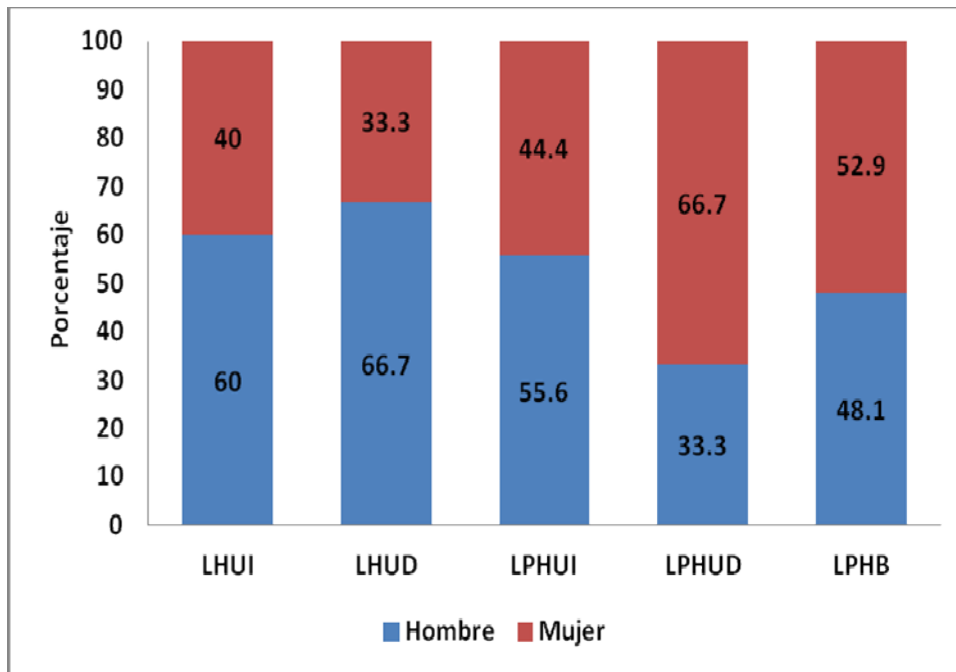


Figura 11.-Distribución de sexos en porcentaje para cada una de las malformaciones reportadas en el estudio. LHUI: labio hendido unilateral izquierdo; LHUD labio hendido unilateral derecho; LPHUI: labio y paladar hendido unilateral izquierdo; LPHUI: labio hendido unilateral izquierdo; LPHUD: labio hendido unilateral derecho; LPHB: labio y paladar hendido bilateral.

Respecto a los antecedentes familiares, para el grupo de los casos se reporta un 37.9% como positivo, del cual el 72.2% tiene un familiar afectado y el 27.3% manifiesta más de dos familiares con la afección; de los casos con antecedentes familiares, el 72.7% están relacionados a la rama materna y el 27.3% a la rama paterna; respecto al sexo del familiar afectado, el 54.5% fue diferente al del caso, además de que 54.5% del grupo de casos con antecedentes familiares, reportaron un parentesco de tercer grado y 18.2% de segundo grado (Figura 12). Estos resultados corroboran la influencia familiar en la presencia de la

malformación, para datos como: familiares afectados, mayor probabilidad de presencia en rama materna y el grado de parentesco del individuo afectado con otros casos dentro de las familias analizadas.

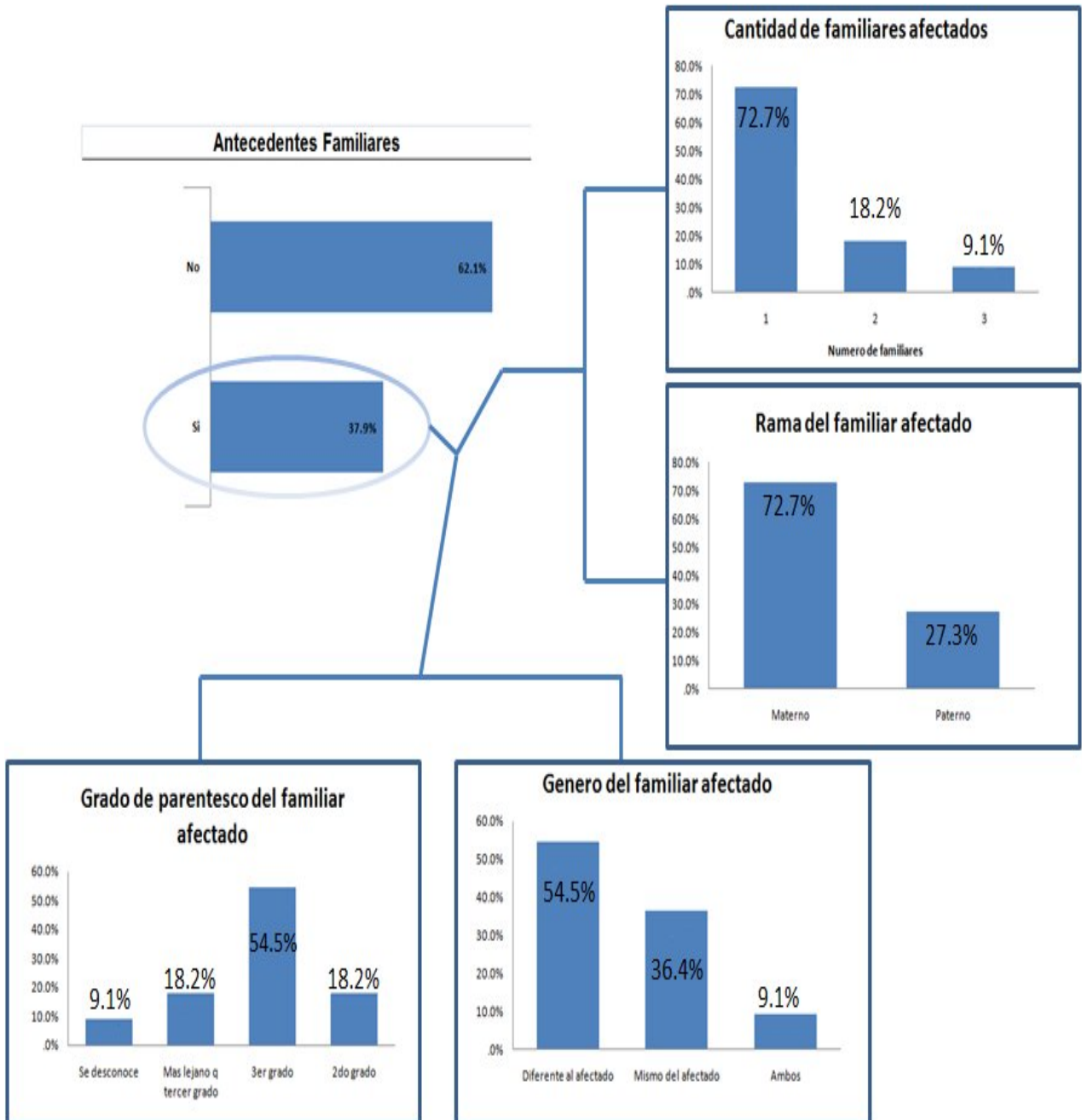


Figura 12.- Grados de parentesco, reportados por los individuos con historial familiar positivo.

El número de gestas de los casos no difiere estadísticamente respecto de los controles ($X^2=6.08$, $p=0.41$); el porcentaje de gestas en el grupo de los casos se distribuye de la siguiente manera: las madres de los casos que reportaron multiparidad corresponden a un 86.2% del total, para las cuales el 37.9% presentan dos gestas (donde el 18% refieren que en su gesta número uno se presentó la afección, y el 82% restante la presentaron en la segunda gesta); el 34.5% presentan tres gestas (donde el 10% presenta la afección en la primera gesta, el 20% en la segunda gesta y el 70% en la tercera gesta); el 10.3% presentaron cuatro gestas (de los cuales el 100% refieren afección en la cuarta gesta) y el 3.4% presentaron cinco gestas (en los cuales 100% refieren que en la quinta gesta se dio la afección; Figura 13). Estos datos muestran una tendencia clara de manifestación de la afección (en madres multíparas), en la última gesta reportada.

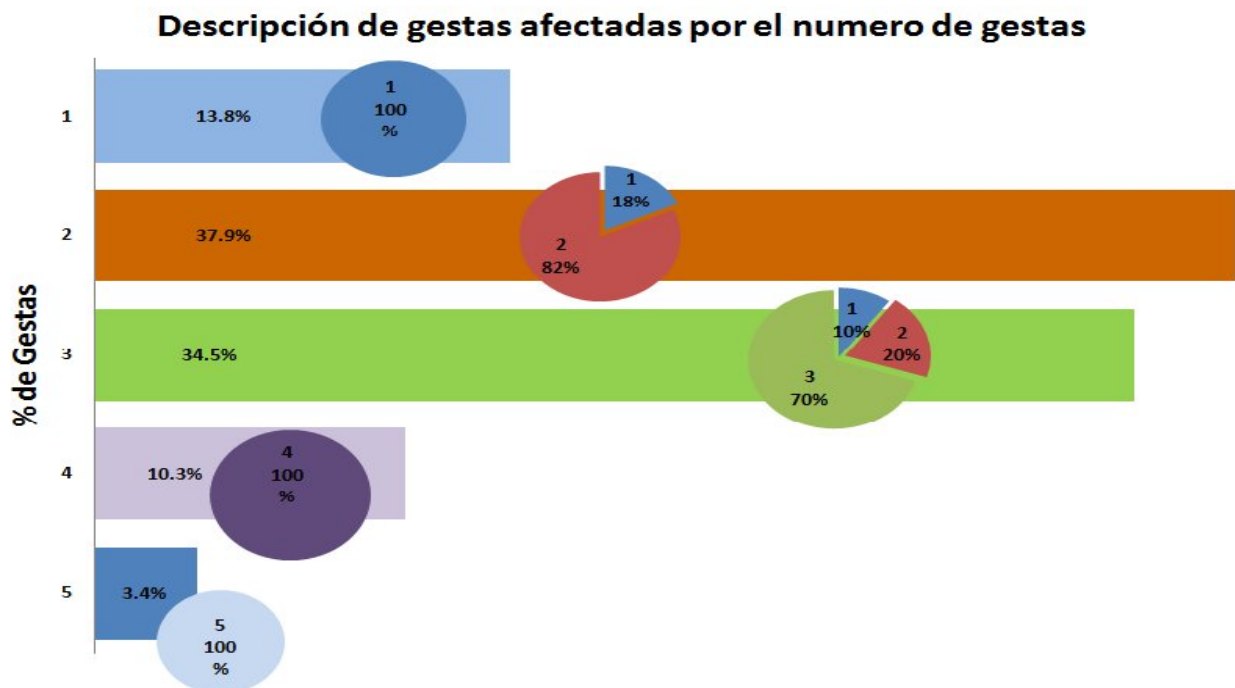


Figura 13.- Porcentajes de número de gestas en el grupo de los casos, dividido a su vez por el número de gesta donde sucede la afección.

En relación a las enfermedades maternas durante el embarazo, para el periodo de los tres meses previos al mismo se encontró una incidencia del 4.1% de manifestación de la malformación, mientras que para el primer trimestre la cifra aumentó a 29.1%; las enfermedades más comunes en este periodo fueron: infecciones de vías urinarias y/o vaginales (63.6%) e infecciones gastrointestinales y respiratorias (18.2%; Anexo B).

Respecto a la edad de las madres participantes en el estudio, la mayor cantidad de participantes (tanto del grupo de casos y el grupo de controles) se encuentran en el intervalo de 21 a 25 años (37.7%), mientras que en la comparación de grupos, el denominado casos presentó la mayor cantidad en el intervalo de 21 a 25 años (34.48%), seguido del intervalo de 26 a 30 años (27.59%) y para el grupo controles los intervalos más altos fueron el de 21 a 25 años (con 41.67%) y los intervalos de 26 a 40 años ambos presentan una proporción de 16.67% (Figura 14A). Al comparar ambos grupos no se identificaron diferencias estadísticas significativas.

Para la edad de los padres en general, el intervalo con mayor proporción fue el de 26 a 30 años (28.3%) seguido del intervalo de 31 a 35 años (26.4%). Respecto a la comparación entre grupos, el llamado casos tiene la mayor proporción (31%) en el intervalo de 31 a 35 años, seguido por el intervalo de 21 a 25 años (27.59%), mientras que el grupo de controles tiene su mayor proporción (37.5%, Figura 14B) en el intervalo de 26 a 30 años. Cuando se compararon los dos grupos no existió diferencia estadísticamente significativa.

Con base en lo anterior, no se pueden considerar como informativas las variables de edad de ambos padres y presencia de enfermedades maternas previas al embarazo. Sin embargo, el porcentaje reportado para enfermedades durante el primer trimestre, sugiere

que éstas serían un factor (tal vez indirecto), para el favorecimiento de la presencia de la malformación.

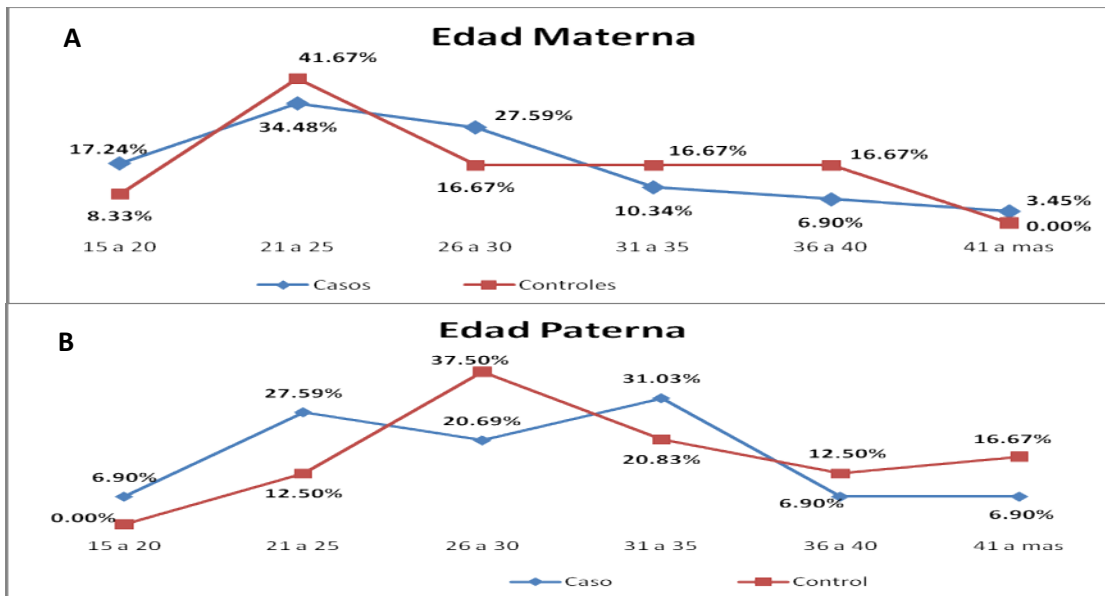


Figura 14.- Distribución de edades maternas (A) y paternas (B), por intervalos.

7.2.2.-Estadística inferencial

7.2.2.1.- Análisis de varianza

El análisis de varianza de un factor sirve para comparar varios grupos en una variable cuantitativa. A la variable categórica (nominal u ordinal) que define los grupos que se van a comparar se le llama variable independiente o factor, mientras que a la variable dependiente es la que se comparará entre grupos.

En este trabajo se quiere averiguar cuál de las variables dependientes son diferentes entre casos y controles. El ANOVA de un factor permite obtener información sobre el resultado de esa comparación. Es decir permitió evaluar si la varianza de los grupos es distinta entre los grupos de datos analizados.

Prueba de homogeneidad de varianza

El estadístico de *Levene*, permitió contrastar la hipótesis de que las varianzas entre los grupos son iguales, en el cuadro cinco se muestran las variables que tienen un valor de p menor o igual a 0.05, lo que induce a rechazar la hipótesis de igualdad de varianza y definir que los grupos definidos no son iguales en sus varianzas para las variables referidas en el Cuadro 5.

Cuadro 5.- Tabla resumen del procedimiento ANOVA de un factor y Prueba de *Levene* sobre homogeneidad de varianza. Donde AF: Antecedentes familiares; EM; Edad materna; EP: Edad Paterna; NG: Numero de gestas; CP: Control prenatal; RAAF: Reacción adversa al ácido fólico; ExpT: Exposición a Teratógenos; E1Trim: Enfermedades durante primer trimestre; TraE1Trim: Tratamiento de enfermedad durante primer trimestre; EscM: Escolaridad materna; OcuM3ant: Ocupación materna tres meses antes del embarazo; OcuM3emb: ocupación materna durante los primeros tres meses de embarazo; OcuP3emb: Ocupación paterna durante los primeros tres meses de embarazo.

Tabla Parte 1

ANOVA							Prueba de homogeneidad de varianzas			
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
AF	Inter-grupos	1.889	1	1.889	14.113	0	373.28	1	51	0
	Intra-grupos	6.828	51	0.134						
	Total	8.717	52							
EM	Inter-grupos	0.618	1	0.618	2.797	0.101	7.777	1	51	0.007
	Intra-grupos	11.269	51	0.221						
	Total	11.887	52							
EP	Inter-grupos	10.454	1	10.454	1.082	0.303	3.759	1	51	0.058
	Intra-grupos	492.866	51	9.664						
	Total	503.321	52							
NG	Inter-grupos	0.152	1	0.152	0.604	0.44	1.747	1	51	0.192
	Intra-grupos	12.866	51	0.252						
	Total	13.019	52							
Control prenatal	Inter-grupos	0.031	1	0.031	0.571	0.453	2.358	1	51	0.131
	Intra-grupos	2.799	51	0.055						
	Total	2.83	52							

Tabla Parte 2

ANOVA							Prueba de homogeneidad de varianzas			
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
RAAF	Inter-grupos	0.161	1	0.161			0.141	1	51	0.709
	Intra-grupos	6.82	51	0.134	1.202	0.278				
	Total	6.981	52							
ExpT	Inter-grupos	0.062	1	0.062			7.981	1	51	0.007
	Intra-grupos	1.862	51	0.037	1.711	0.197				
	Total	1.925	52							
E1Trim	Inter-grupos	5.368	1	5.368			7.003	1	51	0.011
	Intra-grupos	84.82	51	1.663	3.228	0.078				
	Total	90.189	52							
TraE1Trim	Inter-grupos	0.417	1	0.417			9.606	1	51	0.003
	Intra-grupos	9.885	51	0.194	2.151	0.149				
	Total	10.302	52							
Consanguinidad	Inter-grupos	0.39	1	0.39			30.707	1	51	0
	Intra-grupos	4.138	51	0.081	4.811	0.033				
	Total	4.528	52							
Grado de Familiaridad	Inter-grupos	0.016	1	0.016			3.548	1	51	0.065
	Intra-grupos	0.966	51	0.019	0.825	0.368				
	Total	0.981	52							
EscM	Inter-grupos	0.352	1	0.352			6.089	1	51	0.017
	Intra-grupos	11.534	51	0.226	1.558	0.218				
	Total	11.887	52							
OcuM3emb	Inter-grupos	0.999	1	0.999			12.906	1	51	0.001
	Intra-grupos	19.793	51	0.388	2.575	0.115				
	Total	20.792	52							
OcuMant	Inter-grupos	0.999	1	0.999			12.906	1	51	0.001
	Intra-grupos	19.793	51	0.388	2.575	0.115				
	Total	20.792	52							
OcuPemb	Inter-grupos	11.208	1	11.208			24.93	1	51	0
	Intra-grupos	113.924	51	2.234	5.018	0.029				
	Total	125.132	52							

7.2.2.2.- Análisis Discriminante

Los resultados de este análisis muestran una agrupación de casos y controles de acuerdo con las variables que aportaron mayor diferenciación; se observa que las variables que

contribuyeron significativamente a la función discriminante, son los antecedentes familiares y la consanguinidad, al determinar la formación de los respectivos grupos (Cuadro 6). Sin embargo, otras variables como las ocupaciones paterna y materna, la exposición a teratógenos y la escolaridad materna, también son relevantes en el momento de discriminar estadísticamente cada uno de los grupos analizados, lo que sugiere una influencia de los mismos, probablemente como factores de riesgo que contribuyen a la presencia de la malformación.

Cuadro 6.- Coeficientes de la función discriminante. AF: Antecedentes familiares; OcuPemb: Ocupación paterna durante los primeros tres meses de embarazo; ExpT: Exposición a Teratógenos; OcuM3emb: ocupación materna durante los primeros tres meses de embarazo; OcuM3ant: Ocupación materna tres meses antes del embarazo; EscM: Escolaridad materna.

Matriz de estructura		Matriz de estructura	
	Función		Función
	1		1
AF	0.795	OcuM3emb	0.135
Consanguinidad	0.464	OcuM2ant	0.135
OcuPemb	0.259	Grado de Familiaridad	0.122
ExpT	0.236	EscM	0.051

7.2.2.3.- Análisis de Componentes Principales

Se observó la relación existente entre las variables, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (r) con un criterio de inclusión ≥ 0.3 ; las variables que se correlacionaron con una $p \leq 0.05$ se reportan en el Cuadro 7.

Cuadro 7.-Matriz de correlaciones de las variables obtenidas del cuestionario clínico. Los valores marcados en gris son diferentes de cero con una $p \leq 0.05$ y los valores en negrita son $p \geq 0.3$.

	NG	GA	AF	EM	ExpT	E1Trim	TE1Trim	TraE1Trim	Consanguinidad	EscM	OcuM3ant	OcuM3emb
NG												
GA	0.889											
AF	-0.051	-0.028										
EM	0.364	0.369	0.057									
ExpT	-0.005	-0.08	0.348	0.482								
E1Trim	0.041	0.183	0.039	-0.089	0.185							
TE1Trim	0.024	0.144	0.083	0.026	0.374	0.75						
TraE1Trim	0.212	0.337	0.031	-0.07	0.089	0.881	0.803					
Consanguinidad	-0.149	-0.221	-0.169	-0.257	-0.124	-0.128	-0.161	-0.139				
EscM	-0.304	-0.247	0.209	-0.147	0.048	-0.026	-0.194	-0.168	-0.198			
OcuM3ant	0.037	-0.019	0.255	0.397	0.897	0.272	0.403	0.197	-0.152	-0.026		
OcuM3emb	0.037	-0.019	0.255	0.397	0.897	0.272	0.403	0.197	-0.152	-0.026	1	
OcuP3emb	-0.117	-0.227	0.158	0.173	0.625	0.203	0.254	0.16	0.193	-0.163	0.535	0.535

Donde NG: Numero de gestas; GA: Gesta afectada; AF: Antecedentes familiares; EM; Edad materna; ExpT: Exposición a Teratógenos; E1Trim: Enfermedades durante primer trimestre; TE1Trim: Tipo de enfermedad durante primer trimestre; TraE1Trim: Tratamiento de enfermedad durante primer trimestre; EscM: Escolaridad materna; OcuM3ant: Ocupación materna tres meses antes del embarazo; OcuM3emb: ocupación materna durante los primeros tres meses de embarazo; OcuP3emb: Ocupación paterna durante los primeros tres meses de embarazo.

En general, se observa que las variables con una correlación inclusiva probablemente estén relacionadas con: antecedentes reproductivos (multiparidad), edad de la madre, posible exposición a teratógenos y/o tratamientos farmacológicos; ocupaciones periconcepcionales (posible riesgo laboral); y enfermedades durante el primer trimestre (probable hipertermia en la madre).

Composición de la varianza

El 31.9 % de la variación es explicado por el componente uno y el componente dos explica el 19.5%; la suma de ambos explica el 51.5% de la varianza (Cuadro 8).

Cuadro 8.- Varianza explicada por cada componente.

Varianza total explicada						
Componente	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	4.159	31.991	31.991	4.159	31.991	31.991
2	2.548	19.599	51.590	2.548	19.599	51.590
3	2.068	15.910	67.500	2.068	15.910	67.500
4	1.433	11.022	78.522	1.433	11.022	78.522

Las variables correlacionadas (con un valor ≥ 0.3) con los componentes principales (Cuadro 9), quedaron de la siguiente forma:

Componente Uno:

Antecedentes familiares, Intervalos de edad materna, la exposición a teratógenos, enfermedad desarrollada durante el primer trimestre, el tipo de enfermedad del primer

trimestre, el tratamiento de la enfermedad el primer trimestre, la ocupación materna durante el trimestre anterior del embarazo y el primer trimestre, además de la ocupación paterna durante el primer trimestre.

Componente Dos:

El número de gestas, las gestas afectadas, enfermedad durante el primer trimestre y su tratamiento.

Cuadro 9.- Correlación de las variables con los componentes. Donde NG: Numero de gestas; GA: Gesta afectada; AF: Antecedentes familiares; EM; Edad materna; ExpT: Exposición a Teratógenos; E1Trim: Enfermedades durante primer trimestre; TE1Trim: Tipo de enfermedad durante primer trimestre; TraE1Trim: Tratamiento de enfermedad durante primer trimestre; EscM: Escolaridad materna; OcuM3ant: Ocupación materna tres meses antes del embarazo; OcuM3emb: ocupación materna durante los primeros tres meses de embarazo; OcuP3emb: Ocupación paterna durante los primeros tres meses de embarazo.

Matriz de componentes	Variable	NG	GA	AF	EM	ExpT	E1Trim			
		1	0.159	0.164	0.306	0.432	0.856	0.568		
	2	0.68	0.796	-0.248	0.034	-0.407	0.456			
Componente	Variable	TE1Trim	TraE1Trim	Consanguinidad	EscM	OcuM3ant	OcuM3emb	OcuP3emb		
	1	0.687	0.537	-0.227	-0.122	0.889	0.889	0.603		
	2	0.366	0.627	-0.197	-0.357	-0.305	-0.305	-0.368		

Con base en lo anterior, se verifican nuevamente factores específicos de riesgo, posiblemente relacionados a la edad de la madre, exposición a teratógenos y/o tratamientos farmacológicos, antecedentes familiares de la malformación, enfermedades y/u ocupaciones en el periodo periconcepcional.

7.3 Análisis de riesgo relativo para los polimorfismos y los factores ambientales

7.3.1.- Razón de momios

Respecto a las variables asociadas con la malformación, la distribución de las madres mayores de 30 años fue diferente entre casos y controles ($X^2=6.87$, $p=0.01$) pero no presentó un valor de riesgo alto (OR=0.42, IC 95%0.21,0.81), la distribución de la edad de los padres no fue diferente en casos y controles ($X^2=2.71$, $p=0.10$) pero presentó un valor de riesgo de 1.62 (IC 95%0.91, 2.87; Cuadro 7.1; Figura 24).

Tener de tres a más gestas presentó un riesgo de 1.56 (IC 95% 0.89, 2.73), mientras que el riesgo de que la gesta afectada sea de la tercera en adelante es de 1.22 (IC 95%0.68, 2.18); el control prenatal no presentó riesgo.

La reacción adversa al ácido fólico presentó un riesgo de 2.66 (IC 95%0.82, 8.59); las enfermedades durante el primer trimestre presentaron distribución diferente entre casos y controles ($X^2=17.15$, $p<0.05$) y presentaron un riesgo de 4.28 (IC 95%2.09, 8.77); el tratamiento de enfermedad durante el primer trimestre también fue diferente entre casos y controles ($X^2=8.34$, $p<0.05$) y presentan un riesgo de 2.63 (IC 95%1.35, 5.14). Mientras que las variables referentes al grado de estudio de los padres, sólo la escolaridad de las madres fue diferente entre casos y controles ($X^2=5.79$, $p=0.02$), pero ni ésta ni la escolaridad paterna mostraron ser variables de riesgo (Cuadro 10).

Cuadro 10.- Comparación entre casos y controles (X^2) de las variables de riesgo tomadas del cuestionario clínico y su razón de momios (OR) para cada una de ellas. GA \geq a 3: gesta afectada, de la tres en adelante; SIAF: Sin ingesta de Ácido fólico; RAAF: Reacción adversa al ácido fólico; E1Trim:

Enfermedad durante el primer trimestre; TraE1Trim: Tratamiento de enfermedad durante primer trimestre; EscM: Escolaridad materna; EscP: Escolaridad paterna.

Variable	Casos Con	Casos sin	Contr. Con	Contr. Sin	OR	95%CI		χ^2	Valor de P
Madre \geq 30 años	17.2	82.7	33.3	66.60	0.42	0.21	0.81	6.87	0.01
Padre \geq 30 años	44.8	55.17	33.3	66.30	1.62	0.91	2.87	2.71	0.10
3 o más gestas	48.27	51.72	37.5	62.50	1.56	0.89	2.73	2.37	0.12
GA \geq a 3	37.93	62.06	33.33	66.60	1.22	0.68	2.18	0.46	0.50
Sin control prenatal	3.44	96.55	8.33	91.66	0.39	0.11	1.42	2.16	0.14
SIAF	10.34	89.65	8.3	91.66	1.27	0.49	3.32	0.25	0.62
RAAF	10.34	89.65	4.16	95.83	2.66	0.82	8.59	2.84	0.09
E1Trim	37.93	62.06	12.5	87.50	4.28	2.09	8.77	17.15	0.00
TraE1Trim	34.48	65.51	16.66	83.33	2.63	1.35	5.14	8.34	0.00
EscM	59	41	75	25.00	0.48	0.26	0.88	5.79	0.02
EscP	76	24	79	21.00	0.84	0.43	1.64	0.26	0.61

En este sentido, aquellas variables que son significativamente diferentes y que además presentan un riesgo relativo importante, son: enfermedades maternas en el primer trimestre de embarazo y el tratamiento farmacológico de las mismas.

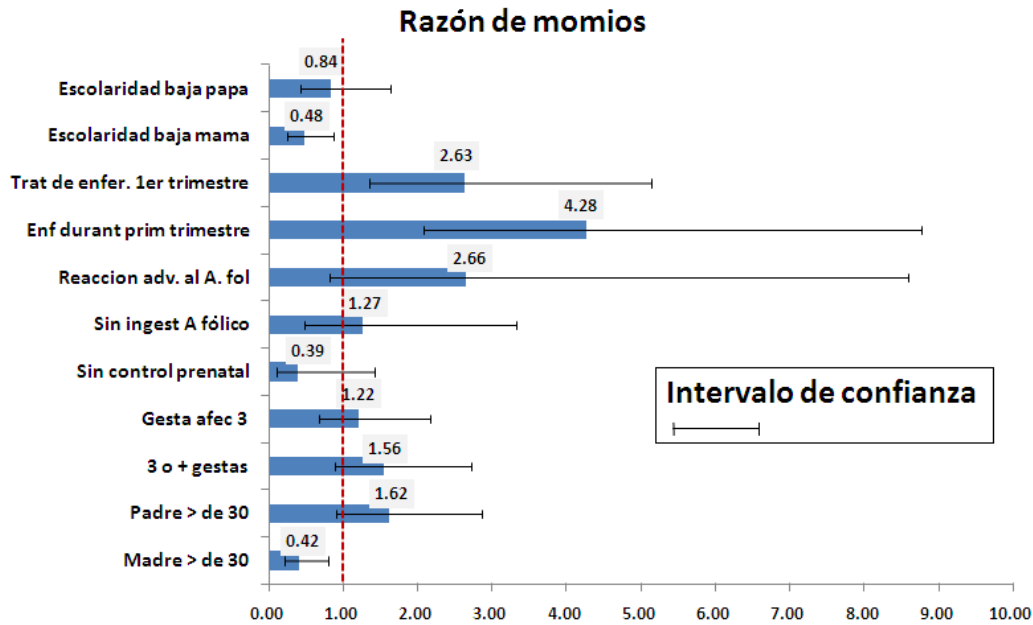


Figura 15.- Valores de Razón de momios, con sus respectivos intervalos de confianza. La línea punteada muestra el valor de uno.

Con base en lo anterior, las tendencias observadas para los posibles factores de riesgo, fueron: 1) afectación más frecuente en la población masculina; 2) el tipo de malformación más frecuente que se documenta es el labio y paladar hendido izquierdo; 3) se verifica un riesgo aumentado cuando existe un historial de fisuras en la familia, con mayor frecuencia en la rama materna; 4) se documenta un porcentaje importante de enfermedades desarrolladas por las madres en el primer trimestre de embarazo que pudieron generar hipertermia en el ambiente embrionario; 5) la edad de los padres no parece influir en la manifestación de las malformaciones; y 6) no se evidenció una distribución diferencial de las malformaciones, de acuerdo a las zonas de estudio muestreadas.

Para evaluar si las variantes del polimorfismo están relacionadas con el LH c/s PH, se compararon las frecuencias de los heterocigotos para ambos polimorfismos y sus valores de OR (1.7 IC 95% 0.9 a 3.2; Cuadro 11 A) y los cuatro modelos de herencia para obtener sus respectivos valores de riesgo; mostrando que ninguno de los modelos de herencia se asocia a una razón de riesgo relativo significativo (Cuadro 11 B).

Cuadro 11.- Razón de riesgo para ambos polimorfismos estudiados: A) la mezcla heterocigota (677C>T y 1298A>C) y B) los diferentes modelos de herencia (* modelo teórico aceptado).

A)

Genotipo	Casos con	casos sin	control con	control sin	OR	IC 95%	X ²	Valor de P
677C>T y 1298A>C	36.7	63.3	25.0	75.0	<u>1.7</u>	0.9 3.2	3.2	0.07

B)

	Modelo	Genotipo	Grupo:Ca	Grupo:Co	OR (IC 95%)	Valor de P
677 C>T	Codominante*	C/C	6 (20%)	7 (29.2%)	1	1
		C/T	17 (56.7%)	12 (50%)	1.0 (0.0-NA)	
		T/T	7 (23.3%)	5 (20.8%)	1.0 (0.0-NA)	
	Dominante	C/C	6 (20%)	7 (29.2%)	1	1
		C/T-T/T	24 (80%)	17 (70.8%)	1.0 (0.0-NA)	
	Recesivo	C/C-C/T	23 (76.7%)	19 (79.2%)	1	1
T/T		7 (23.3%)	5 (20.8%)	1.0 (0.0-NA)		
1298A>C	Codominante*	A/A	16 (53.3%)	14 (58.3%)	1	1
		A/C	13 (43.3%)	9 (37.5%)	1.0 (0.0-NA)	
		C/C	1 (3.3%)	1 (4.2%)	1.0 (0.0-NA)	
	Dominante	A/A	16 (53.3%)	14 (58.3%)	1	1
		A/C-C/C	14 (46.7%)	10 (41.7%)	1.0 (0.0-NA)	
	Recesivo	A/A-A/C	29 (96.7%)	23 (95.8%)	1	1
		C/C	1 (3.3%)	1 (4.2%)	1.0 (0.0-NA)	

Valores de riesgo para las frecuencias alélicas

Los valores de los alelos mutados de riesgo no fueron diferentes entre casos y controles, el OR para el alelo 677T (1.35), seguido del OR calculado para los alelos combinados (1.23), mientras que el OR menor (1.12) fue para el alelo 1298 (Cuadro 12). Sin embargo, para todos los valores calculados, el riesgo relativo fue mayor a uno.

Cuadro 12.- Valores de la Razón de momios (OR) para los alelos mutados y sus valores de X^2 con su respectivo valor de P.

Alelo	OR	IC95%	X^2	Valor de P	
677T	1.35	0.78	2.37	1.13	0.29
1298C	1.12	0.58	2.14	0.11	0.74
Combinado	1.23	0.82	1.86	1.01	0.32

7.4.- Análisis de equilibrio de ligamiento

El estadístico D presentó un valor de -0.081, mientras que el D' mostró un valor de 0.70, indicando la existencia de ligamiento entre los polimorfismos; el coeficiente de correlación es de -0.38 con un valor de P menor a 0.05 (Cuadro 13). Estos resultados sugieren un ligamiento entre ambos loci, lo que explicaría los datos relativos de riesgo con valores similares, puesto que cada locus dentro del cromosoma, se estaría recombinando y heredando con un patrón de desplazamiento similar, durante la meiosis en los gametos paternos.

Cuadro 13.-Análisis de desequilibrio de ligamiento; presenta estadístico D, Estadístico D' además del Índice de correlación.

Análisis de desequilibrio de ligamiento							
Estadístico D		Estadístico D'		Estadístico r		Valor de P	
677C>T	1298A<C	677C>T	1298A<C	677C>T	1298A<C	677C>T	1298A<C
-0.0816		0.7017		-0.3816		1.00E-04	

7.4.-Análisis de Haplotipos

7.4.1.- Frecuencias de Haplotipos por grupos de estudio

La frecuencia de haplotipos en los controles y los casos presenta el valor más alto para el haplotipo T-A (43.8 y 45 respectivamente); en los padres, el haplotipo T-A fue también el de mayor valor (33.3), mientras que en las madres el haplotipo C-A (46.7) fue el más alto. Se identificó con ayuda de la prueba de X^2 , que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) entre las distribuciones de los haplotipos entre casos y controles (Cuadro 14).

Cuadro 14.-Frecuencias de Haplotipos en los diferentes grupos de estudio.

Haplotipos/grupos	C-A	T-C	T-A	C-C	X^2
Controles	33.3	2.08	43.8	20.8	Ref.
Caso	30	6.67	45	18.3	0.01

El haplotipo de menor frecuencia (T-C) fue el de mayor riesgo (OR=3.36 IC95%1.64, 4.75) y el haplotipo de mayor frecuencia no difiere entre casos y controles ($X^2=0.05$, $p=0.8$) y presenta un valor de OR de 1.05 (IC95%0.6, 1.83; Cuadro 15).

Cuadro 15.- Razón de momios entre casos y controles para los diferentes haplotipos reportados en el estudio (*haplotipo de mayor riesgo).

Grupos Haplotipos	Controles		Caso		OR	IC 95%	
	con	sin	con	sin			
C-A	33.3	66.7	30	70	0.86	0.47	1.56
T-C*	2.08	97.92	6.67	93.33	<u>3.36</u>	<u>1.60</u>	<u>4.75</u>
T-A	43.8	56.2	45	55	1.05	0.60	1.83
C-C	20.8	79.2	18.3	81.7	0.85	0.42	1.72

Con ayuda de programas de genética de poblaciones (TFPGA Versión 1.3, 1997; Arlequin Versión 3.01, 2006; Popgen Versión 1.31, 1999; TCS Versión 1.21, 2005 y Kingroup Versión 2_09) se identificaron los grados de relación entre los grupos estudiados, verificando primero aquella existente entre los diferentes haplotipos identificados, lo que evidenció que la combinación silvestre (C_A) ocupa el primer lugar, se derivan los heterólogos (T_A y C_C) y la combinación con mayor número de nodos (cambios), fue T_C (Anexo B).

7.4.2.- Haplotipos de las familias del grupo de los casos

Apartir de los haplotipos familiares se realizó una asociación entre las mismas con ayuda del programa TCS (Versión 1.21) y se detectaron las familias con los haplotipos más derivados. En general, se observa que la mayoría de las familias analizadas muestra dos o más haplotipos; casi el 40% tiene tres haplotipos y el 8% muestra hasta cuatro haplotipos distintos. Es decir, no existe una conformación de alelos preferente y/o asociada a un linaje uniparental específico de herencia.

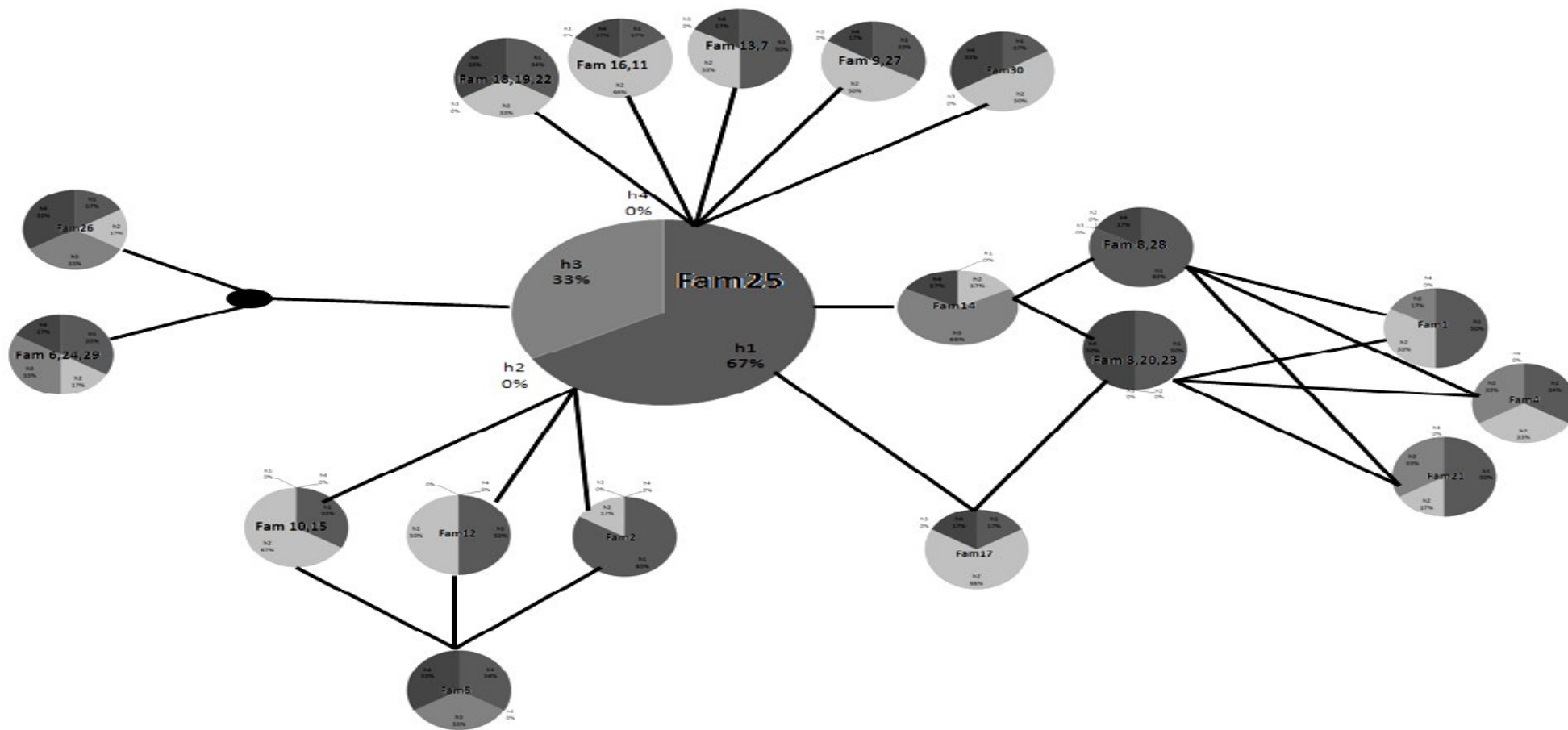


Figura 16.- Red de haplotipos de conjuntos de familias pertenecientes al grupo de los casos. Haplotipo ancestral en mayor tamaño, los puntos indican haplotipos perdidos o hipotéticos, las líneas indican relación basada en distancias euclidianas y haplotipos compartidos (con longitudes arbitrarias); los círculos indican la proporción de haplotipos presentes en los grupos y/o familias.

7.5.- Heredabilidad y penetrancia

La heredabilidad calculada a partir de la covarianza media de progenitor-progenie, muestra valores semejantes para ambos polimorfismos (Cuadro 16). Es decir, se interpretaría, en ambos casos, que más del 60% de la expresión de ambos loci, es un componente genético heredable y el resto (menos del 40%) sería el componente ambiental para su manifestación.

Cuadro 16.- Valores de heredabilidad para ambos polimorfismos, a partir de los datos genéticos obtenidos de las familias de los casos.

Heredabilidad	677C>T	1298A>C
h^2	0.633	0.626

El modelo de penetrancia se elaboró en el programa MedCal (Versión 12) estimándola de forma específica a diferentes edades con un análisis de supervivencia con la técnica de *Kaplan-Meier*, utilizando como primer factor los polimorfismos (677C>T y 1298 A>C); un segundo factor comprende todos los posibles factores de riesgo documentados con ayuda del cuestionario clínico (Cuadro 9); los intervalos de tiempo se determinaron tomando como referencia la edad materna.

Para la variante TT (>25 años), además de la influencia de los factores de riesgo, muestra un valor de penetrancia de 0.5, mientras que para la variante CT se presenta un valor de penetrancia de 0.2 (25 años), pero a los 35 años su valor aumenta a 0.6. Es decir, si se presentan edades maternas mayores a 25 años, además de los factores de riesgo documentados en el cuestionario y las variantes mutadas del polimorfismo

677C>T, la probabilidad de que la malformación esté presente en la descendencia es del 50%.

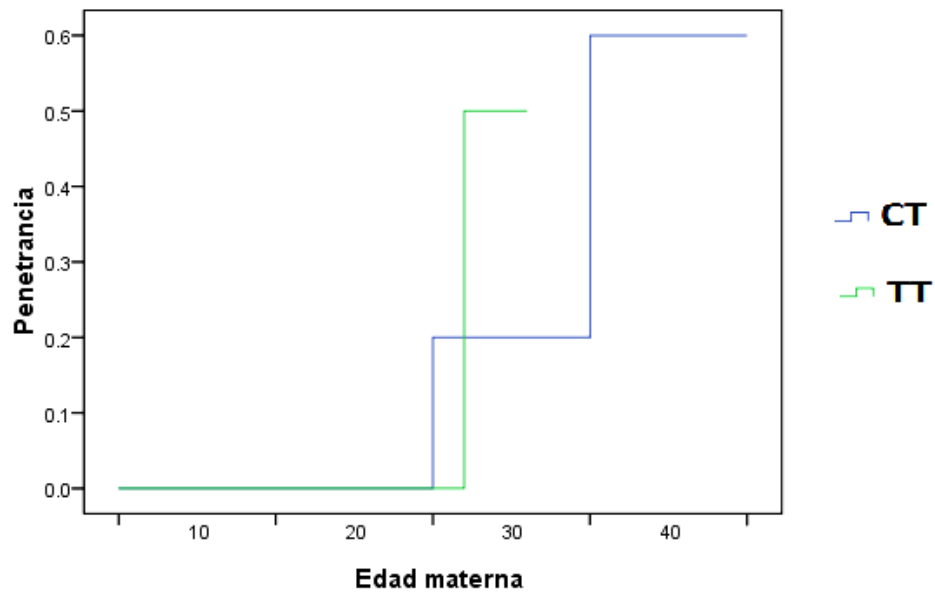


Figura 17.- Valores de penetrancia para los modelos TT y CT del polimorfismo 677C>T.

7.6.- Valores de TDT

A partir de las genealogías de los casos (Figura 28), se obtuvieron los valores de TDT para identificar la relación de los alelos mutados con la enfermedad.

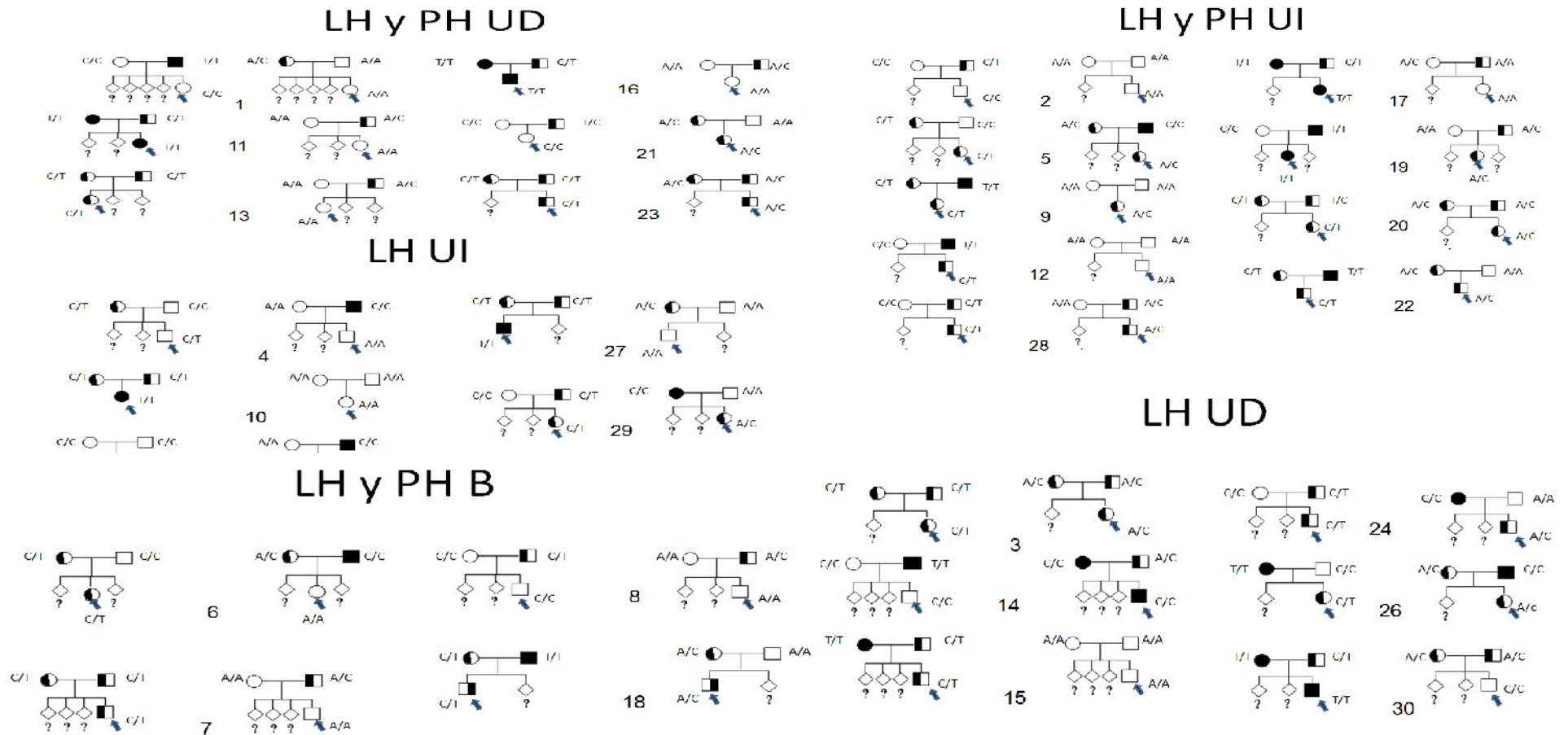


Figura 18.- Genealogías del grupo de los casos, identificados por tipo de malformación, a partir de los cuales se identifican los progenitores heterocigotos para la obtención de los valores de TDT. LH y PH UD: labio hendido y paladar hendido unilateral derecho; LH y PH UI: labio hendido y paladar hendido unilateral izquierdo; LH UD: labio hendido unilateral derecho; LH UI: labio hendido unilateral izquierdo; LH y PH B: labio hendido y paladar hendido bilateral.

Respecto a la transmisión de los alelos en las genealogías de los casos, el polimorfismo 677C>T muestra un valor de 1.5 con una p de 0.2 y el polimorfismo 1298A>C un valor de 0.47 con una p de 0.4 (Cuadro 17); lo que sugiere que el alelo T del polimorfismo 677C>T está asociado con la manifestación de la malformación, de acuerdo a la probabilidad de transmisión.

Cuadro 17.- Valores de TDT y sus respectivos valores de P para cada uno de los polimorfismos estudiados.

Polimorfismo	Valores de TDT	Valor de P
677C>T	<u>1.5</u>	0.2
1298A>C	0.47	0.4

8.-DISCUSIÓN:

8.1 Análisis de la variabilidad y estructura genética de los polimorfismos

En general, los polimorfismos para ambos loci fueron detectados y confirmados respecto a las referencias (677C>T, Blanco-Muñoz, 2007; 1298A>C, van der Put, 2000). Se verificó el estatus de locus en equilibrio para el grupo de controles, en ambos polimorfismos. Con base en lo anterior, es posible establecer entonces que ambos marcadores son válidos para verificar posibles diferencias cuando se comparan grupos afectados versus sanos (Iniesta, 2005).

Los datos de distancias genéticas sugieren que las madres guardan mayor relación genética con los casos, respecto de los padres. En este sentido, se han documentado modelos específicos de activación genética, asociados a la expresión preferente del juego de alelos de alguno de los padres (impronta genética), lo que permite entonces una expresión diferencial, según sea la copia materna o paterna; este tipo de mecanismos se asocian con presiones evolutivas específicas para genes implicados en el desarrollo y crecimiento de varios grupos de mamíferos. La impronta genética se ha descrito para otro tipo de malformaciones congénitas (Pinto-Escalante, 2001) y sería una posible explicación a la mayor homología genética entre los individuos afectados y sus madres.

Ochenta y cinco a noventa por ciento de la variación genética neutral en la especie humana se debe a las diferencias entre individuos dentro de las poblaciones. El 10%-15% restante se debe a las diferencias entre grupos, y, aunque es modesta, esta

variación influencia las diferencias promedio en características físicas, la susceptibilidad a padecer enfermedades y la respuesta al tratamiento entre poblaciones (Vidal-Aguilera, 2009). Para evaluar el impacto de esta variación, particularmente en comparación con ciertos factores ambientales, las deducciones son a menudo realizadas sobre la estructura genética de una muestra. La estructura genética de ambos grupos analizados no presenta una estratificación específica, al menos para los loci analizados. Esto implica que, en términos de manifestación de las variantes mutadas, no existe un patrón de asociación particular de todas las configuraciones posibles de genotipos con la alteración (677C>T: C-T y T-T; 1298A>C: A-C y C-C). Es decir, la presencia de variables mutadas del gen de la enzima no está relacionada a la configuración genotípica de las mutaciones y las versiones silvestres del gen, aunque estudios previos han reportado que existe un polimorfismo fijado consistentemente en otros grupos estudiados (1298A>C; González-Herrera, 2007).

Se encontró también una distribución diferencial de frecuencias alélicas y genotípicas para ambos loci en el grupo de casos. Esto implica que hay conformaciones específicas de alelos que se están presentando en los individuos con LH c/s PH y que probablemente estén potenciando la presencia del padecimiento. Esta asociación se ha reportado previamente en otros estudios con el gen MTHFR (Botto, 2000), donde se reportan genotipos específicos de riesgo para otras MC asociadas al metabolismo del folato. Czeizel et al. (1999) describen que para el polimorfismo 677C>T, las configuraciones C-T y T-T presentan un riesgo importante en la manifestación de alteraciones de la línea media. Para el caso del polimorfismo 1298A>C, van der Put

(1998) ha identificado que el homocigoto C-C disminuye la eficiencia de la actividad enzimática de la MTHFR y en las concentraciones de folato y homocisteína, pero en menor medida que la mutación 677C>T, por lo que se considera un factor de riesgo menor, especialmente en condiciones de baja ingesta de folato o cuando los requerimientos de éste sean altos.

No obstante, en el presente estudio la prevalencia del genotipo 1298CC en la población control a pesar de ser relativamente baja (4.2%), no difiere de otros estudios (van der Put et al., 1998; Barber et al., 2000). Además, algunos autores establecen que la heterocigosidad combinada para ambas mutaciones provoca una disminución en la actividad de la enzima MTHFR considerablemente mayor que la obtenida para las formas heterocigotas por separado, produciendo unas concentraciones plasmáticas altas de homocisteína y bajas de folato (Barber et al., 2000).

Esto implica que si bien el genotipo específico, asociado a cualquiera de las variantes mutadas del gen MTHFR, no puede ser el único determinante crítico del resultado final (la presencia de LH c/s PH), sí presenta un efecto interactivo entre el genotipo y el estado de folato. En particular, se ha documentado previamente que el genotipo TT (677C>T) influye en las concentraciones de homocisteína solamente cuando las del folato están por debajo del valor promedio. Este efecto interactivo genotipo-nutriente es consistente con el modelo multifactorial propuesto para los defectos del tubo neural y sugiere un mecanismo por el cual el metabolismo de los folatos como tal, no presenta una predisposición genética para el desarrollo de ese tipo de alteraciones. Para efectos de este estudio, no se encontró tampoco un genotipo específico que

documentara un riesgo relativo estadísticamente significativo, asociado a la manifestación de LH c/s PH.

Por otro lado, la ausencia de la mezcla de genotipos 677TT/1298CC apoya la hipótesis de que los alelos 677T y 1298C están siempre en posición trans, es decir están enfrentados en diferentes cromosomas homólogos (Gutiérrez-Revilla, 2003). Este hecho concuerda los resultados aportados por otros autores como van der Put et al., 1998; Barber et al., 2000 y Urano et al., 2002. En este sentido, es prácticamente improbable encontrar los cuatro alelos mutados en un individuo y esto confirma entonces que la combinación genotípica más riesgosa sería la conformación heterocigota (alelo sano + alelo mutado), para cada gen, lo que se confirma con las frecuencias de las variantes heterocigotas para ambos genes en el grupo de casos, sensiblemente mayor con respecto a los valores del grupo control, en este estudio.

8.2 Análisis estadístico para casos y controles

Al revisar las variables del cuestionario clínico, la información coincide con la literatura, ya que el género masculino es en el que se presentan las fisuras orales con mayor frecuencia (Figura 3; Anexo B). Se encontró afinidad con otros informes en cuanto al tipo de fisura presentada y su frecuencia relativa (Figura 12; Andrews-Casal, 1997; Carinci, 2000).

Respecto a la distribución de malformaciones en las zonas de estudio, el labio y paladar hendido bilateral presenta su mayor porcentaje en la zona 10 (el 75% del total de labio y paladar hendido bilateral reportados en el estudio), mientras que en la multizona se presentó el 60% del total de los casos con labio hendido unilateral

izquierdo (Figura 13 B). Esto puede relacionarse directamente a la densidad relativa de habitantes para cada una de las regiones evaluadas; sin embargo, hay que resaltar también que la zona 10 incluye la región geográfica conocida como Valle del Mezquital, que es una de las zonas diagnosticadas como de “pobreza extrema” dentro del estado de Hidalgo. Esto implica que la población en general presenta deficiencias nutricionales y en particular, para proteínas, vitaminas del complejo B y en particular ácido fólico (de 10 a 20% en niños y de 8% en mujeres; Informe CONEVAL, 2009) y el efecto consecuente sobre la generación de variantes mutadas de la MTHFR.

Se encontró concordancia con otros informes en cuanto al tipo de fisura de mayor aparición: labio y paladar hendido izquierdo en primer término y labio y paladar hendido derecho en segundo término (Figura 14) y la distribución de malformaciones respecto de los sexos (Figura 15) también mostraron ser similares a las descritas con anterioridad (Hagberg, 1997).

En particular, se identificó que el 37.9% de los pacientes (casos), refieren una historia familiar positiva con LH c/s PH (Figura 12), por lo que se considera que el componente hereditario juega un papel importante en la etiología de esta alteración, no evidenciado a partir de un gen específico (como se muestra aquí para los loci analizados), pero sí tal vez a grupos de genes relacionados, directa o indirectamente con el metabolismo de los folatos, que generarían variantes mutadas o disfuncionales para otras enzimas de esa vía metabólica en específico, como se ha evidenciado para otros modelos de alteración metabólica en humanos (Sánchez-Urbina, 2006).

Las enfermedades respecto del trimestre anterior al embarazo no presentaron diferencia entre los grupos, pero las enfermedades durante el primer trimestre presentaron una frecuencia más alta en los casos; las más comunes fueron las infecciones de vías urinarias y/o vaginales y las infecciones gastrointestinales y respiratorias (Figura 4; Anexo B), las cuales presumiblemente tengan relación con condiciones de hipertermia en el cuerpo de la madre, lo que estaría promoviendo la aparición de alteraciones o defectos de la línea media durante el periodo de desarrollo embrionario por alteraciones en la funcionalidad de la MTHFR, lo que se ha reportado para otras malformaciones congénitas tempranas, como los defectos del tubo neural (Czeizel et al., 1999).

Diversos autores han reportado termolabilidad (disfunción generada por temperaturas elevadas; pues produce desnaturalización de la estructura terciaria de la proteína) para la MTHFR (Shields, 1999), lo que implicaría que si las madres estuvieron expuestas a temperaturas lo suficientemente elevadas (posiblemente a consecuencia de alguna enfermedad infecciosa), esto podría generar alteraciones en la configuración original de la enzima y provocar anomalías que afecten a las estructuras asociadas a la línea media del embrión, como se ha documentado para otras malformaciones (entre ellas las de estructuras encefálicas; Vidal-Aguilera, 2009).

Adicionalmente, en presencia de alguna infección, se puede suponer que se consumieron algún tipo de agentes farmacológicos antimicrobianos durante el embarazo; no obstante, pocos antibióticos han comprobado ser completamente inocuos en los efectos sobre el producto, en particular si se administran en el periodo

periconcepcional, así que su participación en la etiología de las fisuras orales es controversial y, en general, la mayor parte de los antibióticos presentan recomendaciones de no utilizarse durante el periodo de gestación (Zhao, 2006).

Respecto al número de gestas, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles, pero en el grupo de casos se identifica una relación entre la multiparidad y la presencia de la malformación (Figura 13). Además no se observaron edades extremas en el estudio (Figura 14), la edad promedio fue de 26.1 años en madres, la cual es una edad considerada óptima para la concepción, aunque el intervalo de edad también se correlaciona con la gesta afectada debido posiblemente al aumento de riesgo relativo respecto de la edad (Carbo, 2001).

En este sentido, se han documentado resultados similares (Sacsquispe et al. 2004) en donde el riesgo asociado a la manifestación de malformaciones tiene que ver con el número de eventos potenciales de fertilización efectiva, lo que corrobora un componente hereditario en la manifestación de LH c/s PH.

Las variables de riesgo que discriminaron los grupos de estudio fueron: los antecedentes familiares y la consanguinidad, variables relacionadas directamente con un componente familiar posiblemente hereditario, mientras que la ocupación de los progenitores, la escolaridad materna y la exposición a teratógenos, estarían relacionados con el factor ambiental. En este sentido, diversos estudios han documentado la incidencia de factores hereditarios y ambientales, que actúan sinérgicamente para condicionar la aparición de alteraciones congénitas (Carbo, 2001),

8.3 Análisis de riesgo relativo para los polimorfismos y los factores ambientales

8.3.1.- La distribución de los genotipos y frecuencias alélicas

En este estudio, los valores de riesgo relativo no fueron estadísticamente distintos; sin embargo, es posible verificar una tendencia notable de asociación para la mezcla heterocigota en ambos polimorfismos; es decir, aquellos individuos que portan los heterocigotos para los dos loci, tiene mayor riesgo relativo (o proporcional: 1.7 más veces con respecto a los genotipos silvestres) de contribuir a la expresión de LH c/s PH. Este riesgo asociado a los heterocigotos se ha documentado previamente para otras malformaciones asociados a la línea media, como los defectos del tubo neural (van der Put, 1998; Guéant-Rodríguez, 2006).

Para ambos polimorfismos, las distribuciones genéticas (Cuadro 11) y alélicas (Cuadro 12) entre los grupos de estudio no fueron estadísticamente diferentes y la razón de momios estimada para los genotipos de riesgo no muestra asociaciones positivas; esto aún cuando se consideró en el análisis el modelo inferido en la literatura (Iniesta. 2005; Blanco-Muñoz, 2007). Esto corrobora que no existe un genotipo específico de riesgo (para los loci analizados) que condicione la aparición del LH c/s PH,

No se encontró la asociación entre la variante 677C>T en niños con LH c/s PH, en contraste con lo documentado para otros defectos de la línea media como los asociados a la formación del tubo neural (van der Put, 1995; Whitehead, 1995). Sin embargo, tomando en cuenta que el LH c/s PH es una malformación compleja, los resultados en diferentes poblaciones apoyan el papel de otros genes candidatos, de factores ambientales y la interacción genes-ambiente en su etiología (Ochoa-Lozano et al., 2003). Tampoco se evidenció una asociación directa entre los genotipos CT, TT

y AC, CC con la aparición de LH c/s PH; no obstante, consideramos que es válida la inferencia de considerar la presencia de las formas heterocigotas de ambos loci, como un elemento que potencia la manifestación de LH c/s PH. Esto se ha validado previamente para otras alteraciones asociadas a las mutaciones del gen MTHFR, particularmente en líneas maternas (Daly, 1999).

8.3.2.- Datos del cuestionario clínico

Aunque las malformaciones en general para recién nacidos aumentan con la edad de la madre, esta variable no mostró asociación con los tipos de fisuras documentados (Cuadro 10), lo cual coincide con lo que se ha reportado anteriormente (Hagberg, 1997). Respecto a la edad paterna se detectó un riesgo de 1.62 y las enfermedades durante el primer trimestre reportaron un valor de riesgo de 4.28. Es decir, la edad paterna y la aparición de enfermedades en el primer trimestre de embarazo, condicionan respectivamente, 1.62 y 4.28 veces más la posibilidad de que se manifieste la aparición de LH c/s PH en la descendencia, lo que los posiciona como factores de riesgo significativos en la manifestación de esta afección; estos factores específicos de riesgo también se han documentado en otras alteraciones congénitas (Duque, 2002; Hagberg, 1997).

Se confirmó la ausencia de riesgos significativos tanto para alelos mutados, como para genotipos específicos del gen MTHFR, sin embargo, se evidenció ligamiento en ambos loci, lo que implica patrones de desplazamiento similares durante los procesos de recombinación durante la generación de gametos en los padres; esto fortalece el argumento de que los antecedentes familiares y la consanguinidad potencian la aparición de LH c/s PH en la descendencia. Este efecto de “acarreo” genético para loci

relacionados, que genera patrones similares de frecuencia y manifestación en humanos, ha sido documentado previamente para otros genes altamente polimórficos (Awise, 2004).

8.4 Análisis de Haplotipos

El LH c/s PH es una malformación común en recién nacidos y su etiología es multifactorial e intervienen factores genéticos y ambientales (Stanier, 2004). A pesar de que el patrón hereditario del labio hendido con o sin paladar ha sido investigado por mucho tiempo los resultados reportados son controversiales (Gutiérrez-Revilla, 2004; González Herrera, 2007). Sin embargo, la distribución de haplotipos en el grupo de casos para el presente estudio, prueba de manera complementaria que aquellas configuraciones heterocigotas (tanto en genotipos como en haplotipos), son las que suponen un mayor riesgo, desde el punto de vista genético, aunque no siempre sean los más frecuentes (como es el caso del haplotipo T-C), por lo tanto los resultados obtenidos en este trabajo son útiles para llevar a cabo medidas de prevención primaria para aquellas alteraciones asociadas a mutaciones del gen MTHFR, teniendo en cuenta el perfil genético de la población hidalguense, a través de la identificación de haplotipos de riesgo en la población.

Los haplotipos específicos mostraron una distribución variable en las familias analizadas; la causa de la expresión variable de alelos asociados a enfermedades de herencia compleja aún es desconocida. Las condiciones ambientales pueden ser las responsables, ya que en ausencia de ciertos factores ambientales, el gen se expresa con gravedad limitada o no se expresa en lo absoluto. Otra posible causa es la

interacción de otros genes (denominados genes modificadores) con el gen causante de la enfermedad. Además a medida que las bases moleculares se conocen mejor, queda claro que algunos casos de expresión variable se deben a diferentes tipos de mutaciones (diferentes alelos) a lo cual se le denomina heterogeneidad alélica (Awise, 2004).

De manera complementaria, los resultados para heredabilidad y penetrancia validan un componente genético importante (determinado a partir de la configuración de haplotipos de ambos loci analizados) en la manifestación de LH c/s PH, donde además de documentar un haplotipo con riesgo importante, se manifiesta que en edades maternas mayores a 25 años, con presencia de las variantes mutadas del polimorfismo 677C>T (único con contribución relevante para la manifestación de la afección) y los factores de riesgo documentados, hay hasta un 50% de probabilidades de que se declare la malformación, verificando que la presencia de ésta es un fenómeno complejo que, no obstante, puede asociarse a factores específicos de riesgo, ambientales y genéticos, tal como se ha reportado para otras afecciones congénitas (Shields, 1999; Alvarez, 2003).

Así, si bien el genotipo no puede ser solamente el determinante del resultado final, pero sí el efecto interactivo entre el genotipo y el estado de folato, como recientemente se ha planteado (Krapels et al., 2006), este efecto interactivo genético-nutriente es consistente con el modelo multifactorial y apunta a un mecanismo por el cual el ácido fólico puede disminuir el riesgo o la predisposición a desarrollos anómalos durante el periodo embrionario (Shaw et al., 1995).

Basándose en los resultados obtenidos, se puede suponer que la dificultad de asimilación o la falta de ácido fólico en la madre, puede ser una consecuencia específica de mutaciones en los genes de la cadena de ácido fólico, lo que determina un riesgo crítico en el desarrollo de hendiduras faciales (Serrano, 2009); sin embargo, en el presente trabajo no se evaluó en particular el consumo específico de ácido fólico, lo que no permite consideraciones particulares los niveles de folato y homocisteína en madres y/o niños afectados.

Sin embargo, sí se valida la importancia de estos dos polimorfismos (con mayor relevancia el 677C>T) en la participación de la etiología del LH c/s PH, tomando en cuenta el modelo multifactorial, donde intervienen varios genes (poligenes), siendo el gen de la MTHFR uno de los loci significativos para la etiología de la malformación. Adicionalmente, los factores de riesgo detectados con ayuda del cuestionario clínico, se proponen como una estrategia importante en el diagnóstico, asesoramiento genético y tratamiento clínico en pacientes con labio y paladar hendido.

9.- CONCLUSIONES:

- I. Las variantes mutadas del gen MTHFR, 677C>T y 1298A>C, son buenos marcadores de genotipificación para validar afecciones asociadas al metabolismo de los folatos, en particular LH c/s PH, en estudios de casos y controles.
- II. Se observa una mayor homología genética de los individuos afectados con sus madres, probablemente como resultado de algún fenómeno de expresión diferencial o preferente de las variantes genéticas de los linajes maternos para los polimorfismos analizados.
- III. Según el presente estudio, los factores de riesgo significativos para la manifestación de LH c/s PH fueron: combinación de genotipos heterocigotos para ambos loci en uno o ambos padres, tanto en su combinación genotípica como en haplotipos (en particular el haplotipo familiar T-C); antecedentes familiares; consanguinidad; multiparidad; como factores genético-hereditarios. En contraparte, se documentaron: las enfermedades en el primer trimestre y/o exposición a fármacos durante el mismo; ocupación y/o nivel de escolaridad de al menos uno de los progenitores; como factores ambientales.
- IV. Se evidencia un desequilibrio por ligamiento de los dos polimorfismos analizados para el gen de la MTHFR, lo que puede generar efectos de “acarreo” durante la segregación cromosómica en los gametos. Esto explicaría fenómenos específicos de riesgo para la ocurrencia de LH c/s PH, como la consanguinidad y los antecedentes familiares.

- V. Se sugiere una combinación específica de riesgo, donde edades maternas mayores a 25 años, los factores de riesgo estadísticamente significativos y la presencia del heterocigoto 677C>T en el trío familiar, generan hasta un 50% de probabilidad de que se presente la malformación en la descendencia.

10.-LITERATURA CITADA

- Aguirre-Rodríguez** A. A., Martínez-de-Villarreal L. E., Velazco-Campos M. R., Sampallo-Hernández E y Esmer-Sánchez M. C. 2008. Prevalencia del polimorfismo 677T del gen MTHFR en una muestra de la población de Nuevo León, México. *Cartas al editor. Salud Pública de México*. Vol. 50, N1: 5-7.
- Alarcón-Almaza** J. M., 2010. Labio y paladar hendido. *Anestesiología en pediatría: Vol 3 supl1 s76-s78*.
- Allen** J. W, Rolv T. L, Kari S Taylor J, McConnaughey D. R, Vindenes H, Vollset E. S y Drevon C. A. 2007. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study *BMJ*; 10.1136.
- Al-Omari** F. y Al-Omari I. K. 2004. Cleft Lip and Palate in Jordan: Birth Prevalence Rate. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal: Vol4 N16* 609-612.
- Álvarez** A, D'Almeida V, Vergani N, de Oliveira A, de Lima F y Brunoni D. 2003. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): Incidence of mutations C677T and A1298C in brazilian population and its correlation with plasma homocysteine levels in spina bifida. *Am J Med Genet*; 119A:20-25.
- Amidei** R. L., Hamman R. F., Kassebaum D. K., Marshall J. A. 1994. Birth prevalence of cleft lip and palate in Colorado by sex distribution, seasonality, race/ethnicity, and geographic variation. *Spec Care Dentist*. Nov-Dec; 14 (6):233-40
- Andrews-Casal** M, Johnston D y Fletcher J. 1997. Cleft lip with or without cleft palate: effect of family history on reproductive planning, surgical timing, and parental stress. *Cleft PalateCraniofac J*; 34:206-209.
- Arlotti** D. M. 2009. Studio di geni potenzialmente coinvolti nell'insorgenza della labiopalatoschisi non sindromica. Tesis de doctorado. Alma Mater Studiorum-Universita di Bologna; *Biotechnologie dello Sviluppo e della riproduzione*
- Avise** J. C. 2004. *Molecular markers, Natural History, and Evolution*. Second edition. Ed. sinauer. 683 pp.
- Bailey** L. B y Berry R. J. 2005. Folic acid supplementation and the occurrence of congenital heart defects, orofacial clefts, multiple births, and miscarriage. *Am J Clin Nutr*;81(suppl):1213-75.
- Baptista** G. H., Rosenfeld M. F. y Trueba G. R., 2009. Coexistencia de las mutaciones C677T y A1298C en el gen MTHFR y eventos tromboticos. *Bol Med Hosp Infant Mex*. Vol. 66, 582-585.
- Barber** R, Sahlat S, Hendricks K, Joggerst B, Larsen R, Suárez L, *et al.* 2000. Investigation of folate pathway gene polymorphisms and the incidence of neural tube defects in a Texas hispanic population. *Mol Genet Metab*; 70:45-52.
- Bender** P. L. 2000. Genetics of cleft lip and palate. *J Pediatr Nurs*;Aug Vol 15 N 4 242-249.
- Berry** R. J., Li Z. y Erickson J. D., *et al.* 1999. Preventing neural-tube defects with folic acid in China. *N Engl J Med*;341:1485-90.
- Blanco-Muñoz** J, Lacasaña M, García R, Borja-Aburto V, Galavíz-Hernandez C y Aguilar C., 2007. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and the risk of anencephaly in Mexico. *Molec Hum Reproduc*; 13:419-24.
- Boccia** S., Hung R., Ricciardi G., Gianfagna F., Ebert M. P., Fang J., Gao C., *et al.*, 2007. Meta- and Pooled Analyses of the Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Polymorphisms and Gastric Cancer Risk: A Huge-GSEC Review. *Am J Epidemiol*; 167:505-516.
- Bolande** R. P, 1979. *Developmental pathology*. Teaching Monograph Published by The American Association of Pathologists 639-647.
- Botto** L, Yang Q. 2000, 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: A Huge Review. *Am J of Epidemiol*; 151: 862-77.
- Brandalize** AP, Bandinelli E, Borba JB, Félix TM, Roisenberg I. y Schüler-Faccini L. 2007. Polymorphisms in genes MTHFR, MTR and MTRR are not risk factors for cleft lip/palate in South Brazil. *Braz J Med Biol Res*;40,6:787-791.
- Cañón** O. L. y Gutiérrez V. E. 2006. Morfología Craneofacial en padres de niños con labio y paladar hendido. *Ustrasalud*. 5:85-92.
- Carinci** F, Pezzetti F., Scapoli L., Martinelli M., Carinci P. y Tognon M. 2000. Genetics of nonsyndromic cleft lip and palate: A review of international studies and data regarding the Italian population. *Cleft Palate Craneofac J*.;37:33-39.
- Carlson** B. M., 2009. *Embriología humana y biología del desarrollo*. Elsevier España- Ed. 4 : 344 pp.
- Carmichael** L. S. y Shaw M. G. 1999. Maternal corticosteroid use and risk of selected congenital anomalies. *American Journal of Medical Genetics*. Vol 86 N 3 242-244. Castilla, E. E., Lopez-Camelo, J. S. and Campana, H. 1999. Altitude as a risk factor for congenital anomalies. *Am. J. Med. Genet*; 86, 9-14.
- Castillo-Quan** J. I. y Pérez-Osorio J. M. 2009. La enfermedad de Alzheimer y los polimorfismos del gen metilentetrahidrofolato reductasa: una potencial aproximación nutrigenómica en México. *Gac Méd Méx* : 146: 2 147-150.

- Chávez D. V.** 2004. Asociación de ácido fólico, homocisteína y polimorfismo genético de la MTHFR con DRN y labio hendido con y sin paladar hendido en Chihuahua (tesis). Chihuahua: Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Chávez-Corral D. V., Velasco-Campos M. R., Levario-Carrillo M., Sanin, L. H., Aguirre-Rodríguez, A. A. y Martínez, L. E.** 2008. Relación entre los Niveles de Ácido Fólico, Vitamina B12 y Homocisteína Materna y los Defectos de Tubo Neural y Labio Hendido. *Int. J. Morphol* 26, 4:905-914
- Chen Z, Karaplis A. C., Ackerman S. L., Pogribny I. P., Melnyk S., Lussier-Cacan S., Chen M. F., Pai A., John S. W., Smith R. S., et al.** 2001. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet* 10,433-443.
- Clament M. Posada D. y Crandall K. A.** 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-60.
- Chenevix-Trench G., Jones K, et al.** 1991. Further evidence for an association between genetic variation in transforming growth factor alpha and cleft lip and palate. *Am J Hum Genet*; 48: 1012-1013.
- CONEVAL** Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social, 2009 Informe de evolución histórica de la situación nutricional de la población y los programas de alimentación, nutrición y abasto en México
- Congenital Anomalies con Human Genetics** Programme World Health Organization. Reporte Anual 2000. www.iph.fgov.be; www.icbd.org
- Corbo R. M. y Marimón T. M.** 2001. Labio y paladar fisurados. Aspectos generales que se deben conocer en la atención primaria de salud *Rev Cubana Med Gen Integr*; Vol 17 N 4:379-85.
- Cortés M. F.,** 2003, Frecuencias del polimorfismo C677T de la 5, 10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en mujeres chilenas madres de afectados con espina bífida y en controles normales. *Rev Méd Chile* 131: 1399-1404
- Czeizel A. E., Timar L., Sarkozi A.** 1999. Dose-dependent effect of folic acid on the prevention of orofacial clefts. *Pediatrics*;104:e66.
- Daly S. F., Molloy, A. M., Mills J. L., Less Y. J., Conley M., Kirke, P. N., Weir D. G. y Scott J. M.** 1999. The influence of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genotypes on enzyme activity in placental tissue. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 106: 1214-1218
- Davalos R. I. P., Olivares P., Castillo M. T., Cantú J. M., Ibarra B, Moran M. C., et al.** 2002. The 677C>T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Ann Genet*; 43: 89-92.
- Dávalos-Rodríguez I. P., Ramírez-Lizardo E. J., Ledezma-Rodríguez L., Nory Omayra-Dávalos M. G., González-Mercado, Durán-González J., Morán-Moguel M. C., Peralta-Leal V., Salazar-Páramo M. y Ledezma-Gómez V.** 2009. Variante C677T del gen metilentetrahidrofolato reductasa en niños mexicanos con labio/paladar hendido no sindrómico. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* ; 47,5: 549-552.
- Derijcke A, Eerens A, Carels C.,** 1996, The incidence of oral clefts: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg*; 34:488-94.
- Díaz-Rubio F, et al.** 2002. Frequency of thermolabile variant defects in the State of Yucatan, México. *Clin Genet*; 62: 394-8.
- Excoffier L.** 2006. Arlequin versión 30.1 computer program, By Excoffier L Berne
- Feinstein, A. R.** 1996. *Multivariable Analysis*. New Haven, CT: Yale University Press.
- Fraser F.C:** 1970. The genetics of cleft lip and palate . *Am J Hum Genet* 22:336.
- Frosst P, Blom H, Milos R.** Identification of a candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylene-tetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10:111-3.
- Frosst P., Blom H. J., Milos R., Goyette P., Sheppard C. A., Matthews R. G., Boers G. J., et al.** 1995, Identification of a candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylene-tetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10:111-3.
- Gallegos R. M., Romero G. G., Pérez L. N., Salazar T. M.,** 2007. Defectos congénitos mayores y múltiples en neonatos de mujeres atendidas en un hospital de tercer nivel. *Ginecol Obstet Mex*; 75: 247-52
- García A. M.** 1998. Occupational exposure to pesticides and congenital malformations: A review of mechanisms, methods, and results. *Am J Ind Med*;33:232-240.
- Gómez-García R., Lara N. R.** 2008. Incidencia de labio y paladar hendido en México: 2003-2006. *RLVISIA ADM*; Vol 65 N. 6 309-313.
- González-Herrera L, García-Escalante G, Castillo-Zapata I, Canto-Herrera J, Pinto-Escalante D, Díaz-Rubio F, et al.** 2002, Frequency of the thermolabile variant C677T in the MTHFR gene and lack of association with neural tube defects in the state of Yucatán, Mexico. *Clin Genet*;62:394-398.

- González-Vargas O.** y Trejo-Lucero H. 2007. Defectos del tubo neural. Experiencia en un Hospital de Toluca, México. *Arch Neurocién (Mex)* 12, 3: 171-175.
- Gorlin R. J.,** Cohen M. M., Hennekam R. C. M., 2001. *Syndromes of the head and neck*. Ed 4. Oxford: Oxford University Press; 850-860.
- Goyette P.,** Summer J. S., Milos R., Duncan A. M. V., Rosenblatt D. S., Matthews R. G., *et al.* 1994. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification *Nat Genet*; 7:195-200.
- Guéant-Rodríguez R. M.,** Gueant J. L., Debard R., Thirion S., Hong L. X., Bronowicki J. P., Namour F., Chabi N. W., Sanni A., Anello G., Bosco P., Romano C., Amouzou E., Arrieta H. R., Sanchez B. E., Romano A., Herbeth B., Guillard J. C. y Mutchinick O. M. 2006. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr*; 83:701-7.
- Gutiérrez-Revilla J. I.,** Pérez H. F., Tamarillas S. M., Calvo M. T. 2004. Ausencia de selección genética en la frecuencia de los polimorfismos C677T y A1298C del gen metilentetrahidrofolato reductasa debido a la suplementación con folato en la población española. *Química Clínica*; 23 (3) 132-136.
- Hagberg C.,** Larson O, Milerad J. 1998. Incidence of Cleft Lip and Palate and Risks of Additional Malformations. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*: January 1998, Vol. 35, N1, . 40-45.
- Hayes C.,** Werler M. M., Willett W. C., *et al.* 1996. Case-control study of periconceptional folic acid supplementation and oral clefts. *Am J Epidemiol*;143:1229-34.
- Hernandez-Díaz S.,** Werler M. M. Walker A. M. y Mitchell A. A. 2000. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *The new England Journal of Medicine*; 1608-1014.
- Hill D. S.,** Wlodarczyk B. J., Palacios A. M. y Finnell R. H. 2010. Teratogenic effects of antiepileptic drugs. *NIH-PA Author Manuscript*; Vol10 N6: 943-959.
- Holly H. A,** Kenneth H. B, Graeme I. B, Januz Bardacht, Duane R. V y Jeffrey C. M. 1989. Association of Genetic Variation of the Transforming Growth Factor-Alpha Gene with Cleft Lip and Palate *Am. J. Hum. Genet.*; 45:348-353.
- Holmberg C. P.,** Hernberg S., Kurppa K., Rantala K y Riala R. 1982. Oral Clefts and Organic Solvent Exposure During Pregnancy *Int Arch Occup Environ Health*; 50:371-376
<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>
- Iniesta R.,** Guinó E. y Moreno V. 2005. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos *Gac Sanit.*;19(4):333-41
- Internacional Centre for Birth Defects en colaboración con European Registration of Congenital Anomalies con Human Genetics Programme World Health Organization. Reporte Anual 2000. www.iph.fgov.be; www.icbd.org
- Isaza C,** Manrique LA. 1991. Anomalías y syndromes asociados con labio y/o paladar hendido. *Columb Med.*;20: 55-61.
- Jacques P. F.,** Bostom A. G., Williams R. R., Ellison R. C., Eckfeldt J. H., Rosenberg I. H., *et al.* 1996, Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*; 93:7-9.
- Jiang R.** Bush J. O. y Lidral A. C. 2006. Development of the Upper Lip: Morphogenetic and Molecular Mechanisms. *Developmental dynamics*; 235:1152-1166.
- Johnson, R.R.** Kuby P 2000. *Elementary Statistics*, Ed. 8, Duxbury Press.
- Jugessur A.,** Wilcox A. J., Lie R. T., Murray J. C., Taylor J. A., Ulvik C., Drevon C. A., Vindenes H. A. y Abyholms F. E. 2002. Exploring the Effects of Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants C677T and A1298C on the Risk of Orofacial Clefts in 261 Norwegian Case-Parent Triads. *Am J Epidemiol*;157:1083-1091.
- Konovalov D. A.,** Manning y Henshow M. T. 2004. KINGROUP: A program for pedigree relationships reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Molecular Ecology Notes* 4: 779-782.
- Kozer E,** Costei a M, Boskovic R, Nulman I, Nikfar S y Koren G. 2003. Effects of aspirin consumption during pregnancy on pregnancy outcomes: meta-analysis. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*; 68:70-84.
- Krapels I. P.,** Zielhuis G. A., Vroom F, de Jong-van den Berg L. T., Kuijpers-Jagtman A.M., van der Molen A.B., *et al.* 2006. Periconceptional health and lifestyle factors of both parents affect the risk of live-born children with orofacial clefts. *Birth Defects Res.A Clin Mo Teratol*; 76: 613-620.
- Lazcano-Ponce E,** Salazar-Martínez E, Hernándezávila M, 2001, Estudios epidemiológicos de casos y controles. Fundamento teórico, variantes y aplicaciones. *Salud Pública de México*; 43(2): 135-150.
- Lemire R. J.** Neural tube defects. *JAMA* 1988;259:558-62.

- Loffredo** L de C, de Souza J. M., Yunes J., Freitas J. A., Spiri W. C. 1993. Cleft lip and palate: case-control study. *Bol Med Hosp Infant Mex Feb*; 50(2):110-3
- López** S. A. Prevencion de los defectos de Nacimiento. *Foro Silanes. Atención a la salud en México*.2001; (11);2.
- Martin** Y. N., Salavaggione O. E., Eckloff B. W., Wieben E. D., Schaid D. J., Weinsilboum R. M. 2005. Homocysteine lowering trialists collaboration. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: a metaanalysis of the randomized trials. *Am J Clin Nutr*;82:806-812.
- Martinelli** M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci P, Stabellini G, bisceglia L, *et al.* 2001, C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: a risk factor for mothers? *Am J Med Genet*; 98:357-60. 27.
- Mccune**, B., Grace, J. B. 2002. Analysis of ecological communities. *MjM Software Design*. Gleneden Beach, Oregon. 300 p.
- Mcdonald** A. D., Mcdonald J. C., Armstrong B., Cherry N. M., Cote R., Lavoie J. Nolin A. D. y Robert D. 1988. Congenital defects and work in pregnancy. *British Journal of Industrial Medicine*;45:581-588.
- Miller** M. 2000. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) version 1.3, computer program
- Mills** J. L., Molloy A. M., McDermott A. P., Troendle J. F., Laurence C. B. Conley
- Moore** C. A., Li S, Li Z. 1997. Elevated rates of severe neural tube defects in a high-prevalence area in northern China. *Am J Med Genet*; 73:113-8.
- Moore** K. L. y Persaud T. V. N. 1995. *Embriología Clínica del desarrollo del ser humano*. 5ª ed. México, DF: Nueva Editorial Interamericana McGraw-Hill;:154:157-171, 230.
- Muñoz-Morán** E, Diéguez-Lucena JL, Fernández-Arcas N, Perán-Mesa S, Reyes-Engel A. 1998. Genetic selection and folate intake during pregnancy. *Lancet*;352:1120-1.
- Mutchinick** O. M., Lopez M. A., Luna L, Waxman J, Babinsky V. E., 1999, High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Mol Genet Metab*; 68:461-7.
- Nei** M. 1978. The theory of genetic distance and evolution of human races *Japanese Journal of Human Genetics* 23:341-69.
- Nitche** V F, Alliende R MA, Santos M J. L., Pérez B. F. Santa María V. L., Hertrampf D. Cortés M. F., 2003, Frecuencias del polimorfismo C677T de la 5, 10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en mujeres chilenas madres de afectados con espina bifida y en controles normales. *Rev Méd Chile* 131: 1399-1404
- Northland** I., Capetillo J., Orellana N. y Palomino H.. 1995. Fisuras faciales en la región de Antofagasta, Chile. *Odontol Chil*; Vol 43: N1:2933.<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xisandsrc=googleandbase=LILACSandlang=pandnextAction=InkandexprSearch=193872andindexSearch=ID>.
- Ochoa-Lozano** B. R., Ortiz-de Anda J. D., Padilla-de la Paz K. E., Chacón M. H., Blanco D. F., 2003 Casuística de 10 años de labio y paladar hendido en el Hospital Universitario de la UANL. *Med Universitaria*; 5 (18): 19-24.
- OMS World Health Organization. **Global registry and database on craniofacial anomalies**. 2003
- Padwa** B.L., Mulliken J.B., 2004. Sequential management of the child with cleft lip and palate. In: *Kaban L. B., Troulis M. J. Pediatric oral and maxillofacial surgery*. Philadelphia. Saunders:410-424.
- Pamplona** M. C., Ysunza A., 1992, Diagnóstico y tratamiento de los trastornos de articulación en el niño con paladar hendido. México: Hospital General Dr. Manuel Gea González
- Pegelow** M., Peyrard-Janvid M., Zucchelli M., Fransson I., Larson O., Kere J., Larsson C. y Karsten A. 2008. Familial non-syndromic cleft lip and palate analysis of the IRF6 gene and clinical phenotypes. *European Journal of Orthodontics* 30 169–175
- Pennell** P B. 2003. Antiepileptic drug pharmacokinetics during pregnancy and lactation. *Neurology*; 61:S35-42.
- Pérez-Molina** J. J, Alfaro-Alfaro N, Angulo-Castellanos E, Nario-Castellanos J. G. 1993. The prevalence and risk factors of cleft lip and cleft palate in 2 hospitals in the city of Guadalajara, Jalisco, Mexico. *Bol Med Hosp Infant Mex. Feb*; 50 (2): 110-3.
- Pezzetti et al.**, 2004 F Pezzetti, M Martinelli, L Scapoli, F Carinci, A Palmieri, J Marchesini, P Carinci, E Caramelli, R Rullo, F Gombos and M Tognon, Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat*, 24 (2004), pp. 104–105
- Prescott** N. J., Lees M, Winter R, Malcolm S., 2000, Identification of susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a two stage genome scan of affected sib-pairs. *Hum Genet*; 106:345-50.
- Prescott** N. J., Winter R. M. Malcolm S. 2001. Nonsyndromic cleft lip and palate: Complex Genetics and Environmental Effects *Ann. Hum. Genet.*; 65, 505-515.

- Ramírez-Espitia** J. A., Benavides F.G., Lacasaña-Navarro M., Martínez J.M., García A.M., Benach J. 2003. Mortalidad por defectos del tubo neural en México, 1980-1997. *Salud Pública Mex*;45:356-364.
- Rodríguez** I. Z., García A. R., Medina B. R. Gómez G. E. 2006. Labio Leporino. Tratamiento primario Cap 53 en *Protocolos clínicos de la Sociedad Española de Cirugía Oral y Maxilofacial*: 733-748. Editor García M. F.
- Rodríguez-Pinilla** E., Martínez-Frías M. L., 1998. Corticosteroids during pregnancy and oral clefts: A case-control study. *Teratology* Vol 58 2-5. Rowland A. S. 1995. Pesticides and birth defects. *Epidemiology*;Vol6 N1: 6-7.
- Ruiz** MC, Fernández QG, Luna GP, Tapia CR. Panorama epidemiológico de los defectos del tubo neural en México. *Gac Med Mex* 1995; 131:48.
- Sacsaquispe** S. y Ortiz L. 2004. Prevalencia de labio y/o paladar fisurado y factores de riesgo. *Estomatol Herediana*; 14 54-58.
- Sadler** T. W. 1998. Mechanisms of neural tube closure and defects. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*; 4:247-53.
- Salas** A, Carracedo Á. 2007. Estudios de asociación en enfermedades complejas: problemas estadísticos relacionados con el análisis de polimorfismos genéticos. *Rev Clin Esp*;207(11):563-5.
- Sánchez-Urbina** R., Galaviz-Hernández C., Sierra-Ramírez A., Morán-Barroso V. F. y García-Cavazos R. 2006. Trascendencia de los Factores Ambientales y Genéticos en Cardiopatías Congénitas: El Caso de la Enzima MTHFR. *Perinatol Reprod Hum*; 20: 39-47.
- Scapoli**, L., Marchesini, J., Martinelli, M. *et al.* (2005) Study of folate receptor genes in nonsyndromic familial and sporadic cleft lip with or without cleft palate cases. *Am J Med Genet A* 132, 302-4.
- Schardein** J. L. Pesticides. En: Schardein JL, ed. *Chemically induced birth defects*. 2nd Ed. Nueva York (NY): Marcel Decker, 1993:675-721.
- Schaid** D. J. Likelihoods and TDT for the caseparents design. *Genet Epidemiol* 1999; 16: 250-60.
- Schutte** C. B. y Murray J. C. 1999. The many faces and factors of orofacial clefts. *Human Molecular Genetics*; Vol 8 N10 1853-1859.
- Scriver** C. R, Beaud *et al*, 2001. William SS, Valle D. *The Metabolic & Molecular Bases Inherited Disease*. 8th Ed. McGraw-Hill, p. 3897-933
- Sedano** M. R., 2007. Fisura labial y/o palatina en el centro de derivación de malformaciones congénitas. *Rev Chil Ultrason*; 10:4-10.
- Serrano** P. C., Ruiz R. J., Quiceno B. L. Rodríguez G. M. 2009 Labio y/o Paladar hendido: una revisión. *Ustrasalud*. 8: 44-52.
- Shaw** G. M, Carmichael S. L, Laurent C, Rasmussen S. A. 2006. Maternal nutrient intakes and risks of human orofacial clefts. *Epidemiol*;17:285-91.
- Shaw** G. M., Lammer E. J., Wasserman C. R., O'Malley C. D., Tolarova M. M. 1995. Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid preconceptionally. *Lancet*; 346: 393-396.
- Shaw** M. G., Wasserman C. R., Lammer J. E., O'Malley D. C., Murray C. J., Basart M. A., Tolarova M. M., 1996. Orofacial Clefts, Parental Cigarette Smoking, and Transforming Growth Factor-Alpha Gene Variants. *Am. J. Hum. Genet*. 58:551-561.
- Shields** D, Kirke P, Mills J, Ramsbottom D, Molloy A, Burke H, Weir D, Scott J, Whitehead A. 1999. The thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: An evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. *Am J Hum Genet*; 64:1045-1055.
- Shotelersuk** V, Ittiwut C, Siriwan P, Angspatt A., 2003, Maternal 677CT/1298AC genotype of the MTHFR gene as risk factor for cleft lip. *Journal Med Genet*; 40:64.
- Skibola** F. C., Smith M. T., Kane E., Roman E., Rollinson S., Cartwright R. A., Morgan G. 1999. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Medical Sciences*: 96: 22: 12810-12815.
- Stanier** P. y Moore G. E. 2004. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Human Molecular Genetics*: Vol 13 r73-r81
- Spielman** R.S., McGinnis R.E. y Ewens W.J. 1993, "Transmission test for linkage disequilibrium: the Insulin Gene Region and Insulin-dependent Diabetes Mellitus (IDDM)", *Am J Hum Genet*, vol. 52, pp. 506-516.
- Stothard** K. J., Tennant P. W., Bell R. y Rankin J. 2009. Maternal Overweight and Obesity and the Risk of Congenital Anomalies A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*; 301 Vol. 6:636-650.
- Thulstrup** A. M. y Bonde J. P. 2006. Maternal occupational exposure and risk of specific birth defects. *Occupational Medicine*;56:532-543
- Tolarova** M, Harris J., 1995, Reduced recurrence of orofacial cleft after preconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology*; 51:71-8.

- Trigos M. I.**, Guzmán M. E. y López F. 2003. Análisis de la incidencia, prevalencia y atención del labio y paladar hendido en México MG Cir Plast; Vol13 N1 35-39.
- Urano W**, Taniguchi A, Yamanaka H, Tanaka E, Nakajima H, Matsuda Y, *et al.* Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. Pharmacogenetics 2002;12:183-90
- van der Put N. M.**, Blom H. J. 2000. Reply to Donnelly, Letters to de Editor. Am J HumGenet;66:744-745.
- van der Put N. M.**, Eskes T. K, Blom H. J., 1997, Is the common 677C>T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. Q J Med; 90:111-15.
- van der Put N. M.**, Henny W.M., Straaten V., Frans J.M. y Blom J. H. 2001 Folate, Homocysteine and Neural Tube Defects: an overview. Exp. Biol. Med;226:243-270.
- van der Put NMJ**, Gabreëls F, Stevens EMB, Smeitink JAM, Trijbels FJM, Eskes TKAB, *et al.* 1998. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects? Am J Hum Genet;62:1044-51.
- van Rooij I. A.**, Vermeij-Keers C, Kluijtmans L. A., Ocke M. C., Zielhuis G. A., Goorhuis-Brouwer SM, van der Biezen JJ, Kuijpers-Jagtman AM, Steegers-Theunissen RP. Does the interaction between maternal folate intake and the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms affect the risk of cleft lip with or without cleft palate? Am J Epidemiol 2003;157:583-91.
- Vidal-Aguilera M. L.**, Struck A., Fernández F., Chávez, Y., Simosa, V. SOBRE LOS factores de riesgo en la relación materno-fetal: ¿una nueva definición o clasificación?. Revista Venezolana de Análisis de Coyuntura, Vol. XV, Núm. 2, julio-diciembre, 2009, pp. 265-282
- Verkleij-Hagoort A**, Bliet J, Sayed-Tabatabaei F, Ursem N, Steegers E, Steegers-Theunissen R. 2007. Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms in association with orofacial clefts and congenital heart defects: a meta-analysis. Am J Med Genet A;143A,9:952-960.
- Walss-Rodríguez R**, Reyes-Garnica A, Acosta-Calderón AR, Murra-Remusat JE, Rodríguez-Rivera E. Epidemiología de los defectos congénitos del tubo neural en la ciudad de Torreón, Coahuila. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 1990;28:265-268.
- Whitehead A. S**, GallagHer P, Mills J. L, Kirke P. N, Burke H, Molloy A. M., *et al.* 1995. A genetic defect in 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. Q J Med;88:763-6.
- World Health Organization. Public health impact of pesticides used in agriculture. Ginebra: WHO, 1990.
- Wright s.** 1951 the genetical structure of populations. Annals of Eugenics 15: 323-54.
- Wyszynski D. F**, Diehl S. R., 2000, Infant C677T mutation in MTHFR, maternal periconceptional vitamin use, and risk of nonsyndromic cleft lip. Am J Med Genet; 92:79-80.
- Yeh F. C.**, Rong-cai y Boyle T. 1997. Population Genetic Analysis (POPGENE) version 1.32, computer program
- Zhao W**, Mosley B. S, Cleves M. A, *et al.* 2006. Neural tube defects and maternal biomarkers of folate, homocysteine, and glutathione metabolism. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.; 4:230-236.

ANEXOS

Anexo A:

1.-Montaje de las técnicas de PCR y visualización del DNA

Las concentraciones y temperaturas para el presente trabajo se obtuvieron a partir de protocolos anteriores y se reestandarizaron en el laboratorio (Cuadro I).

Cuadro I.- Concentraciones de mezcla maestra para PCR (por reacción) en este trabajo.

Reactivos	1 reacción
Agua Bidestilada estéril (µl)	8.8 µl
Master stock (µl)	5.1 µl
DNTP's mix	4.2 µl
Primer (R) de 25 µM	2.5 µl
Primer (F) de 25 µM	2.5 µl
Taq DNA polimerasa	0.8 u/reacción
Volumen Total	25µl

Cuadro II.- Ciclos y temperaturas de amplificación para la reacción de PCR, utilizados en este trabajo.

Estado	Ciclos	Pasos	Temperatura °C	Tiempo
1	1	1	92	1 min
2	35	1	92	1 min
		2	Anneling**	30 s
		3	72	30 s
3	1	1	72	7 min
		2	4	Espera

** 60°C para el polimorfismo 677 y 58°C para el polimorfismo 1298

Secuencias de oligonucleótidos para PCR (*primers*) utilizados en este trabajo, tomadas de Blanco-Muñoz y colaboradores (2007).

Cuadro III.- Datos de los oligonucleótidos usados para PCR

677C>T
F 5`-GCA GGG AGC TTT GAG GCT GAC-3`
R 5`-AGG ACG GTG CGG TGA GAT G-3`
1298A>C
F 5`-ATG TGG GGG GAG GAG CTG AC-3`
R 5`-GTCTCC CAA CTT ACC CTT CTC CC-3`

Cuadro IV.- Valores para el Análisis de Restricción, respectivas concentraciones y temperaturas de digestión.

Digestión de Enzimas de Restricción		μ l	Temperatura	Tiempo
1μ	10x Buffer	<i>Hinfl</i> 0.1	37°C	3h
6.5 μl	H ₂ O	<i>Mbol</i> 0.2	37°C	2h
2μl	DNA			
0.5 μl	Enzima			

2.-PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA A TRAVÉS DE LAS TARJETAS FORENSES

FTA Whatman ®

1. Cortar los discos (1.2 mm para sangre) y transferir a tubos para amplificación de PCR.
2. Agregar a cada tubo 200 μ l de FTA Purification Reagent para lavar los discos.
3. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente, (el contenido del tubo puede mezclarse manualmente).
4. Eliminar y desechar todo el FTA Purification Reagent, empleando una pipeta.
5. Repetir los pasos 3-5 dos veces, para un total de tres lavados con el FTA Purification Reagent.
6. Agregar a cada tubo 200 μ l del Buffer TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0)
7. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Eliminar y desechar todo el Buffer TE con una pipeta.
9. Repetir pasos 7-9 una vez más para un total de dos lavados con el Pulidor de TE.
10. Secar el disco a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora, a 56°C durante 10 minutos. El disco está ahora listo para PCR.

3.- CUESTIONARIO CLÍNICO CON LOS FACTORES DE RIESGO UTILIZADO EN EL ESTUDIO.

Cuadro V.-Forma de llenado de Cédula relacionado con el funcionamiento de la Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).

Captura de datos: fecha(dd/mm/aaaa)			
Registro: número de expediente electrónico y primera letra de cada uno de los apellidos y nombres que aparecen en el expediente...			
Fecha de nacimiento: dd/mm/aaaa	aa	mm	dd
1.- Edad, cumplidos al momento de la primera consulta:	aa	mm	dd
2.- Género, el asignado por los padres: (1) Femenina o (2) Masculino			
3.- Municipio de Origen: número asignado.			
4.- Municipio de Residencia: número asignado.			
5.-Tipo de Malformación: (a) Pseudolabio hendido unilateral (izquierdo(1)/derecho (2)) o bilateral (3) (b) Labio Hendido Unilateral (4) Labio Hendido Bilateral (5), (c) Labio y Paladar Hendido Unilateral (izquierdo(6)/derecho (7)) (d) Labio y Paladar Hendido Bilateral (8).			
6.-Antecedentes Hereditarios Familiares de Labio Hendido con o sin Paladar Hendido y/o Paladar Hendido Aislado: (1) No o (2) Si			
6.1.- Cantidad: Números enteros.			
6.2.-Rama familiar: (1) Se desconoce, (2) Materna, (3)Paterna o (4) Ambas			
6.3.-Género del familiar afectado: (1) Se desconoce, (2) diferente del afectado, (3) Mismo del afectado o (4) Ambos.			
6.4.- Grado de parentesco del familiar afectado: (1) Se desconoce, (2) más lejana de 3er grado, (3) Combinación de gados, (4) 3er, (5) 2do grado (6) 1er grado.			
6.5.- Tipo de afección: (1) Se desconoce, (2) Diferente o (3) Misma.			
6.5.1.-Especificación de la Afección: (1) Labio Hendido Unilateral, (2) Labio Hendido Bilateral, (3) Labio y Paladar Hendido Unilateral, (4) Labio y Paladar Hendido Bilateral o (5) Paladar Hendido Aislado.			
7.- Edad Materna de Gesta Afectada:			
8.- Edad Paterna de Gesta Afectada:			
9.- Relación de Número de Gestas/Número de Gesta Afectada: Números Romanos			
10.- Fecha de la ultima menstruación de la gesta afectada fecha(dd/mm/aaaa)			
11.-Municipio de Residencia al menos 6 meses antes del Embarazo de Gesta Afectada: Número del 1 al 84.			
12.-Municipio de Residencia los 3 primeros meses de Embarazo de la Gesta Afectada: Número del 1 al 84.			
13.-Control Prenatal: (1) No o (2) Si.			
14.-Ingesta de Ácido Fólico: (1) No recuerda, (2) No, (3) Si.			
15.-Recibe Información Médica sobre Ingesta de Ácido Fólico: (1) No recuerda, (2) No o (3)si			
16.-Momento de Inicio de Ingesta de Ácido Fólico: (1) Después del 3er trimestre de embarazo, (2) Durante el 3er trimestre de embarazo, (3) Durante el 3er mes de embarazo, (4) Durante el 2º mes de embarazo o (5) Durante el 1er mes de embarazo, o (6) Al menos 1 mes antes del embarazo.			

17.-Trimestre de Gestación al momento de Suspender el Ácido Fólico: (1) Antes de finalizar el 3er Trimestre del embarazo y (2) Después de finalizar el 1er trimestre del embarazo.		
18.-Reacción Adversa a la Ingesta de Ácido Fólico: (1) No lo recuerda, (2) No o (3) Si.		
19.-Conocimiento sobre la utilidad del Ácido Fólico: (1) Si o (2) No.		
20.-Apreciación de la Utilidad del Ácido Fólico: (1) No sabe, (2) Si le sirvió o (3) No le sirvió.		
21.-Exposición a Teratógenos: (1) No recuerda, (2) No o (3) Si.		
22.-Inicio de la Exposición: (1) Al menos 3 meses antes, (2) Durante el 1er trimestre del embarazo o (3) Después del 1er trimestre del embarazo.		
23.-Duración de la Exposición del Teratógeno: (1) Sólo 3 meses antes del embarazo, (2) Sólo durante el 1er trimestre del embarazo y (3) Ambos.		
23.1.-Tipo: (1) Biológico, (2) Químico, (3) Físico, (4) 1 y 2, (5) 2 y 3, (6) 1 y 3 o (7) 1, 2 y 3.		
24.-Enfermedad Desarrollada Tres Meses Antes del Embarazo: (1) No recuerda, (2) No o (3) Si.		
25.-Enfermedad Desarrollada Durante el 1er Trimestre del Embarazo: (1) No recuerda, (2) No o (3) Si.		
26.-Tipo de Enfermedad Desarrollada Tres Meses Antes del Embarazo: (1) Infección gastrointestinal/respiratoria, (2) Infección de vías urinarias, (3) Infección de vías respiratorias o (4) Diabetes.		
27.-Recibo Tratamiento: (1) No recuerda, (2) No o (3) Si.		
28.-Momento de Inicio de Tratamiento: (1) Después del 1er trimestre del embarazo, (2) Antes del embarazo o (3) Durante el 1er trimestre del embarazo.		
29.-Tipo de Enfermedad Desarrollada Durante el 1er Trimestre del Embarazo: (1) Infección gastrointestinal, (2) Infección de vías urinarias, (3) Infección de vías respiratorias o (4) Diabetes.		
30.-Recibe Tratamiento: (1) No recuerda, (2) No o (3) Si.		
31.-Momento de Inicio de Tratamiento: (0) Después del 1er trimestre del embarazo, o (1) Durante el 1er trimestre del embarazo.		
32.-Consanguinidad: (1) No sabe, (2) No o (3) Si.		
33.-Grado de familiaridad: (1) Se desconoce, (2) Más lejano de 3er grado, (3) Combinación de grados, (4) 3er grado, (5) 2º grado o (6) 1er grado.		
34.-Escolaridad: (1) Analfabeta, (2) Primaria, (3) Secundaria, (4) Bachillerato/técnica, (5) Licenciatura o (6) Posgrado.	Madre	Padre
35.-Ocupación Materna relacionada con Teratógenos 3 meses antes del Embarazo: (0) Ninguna, (1) Expuesta a agentes biológicos, (2) Expuesta a agentes físicos, (3) Expuesta a agentes químicos, (4) 1 y 2, (5) 1 y 3, (6) 2 y 3 o (7) 1, 2 y 3.		
36.-Ocupación Materna relacionada con Teratógenos durante los 3 primeros meses de Embarazo: (1) Ninguna, (2) Expuesta a agentes biológicos, (3) Expuesta a agentes físicos, (4) Expuesta a agentes químicos, (5) 1 y 2, (6) 1 y 3, (7) 2 y 3 o (8) 1, 2 y 3.		
37.-Ocupación Paterna relacionada con Mutágenos al menos 3 meses antes del Embarazo: (1) Ninguna y (2) Agentes radioactivos		
Observaciones:		

4.- FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Titulo del Proyecto de Estudio: “Polimorfismos genéticos de la Metilene-Tetrahidrofolato Reductasa (MTHFR) asociados a Labio Hendido Con/sin Paladar hendido, en una población infantil del estado de Hidalgo”

Equipo de investigación: Dra. Laura Rosa Cornejo Roldán, Dra. María del Carmen Sánchez Hernández, Dra. Denis Marbella Trejo Vivanco, Biol. Ernesto Chávez Calzada, Dr. Roberto Ávila Pozos y Mtro. Luis Martín Bernal Lechuga.

Si usted es el padre/madre/tutor de un individuo menor o igual a 18 años y ha sido invitado a participar en éste estudio, la palabra “usted” en éste documento se referirá a usted y a su hijo. Se le pedirá que lea y firme éste documento para otorgar permiso a su hijo y a usted mismo para participar en esta investigación de forma voluntaria.

Si usted es un adulto que está leyendo éste documento porque ha sido invitado a participar en el estudio, la palabra “usted” en el documento se referirá a usted. Se le pedirá que lea y firme éste documento para otorgar el permiso de su participación en la investigación de forma voluntaria.

¿Cuál ES EL PROPÓSITO DE ÉSTE ESTUDIO?

El propósito de este estudio es encontrar si hay diferencias genéticas entre personas afectadas con Labio Hendido con o sin Paladar Hendido (LH c/s PH) y personas no afectadas.

¿CUÁNTAS PERSONAS VAN A PARTICIPAR?

Cerca de 180 personas del Hospital del Niño DIF- Hidalgo tomarán parte en este estudio. La mitad de ellas pertenecerán al grupo de los afectados y la otra mitad al grupo de los no afectados.

¿CUÁNTO TIEMPO ESTARÉ EN ÉSTE ESTUDIO?

Si usted acepta tomar parte en este estudio, su participación tomará cerca de una hora en la visita inicial. El estudio continuara por varios años. Es posible que lo llamemos nuevamente en los próximos meses para discutir los hallazgos de la investigación.

Debe usted tomar en cuenta que los registros y el material obtenido de su sangre (ADN) serán guardados indefinidamente.

Es importante señalar que usted tendrá la oportunidad de dejar de participar en el estudio en cualquier momento y no será penalizado de ninguna manera, ni mucho menos se le serán negados los beneficios a los cuales usted tiene derecho como paciente del Hospital.

¿CUÁL ES EL PROCEDIMIENTO QUE SE LLEVARÁ ACABO DURANTE ÉSTE ESTUDIO?

Muestra de ADN: el ADN (información genética) será obtenido por medio de una muestra de sangre.

Historia Médica: Le haremos preguntas sobre su historia médica y la de su familia.

Examen Físico: Investigadores clínicos especializados lo examinarán físicamente.

Fotografías: Es posible que se tomen fotografías de usted para mantenerlas dentro de los archivos de investigación

¿CUÁLES SON LOS RIESGOS DE PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

Existen algunos riesgos para participar en éste estudio. El riesgo físico es el dolor y/o moretones en el sitio de la toma de muestra. Aun teniendo en cuenta que para la toma de sangre se utilizará material nuevo y esterilizado existe la mínima posibilidad de infección en el área de la toma de muestra.

Los exámenes realizados en su muestra biológica (DNA) son experimentales y no tienen relevancia clínica. Por lo tanto, no deben ser usados por ninguna razón clínica, tal como prevención o diagnóstico. En general, no le entregaremos a usted resultados de estos estudios. Sin embargo, es posible que encontremos evidencia de que usted es portador de una forma de un gen que cause una enfermedad específica que está en estudio. Si encontramos evidencia de que usted es portador de una forma de un gen que sea de importancia médica; es posible que lo llamemos para contarle sobre los resultados. Esto siempre y cuando haya claridad de que estos resultados sean preliminares y que en lo posible serán confirmados en consulta con su médico privado o con un médico genetista clínico. Nosotros compartiremos los resultados con el médico que nos ayudó a obtener su muestra.

También pueden existir riesgos psicosociales. Si se determina que usted es portador de una forma de un gen que cause una enfermedad específica, existe un riesgo de incremento en la ansiedad o estrés debido a que estos resultados pueden no ser muy claros. Nosotros no pondremos en registro de sus resultados genéticos en su historia clínica y no daremos información acerca de usted a no ser que usted así lo autorice.

¿CUÁLES SON LOS BENEFICIOS DE ESTE ESTUDIO?

Usted se beneficiará directamente por participar en este estudio, sin embargo esperamos que en un futuro, otras personas si se beneficiarán de éste estudio ya que al encontrar diferencias genéticas entre personas con malformaciones de la cara y sin ellas nos ayudarán a entender las causas de estos desordenes. Es un paso hacia encontrar formas de predecir o prevenir estas condiciones en el futuro.

¿EL ESTAR EN EL ESTUDIO TENDRA UN COSTO ECONÓMICO PARA MI?

Su participación en éste estudio no tendrá ningún costo económico para usted.

¿SE ME PAGARA ALGUN DINERO POR ESTAR EN ESTE ESTUDIO?

Usted no recibirá ningún pago económico por estar en éste estudio.

¿QUIÉN ESTÁ FINANCIANDO ESTE ESTUDIO?

La Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) y el Hospital del Niño DIF-Hidalgo están financiando éste estudio de investigación. Nadie en éste estudio recibirá un pago directo o un incremento en el salario por este estudio.

¿CÓMO SE PROTEJE MI CONFIDENCIALIDAD?

Mantenemos su participación en este estudio en forma confidencial hasta el punto permitido por la ley. Sin embargo, es posible que otras personas se enteren de su participación en este estudio.

Por ejemplo, los comités de ética de la UAEH y del Hospital del Niño DIF- Hidalgo (un comité que revisa y aprueba estudios de investigación) pueden inspeccionar y copiar registros pertenecientes a esta investigación. Alguno de estos registros pueden contener información que personalmente lo identifique a usted. Si escribimos un reporte o artículo sobre éste estudio, describiremos los resultados del estudio de una forma resumida de tal manera que usted no pueda ser identificado, con el fin de mantener la confidencialidad, no colocaremos una copia de este consentimiento en ninguno de sus registros médicos.

Las medidas de seguridad incluyen el uso de archivos codificados que no permitirán el reconocimiento de su identidad, archivos cerrados y computadoras de acceso restringido con clave. El acceso a computadoras que contengan información calificada será estrictamente regulado. Solamente investigadores involucrados y personal administrativo esencial poseerán las claves que permitan acceder a dichos sistemas.

La muestra y datos obtenidos para los propósitos de este proyecto pueden ser usados por el investigador en otros proyectos de investigación genética o compartida con otros colaboradores que realizan investigación relacionada con las condiciones descritas en este estudio. En el momento en que muestras y datos sean compartidas con otros colaboradores. Su muestra y datos serán codificados con números y/o letras.

¿MI PARTICIPACIÓN EN ESTE ESTUDIO ES VOLUNTARIA?

Tomar parte de este estudio es completamente voluntario, Usted puede escoger no participar en el estudio. Si usted decide estar en éste estudio, usted puede dejar de participar en cualquier momento. Si usted decide no participar en éste estudio, o si usted decide dejar de participar, no será penalizado de ninguna manera ni mucho menos le serán negados los beneficios a los cuales usted tiene derecho como paciente del Hospital.

¿A QUIÉN PUEDO DIRIGIR MIS INQUIETUDES?

Sus preguntas serán bienvenidas. Si usted tiene cualquier pregunta sobre el estudio como tal puede contactar a la Dra. Laura Rosa Cornejo Roldán.

Si usted acepta donar su muestra de sangre en el momento y más adelante decide que sus muestras sean retiradas del estudio, puede contactar a la Dra. Laura Rosa Cornejo Roldán. Sin embargo si se ha realizado alguna investigación en su ADN, la información obtenida hasta ese momento será usada de todas maneras.

Su firma indica que éste estudio de investigación le ha sido explicado, que sus preguntas han sido contestadas y que usted acepta tomar parte en el mismo. Además de que usted recibirá una copia de este formato.

Nombre del sujeto (imprenta): _____

(Firma del sujeto)

(Fecha)

Padre/madre/Tutor o Representante Legal; Nombre y Relación con el sujeto:

(Nombre-Imprenta)

Relación con el Sujeto

(Imprenta)

(Firma del progenitor/acudiente)

(Fecha)

Para personal clínico local: Yo doy fe de mi aceptación de los Principios de la Declaración de Helsinki y la Regla Común o sus equivalentes reconocidos internacionalmente.

(Firma del Clínico Local)

(Fecha)

5.-PREPARACIÓN DE GELES PARA ELECTROFORESIS:

1. La preparación de geles de electroforesis 1% agarosa, se realiza calentando una mezcla que contenga 1 g de agarosa y 100 mL de buffer TBE 1X, hasta que se disuelva la agarosa, se deja enfriar hasta aprox. 55°C ó hasta que se pueda tomar el matraz con la mano sin quemarse.
2. Se vierte el gel evitando la formación de burbujas de aire ya que estas pueden afectar la separación de las bandas del DNA. Posteriormente se inserta la peinilla y se deja el gel en un lugar seguro sin moverla hasta que polimerice completamente.
3. Se coloca en un tanque de electroforesis. Posteriormente se añade suficiente buffer de electroforesis TBE 1X hasta que cubra el gel.

4. Se preparan las muestras de DNA, se remueve la peinilla y se colocan las muestras en los posos usando una micropipeta.
5. Se coloca el gel en la cámara de modo que la muestras migren del cátodo (atrae cargas -) al ánodo (atrae cargas +).
6. Posteriormente se conecta la cámara a una fuente de poder y se enciende a una razón de 10V por cada cm de gel.
7. Se deja migrar las muestras hasta que la línea del tinte se encuentre donde se desee y apagar el equipo. Teñir el gel en Bromuro de Etidio. Enjuagar por 30 min en agua o más si fuera necesario.
8. Se lleva el gel a una cámara con una fuente de luz UV y se registra con ayuda de una fotografía.

Anexo B:

1.- *Formula para calcular el tamaño de la muestra.*
$$n' = \left(\frac{z_{\alpha} \sigma}{s} \right)^2$$

Donde α es el nivel de significancia del estadístico de la prueba, s es la desviación de la muestra y σ la desviación de la población; n' es el tamaño provisional de la muestra.

Para calcular el tamaño de la muestra, considerando el tamaño de la población N , se uso el tamaño provisional

$$n = \frac{n'}{1 + \frac{n'}{N}}$$

2.- Marcadores genéticos

Para el genotipo 677C>T se detectaron tres fragmentos informativos; un fragmento de 228 otro de 172 y uno de 56 pb después de la digestión enzimática, las muestras que presentaron una banda con peso de 228 pb se les definió como genotipo silvestre (CC), aquellos que presentaran fragmentos de 172 y de 56 pb se le definió como genotipo mutado (TT) mientras que las muestras que presentaran los tres fragmentos se le definieron como genotipo heterocigoto (CT, Figura 1).

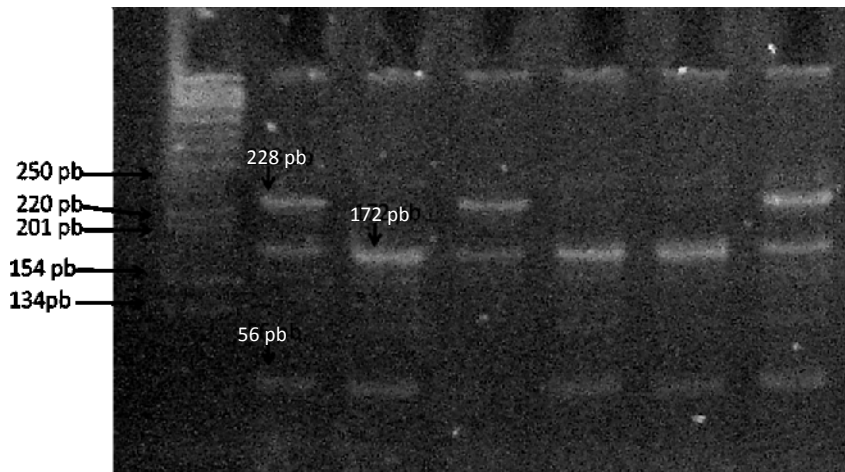


Figura 1.- Producto de la digestión enzimática del fragmento de 228 pb en el estudio de la mutación 677C>T.

Para el genotipo 1298A>C se detectaron tres fragmentos informativos; un fragmento de 241 otro de 204 y uno de 37 pb después de la digestión enzimática, las muestras que presentaron una banda con peso de 241 pb se le definieron como genotipo mutado (CC), los que presentaran fragmentos de 204 y de 37 pb se le definió como genotipo silvestre (AA) mientras que las muestras que presentaran los tres segmentos se le definió como genotipo heterocigoto (AC; Figura 2).

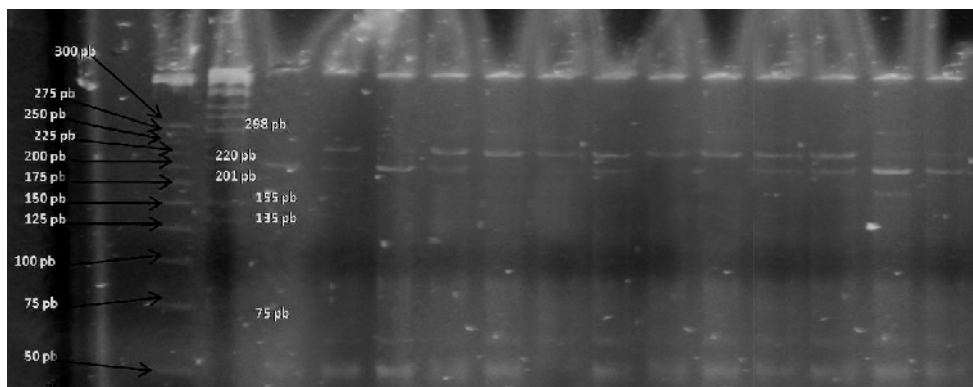


Figura 2.- Producto de la digestión enzimática del fragmento de 241 pb en el estudio de la mutación 1298A>C.

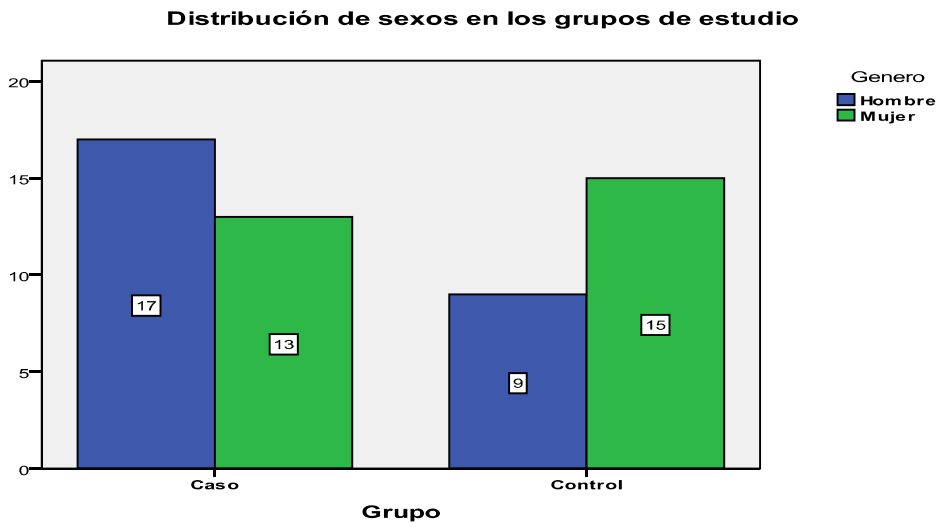


Figura 3.- Proporción de sexos en el grupo denominado casos

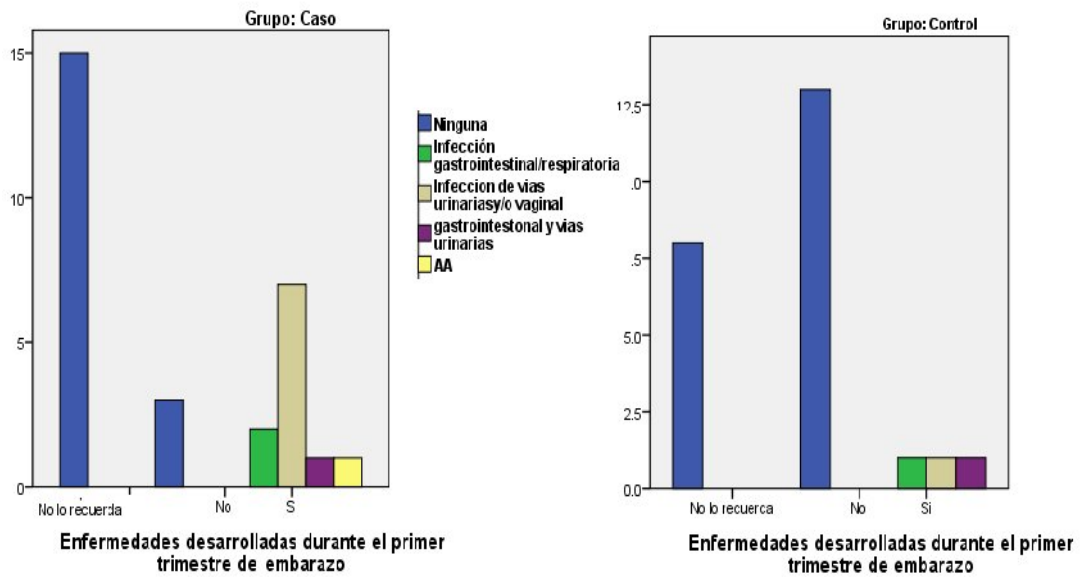


Figura 4.- Distribución de enfermedades desarrolladas durante el primer trimestre en ambos grupos (casos y controles)

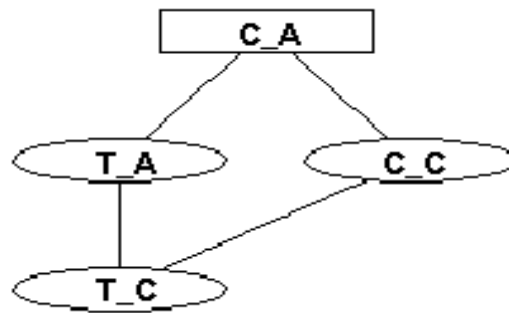


Figura 5.- Relación por distancias entre los Haplotipos identificados para el estudio; la relación se obtuvo con el programa TCS para todos los grupos.

Cuadro I.- Prueba de X^2 para los valores de las frecuencias alélicas respecto de casos y controles.

Variante	X^2	Valor de p
677C>T	2.3455	0.12565
1298A>C	0.22586	0.63461