



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**FRECUENCIA DE POLIMORFISMO C677T DEL
GEN *MTHFR* EN PACIENTES CON LABIO HENDIDO
CON O SIN PALADAR HENDIDO NO SINDRÓMICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

GENÉTICA MÉDICA

P R E S E N T A :

DRA. ILIANA DE MONSERRAT PEÑA GOMAR

DIRECTOR DE TESIS

DRA. VERÓNICA FABIOLA MORÁN BARROSO

ASESOR DE TESIS

DRA. CONSTANZA GARCÍA DELGADO



**HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ**

Instituto Nacional de Salud

65 AÑOS DE EXCELENCIA EN PEDIATRÍA
Salud para las Nuevas Generaciones

MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DRA. VERÓNICA FABIOLA MORÁN BARROSO
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

DRA. CONSTANZA GRACIA DELGADO
MEDICO ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE GENÉTICO

DRA. YOLANDA ROCÍO PEÑA ALONSO
DIRECTORA DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO

DEDICATORIA

A MI GRANDIOSA MADRE

AGRADECIMIENTOS

**Le doy gracias a mi madre y padre †
por su motivación y fuerza para seguir siempre adelante y alcanzar mis metas**

A mis hermanas que son mi inspiración

A mis amigos y amigas por su apoyo y sobre todo paciencia

A la Dra. Verónica Morán Barroso

por el apoyo brindado y su valiosa ayuda

A los Médicos adscritos por su experiencia y conocimientos

Al departamento de citogenética y biología molecular

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA CARA.....	4
1.1.1 <i>Formación de las estructuras faciales</i>	4
1.1.2 <i>Participación de las células de la cresta neural</i>	10
1.2 CLASIFICACIÓN DEL LPH.....	11
1.3 ETIOLOGÍA DEL LPH.....	13
1.3.1 <i>Herencia multifactorial</i>	13
II. ANTECEDENTES	15
2.1 BASES MOLECULARES DEL LPH.....	15
2.2 ÁCIDO FÓLICO.....	16
2.3 HOMOCISTEINA.....	16
2.3.1 <i>El ácido fólico y la metilación del DNA</i>	18
2.4 POLIMORFISMO C677T DEL GEN <i>MTHFR</i>	19
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
IV. JUSTIFICACIÓN.....	22
V. OBJETIVO GENERAL.....	22
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	23
6.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	23
6.1.1 <i>Tamaño de la muestra</i>	23
VII. CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	24
7.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	24
7.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	24
7.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.....	24
VIII. VARIABLES.....	24
8.1 INDEPENDIENTES.....	24
8.2 DEPENDIENTE.....	24
IX. PROCEDIMIENTO.....	25
9.1 ANÁLISIS CLÍNICO.....	25
9.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA ANÁLISIS.....	25
9.3 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO C677T DE <i>MTHFR</i> POR RFLP	26
9.3.1 <i>Análisis por RFLP's</i>	26
9.3.2 <i>Condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa</i>	27
9.3.3 <i>Condiciones de la restricción enzimática</i>	28
9.3.4 <i>Productos esperados de la restricción enzimática</i>	28
X. RESULTADOS.....	30
10.1 RESULTADOS DEL ANÁLISIS CLÍNICO.....	30
10.2 RESULTADOS DE ANÁLISIS MOLECULAR	33
XI. DISCUSIÓN	40
BIBLIOGRAFÍA.....	44

RESUMEN

Los defectos congénitos mayores tienen una incidencia del 3 al 5% en los recién nacidos vivos (RNV) a nivel mundial y en México se encuentran entre las 10 primeras causas de mortalidad infantil representando cerca del 10% de los casos. Entre los defectos congénitos mayores más frecuentes se considera a las hendiduras orofaciales y entre ellas en particular están el labio y paladar hendido (LPH) como la cuarta causa más común de malformaciones congénitas en humanos con una incidencia mundial de 1 en 600 a 1:1,000 RNV.

La etiología del LPH aislado es multifactorial o poligénica por lo que el fenotipo es el resultado de la interacción del efecto acumulado de múltiples genes sumado al efecto de las influencias ambientales y corresponde al 90% de todos los casos de LPH. Dentro de los factores ambientales reconocidos se incluyen por ejemplo la deficiencia de ácido fólico, por lo que el medio ambiente y el estado nutricional del feto pueden ser factores en la presentación del LPH. Se ha determinado que existe una asociación o predisposición a LPH ante la presencia del polimorfismo *C677T* del gen *MTHFR* la cual es importante para la regulación del metabolismo del ácido fólico ya que la presencia de este polimorfismo lleva a un aumento de los niveles de homocisteína en sangre. Lo anterior induciría defectos en la migración de las células de la cresta neural por la inhibición competitiva de los receptores de N-metilo-D-aspartato (NMDA) actuando como un antagonista. La homocigocidad para el alelo mutado *C677T* resulta en un enzima termolábil, con disminución en su actividad del 50–60% a 37°C. Los individuos homocigotos o heterocigotos presentan niveles elevados de homocisteína en plasma con niveles bajos de folatos,

El objetivo de este estudio fue conocer la frecuencia del polimorfismo *C677T* del gen *MTHFR* en una población de pacientes mexicanos en edad pediátrica con labio y/o paladar hendido no sindrómico y sus madres que acudieron a consulta al HIMFG entre 2007 y 2008.

Para su análisis clínico a los pacientes se les dividió en tres grupos: Pacientes con labio hendido, con LPH unilateral derecho o izquierdo, LPH bilateral. Se incluyeron un total de 32 pacientes con LPH y sus madres correspondiendo a los siguientes grupos: labio hendido con a 5 Pacientes, LPH unilateral que incluyó a 20 y LPH bilateral que fueron 7 pacientes.

Se obtuvo muestra de sangre periférica para extracción de DNA de los 32 binomios (madre-hijo) lo que representó un total de 64 muestras para análisis molecular. El análisis del polimorfismo se realizó mediante la técnica de fragmentos de restricción de longitud polimorfa (RFLP's). En el grupo de los pacientes el genotipo más numeroso con 16 casos (50%) fue el heterocigoto CT, el segundo con 14 (43.75%) correspondió al genotipo TT que es homocigoto para el alelo mutado y finalmente solo 2 casos (6.25%) para el homocigoto para el alelo silvestre CC. El análisis de genotipos en el grupo de madres determinó que el tipo más frecuente fue el TT con 15 casos (46.87%), el segundo el CT con 14 casos (43.75%) y finalmente solo 3 casos se encontraron para el homocigoto CC.

Si se considera la correlación de fenotipo con genotipo, la presentación clínica más severa correspondió al LPH bilateral en donde hubo 5 de 7 casos (71.42%) de binomio madre-hijo ambos homocigotos TT. Este dato aunque interesante, no puede considerarse como el factor etiológico de mayor peso, en primer lugar porque la herencia es multifactorial y en segundo porque en el grupo de LPH unilateral si bien fue el más frecuente, hubo 4 binomios madre-hijo homocigotos TT (20%). La frecuencia reportada del polimorfismo *C677T* en población general mexicana es mayor que en otras poblaciones lo que podría explicar que en nuestros 32 pacientes y en sus madres haya una alta frecuencia del alelo *T*.

I. INTRODUCCIÓN

Los defectos congénitos incluyen todas las variantes anatómicas o funcionales que se escapan al patrón de desarrollo normal humano, se presentan al nacimiento y en el caso de las malformaciones mayores interfieren con las funciones corporales ocasionando invalidez o incluso la muerte en etapa temprana (Gallegos Rivas et al., 2007).

Los defectos congénitos mayores tienen una incidencia del 3 al 5% en los recién nacidos vivos (RNV) a nivel mundial y en México se encuentran entre las 10 primeras causas de mortalidad infantil representando cerca del 10% de los casos (Gallegos Rivas M et al., 2007). Entre los defectos congénitos mayores más frecuentes se considera a las hendiduras orofaciales y entre ellas en particular están el labio y paladar hendido (LPH) como la cuarta causa más común de los desordenes congénitos en humanos. La incidencia mundial va de 1 en 600 a 1:1,000 RNV para LPH y es de 1:1,500 RNV para el paladar hendido aislado (McInnes R et al., 2004). La incidencia reportada ha variado dependiendo del área geográfica, grupo étnico e incluso nivel socioeconómico de la población estudiada presentado un patrón de herencia multifactorial (Oneida A. et al., 2007).

La incidencia reportada en México de LPH es de 1.39 casos por 1000 RNV, por lo que podría hacerse la consideración de que en promedio se presentan 3,521 casos nuevos cada año y que cada día nacen 9.6 niños afectados en todo el país, lo que equivale al 3.06% de las malformaciones congénitas reportadas anualmente (Trigos I. et al., 2003, Gallegos Rivas et al., 2007). En nuestra Institución las malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas constituyen la primera causa de solicitud de atención en la consulta externa correspondiendo al 29.5% de las consultas atendidas y al 21.5% de las causas por hospitalización. El LPH aislado es la causa número 14 de las malformaciones congénitas atendidas y representan a su vez el 1.23% del total de atención, siendo por ejemplo la 5ta causa de solicitud de atención en consulta externa para el servicio de Cirugía Plástica (Archivo HIMFG., 2006).

Las hendiduras orofaciales son grupo de anomalías heterogéneas y si bien existen diferentes tipos de alteraciones clasificadas de acuerdo a su severidad y a las estructuras afectadas, la

presentación clínica más frecuente es el LPH que corresponde a un 35-55% de los casos, seguida por el paladar secundario hendido que corresponde a un 30 a 45% de los casos, lo menos frecuente es el labio hendido aislado que afecta del 10 al 30% de los casos (Seibert W., 2004).

El LPH es más común en los varones y el PH se presenta con mayor frecuencia en las mujeres (Lidral Andrew C. et al., 2004). Así mismo el LPH unilateral es más frecuente del lado izquierdo que del lado derecho y la proporción de afectación de pacientes con LPH unilateral izquierdo, unilateral derecho y bilateral es de 6:3:1 (Steavenson R.E., 1993).

1.1. DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA CARA

1.1.1 Formación de las estructuras faciales

Para entender las diferentes variedades del LPH es necesario conocer el desarrollo embrionario de la cara. La formación de la cabeza deriva del aparato faríngeo y casi todas las anomalías congénitas en esta región se originan durante la transformación de éste hacia sus derivados adultos que son sensibles a insultos genéticos y ambientales (McInnes R et al., 2004).

La formación de la cara en la porción cefálica del embrión inicia hacia la 3ra semana de gestación (sdg). El estomoideo o boca primitiva sirve como punto de referencia del desarrollo facial, ésta depresión que se encuentra entre la cabeza y el pericardio es separada del intestino anterior por la membrana bucofaríngea y se rompe en el día 26 de desarrollo (Fig. 1).

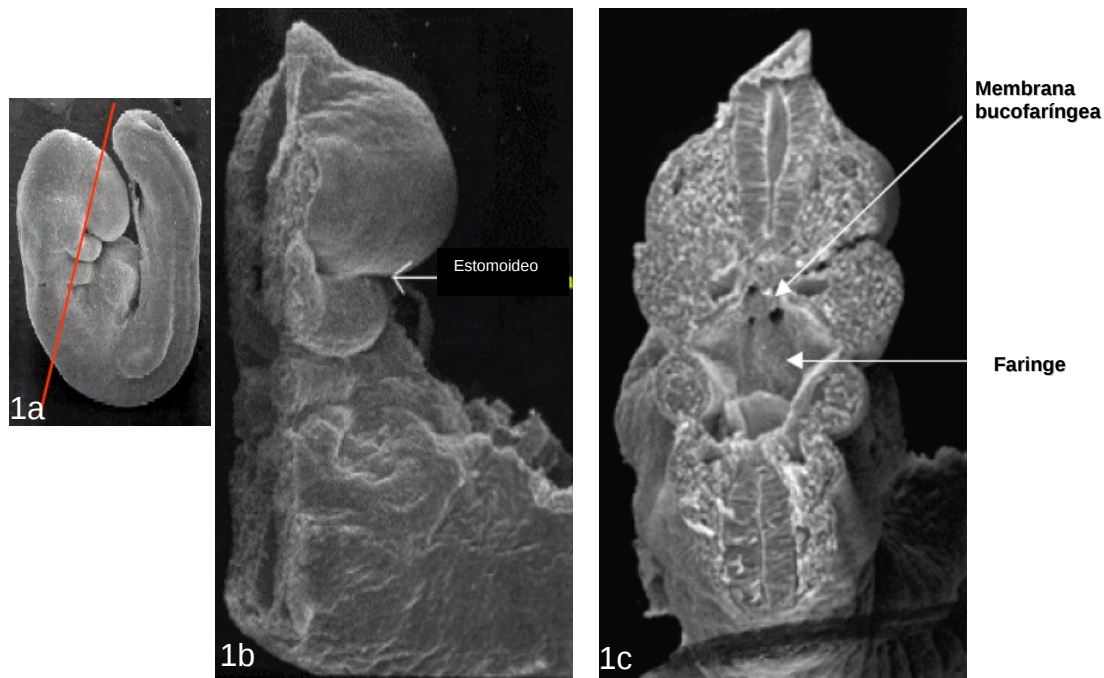


Figura 1.- Se muestra un corte (línea roja) de embrión de ratón de 9 días que corresponde a 28 días en el humano con técnica de microscopia electrónica de barrido. La Fig.1a señala el lugar del corte transversal, Fig.1b indica la posición del estomoideo y la posición de la faringe y de la membrana bucofaringea se señalan con flechas blancas en la Fig.1c (Modificado de www.med.unc.edu).

Los arcos faríngeos (AF) inician su desarrollo en la 4ta semana derivándose de prominencias surgidas alrededor del estomoideo en la parte superior y lateral de éste. Los AF aparecen como elevaciones superficiales a los lados de la faringe en desarrollo. Hacia el final de la 4ta semana se observan externamente cuatro pares de arcos bien definidos, el 5to y 6to arcos son rudimentarios. Cada AF tiene un componente aórtico, cartilaginoso, muscular y nervioso, los cuales contribuyen a la formación de la cara, cuello, cavidades nasales, boca, faringe y laringe. Alrededor del estomoideo se observan en pares los *procesos o prominencias faciales* encontrándose: la *prominencia maxilar* lateralmente, la *prominencia mandibular* en posición caudal, mientras que la *prominencia frontonasal* constituye el borde superior del estomoideo (Fig.2).

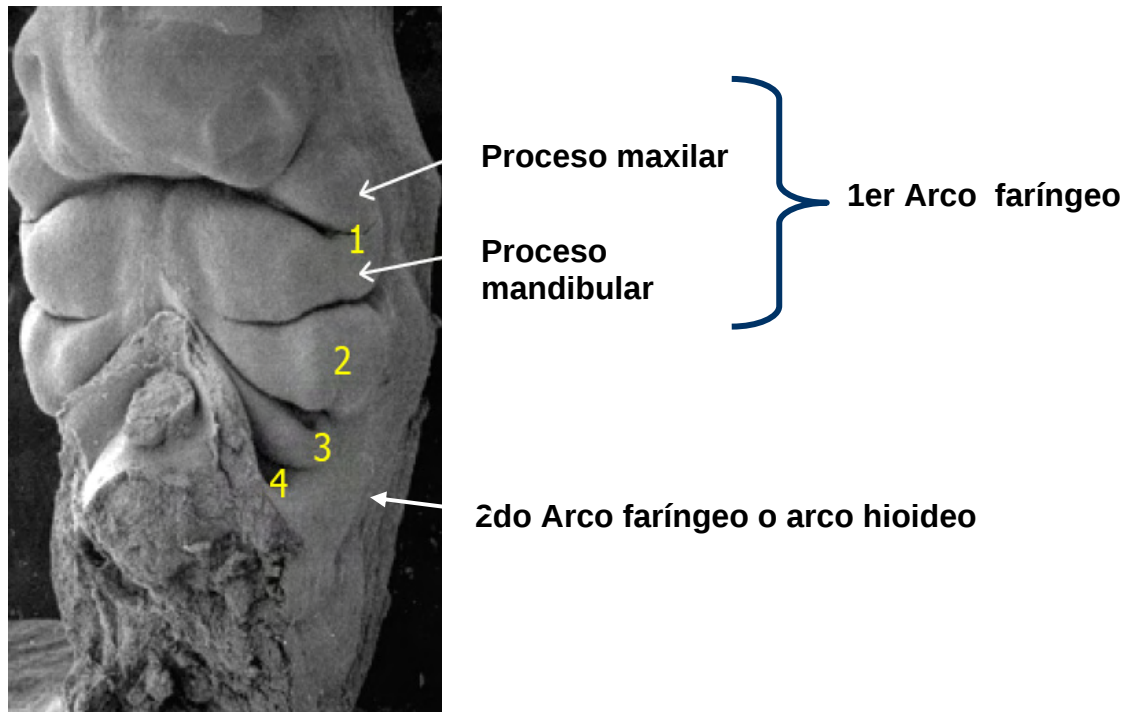


Figura 2.- Se muestra un embrión humano analizado por microscopía electrónica de barrido correspondiente a la 5ta sdg. La localización de los procesos faciales en relación con el 1er y 2do AF se indica por flechas. Están señalados del 1ro al 4to los AF (Modificado de www.med.unc.edu).

A cada lado de la prominencia frontonasal se observan las placodas nasales como engrosamientos locales del ectodermo superficial. Durante la 5ta semana se invaginan para formar las fositas nasales u olfatorias; el mesenquima de estas placodas prolifera originando elevaciones en forma de herradura llamadas procesos nasales mediales (lado interno) y laterales (lado externo) (Fig.3).

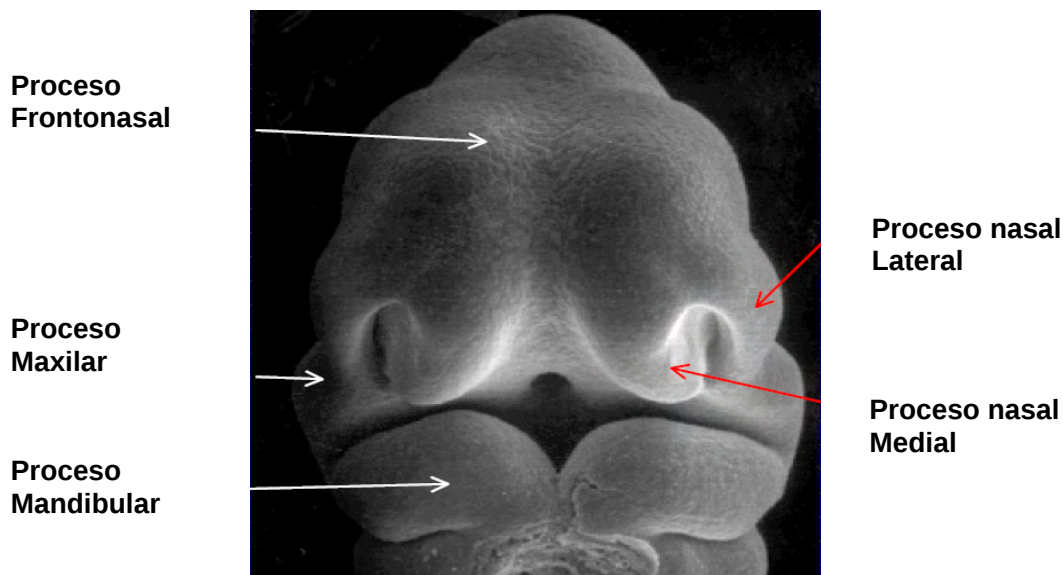


Figura 3.- Se muestra la posición de los procesos faciales en un embrión de ratón de 10 días que corresponde a la 5ta sdg humana. (Modificado de www.med.unc.edu)

La proliferación del mesenquima de los procesos maxilares ocasiona su crecimiento en dirección medial y acercándose a los procesos nasales. La migración medial de estas prominencias mueve las prominencias nasales mediales hacia el plano medio y ambos procesos maxilares y nasales mediales se fusionan entre sí. Los procesos nasolaterales se mueven hasta ponerse en contacto con los procesos maxilares en ambos lados. A medida que se fusionan las prominencias nasomediales, se forma el segmento intermaxilar que origina: la parte media o filtrum del labio superior, la premaxila y su encía, y el paladar primario o premaxila (paladar triangular) (Fig.4).

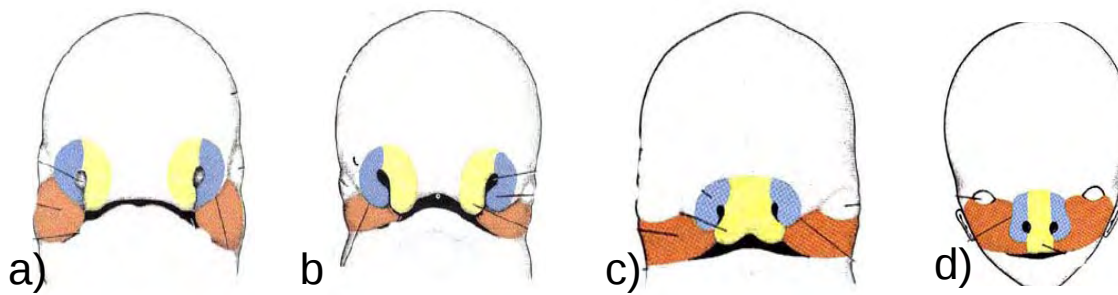


Figura 4.- Esquema de la formación del tercio medio facial. Fig. 4a Sombreado azul: proceso nasal lateral, Fig. 4b Sombreado amarillo: proceso nasal lateral, Fig. 4c Sombreado naranja: proceso maxilar (Modificado de Sandler T.W., 1996).

El labio superior se forma a partir de los procesos nasales mediales y del proceso maxilar. La nariz se forma a partir de cinco prominencias faciales: la prominencia fronto nasal da origen al puente de la nariz; los procesos nasales mediales fusionados forman la cresta y la punta y los procesos nasales laterales forman las alas de la nariz.

El proceso mandibular da lugar al mentón, labio inferior y regiones inferiores de la mejilla. Los labios y encías comienzan a desarrollarse cuando un engrosamiento lineal del ectodermo o lámina labio-gingival crece hacia el mesenquima subyacente.

Los labios y mejillas primitivas son invadidas por mesenquima proveniente del segundo AF que se diferencia hacia músculos faciales y reciben innervación del VII nervio facial. El mesenquima del primer arco se diferencia hacia músculos de la masticación que reciben innervación del trigémino.

El paladar secundario que está formado por las partes dura y blanda del paladar, se extiende hacia atrás a partir de la fosa incisiva, iniciando su desarrollo en la 6ta sdg a partir de las proyecciones internas de los procesos maxilares llamados *procesos o crestas palatinas* que entre la 7ma y 8va sdg se alargan y ascienden en posición horizontal hacia la lengua.

Inicialmente la lengua se encuentra entre los procesos palatinos pero conforme avanza el desarrollo se dirige hacia abajo mientras que los tabiques palatinos medialmente se dirigen hacia arriba. El tabique nasal se desarrolla como un crecimiento hacia abajo de las partes internas de los procesos nasales mediales fusionados. La fusión entre el tabique nasal y los procesos palatinos comienza en la parte anterior durante la 9na sdg y terminan en la parte posterior (Moore K., 2001).

De manera gradual se desarrolla hueso en el paladar primario y forma la premaxila. Al mismo tiempo se extiende hueso desde los maxilares y huesos palatinos hacia los procesos palatinos laterales para formar el paladar duro. Las partes posteriores no se osifican, forman el paladar blando y su proyección cónica blanda es la úvula (Fig.6).

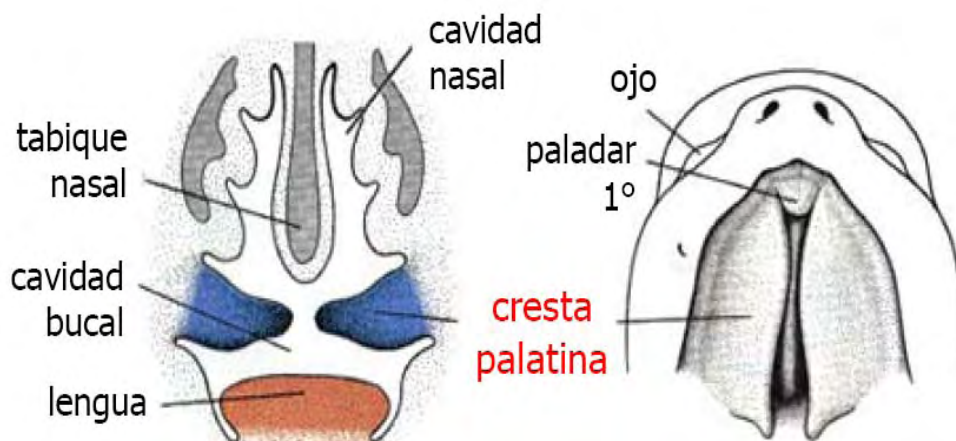


Figura 6.- Formación del paladar secundario. Corte frontal de la cabeza de un embrión de 6 semanas y media. Unión de las crestas palatinas (Sandler T.W., 1996).

1.1.2 Participación de las células de la cresta neural.

Las células de la cresta neural son una población de células con capacidad pluripotencial que tienen un papel crítico en la formación de la cabeza, se desprenden de la zona adyacente al límite entre el neuroectodermo y el resto del ectodermo para organizarse en mesenquima. El romboencefalo, al igual que otras estructuras embrionarias toma una disposición segmentaria, en rombómeros, desde los cuales las células de la cresta neural migran para contribuir a la formación de: mesénquima de los arcos branquiales y sus derivados: mandíbula, ganglios espinales, nervios craneales, células de Schwann, melanocitos odontoblastos, parte de hueso, cartílago y tejido conectivo de las estructuras craneofaciales, cápsulas sensoriales, dermis facial y armadura cefálica (Duque Osorio J. et a., 2003) (Fig. 7).

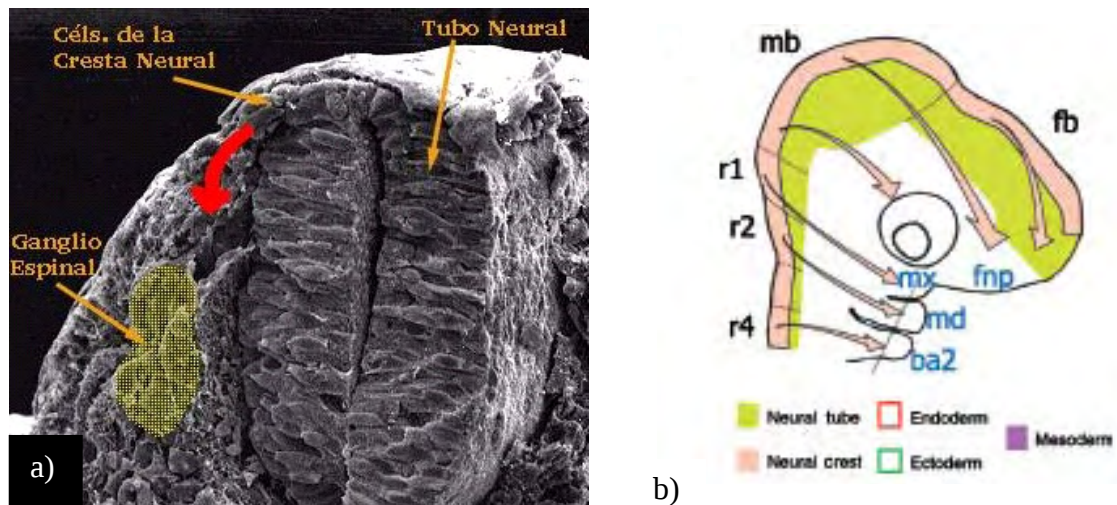


Figura 7.- Migración de las células de la cresta neural (CN). **a)** Células de la CN. **b)** Posición segmentaria del romboencéfalo en rombómeros desde el cual migran las CN a los arcos AF (Modificado de McInness R 2006 y www.med.unc.edu).

Las hendiduras orofaciales como el LPH se originan entonces de un defecto en la migración de las células de la cresta neural el cual podría estar relacionado con diversos eventos como por ejemplo el tener un número de células menor al requerido para el desarrollo normal, la falta de migración o a una incompleta capacidad inductiva, resultando estos tanto en la detención del desarrollo facial como en la falta de fusión de las prominencias y los procesos faciales (Trainor PA et al., 2002).

1.2 CLASIFICACION DEL LPH

El labio hendido (LH) puede ocurrir con o sin paladar hendido mientras que las hendiduras del paladar secundario pueden ocurrir como un defecto aislado y se consideran entidades etiológicas diferentes que se clasifican en dos fenotipos: 1) hendiduras labiales con o sin paladar hendido (LPH) y 2) hendiduras palatinas (HP) (Andrew C., 2004). Por la complejidad de las estructuras orofaciales se han desarrollado diferentes clasificaciones de LPH, por ejemplo la propuesta por Kermaham y Stark en 1958 que se muestra en la Tabla I y Figs. 8 y 9.

TABLA 1. CLASIFICACION DEL LPH SEGUN KERMAHAM Y STARK

GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
Hendiduras paladar primario (labio y premaxila)	H. Paladar secundario	H. paladar primario y secundario
a) Unilateral (derecha, izquierda)	a) Total	a) Unilateral (derecho, izquierdo)
• Total		• Total
• Subtotal		• Subtotal
b) Media	b) Subtotal	b) Medio
• Total (premaxila ausente)		• Total
• Subtotal (rudimentaria)		• Subtotal
c) Bilateral	c) Submucoso	c) Bilateral
• Total		• Total
• Subtotal		• Subtotal

(Modificado de Mathes S J., Plastic Surgery 2006).

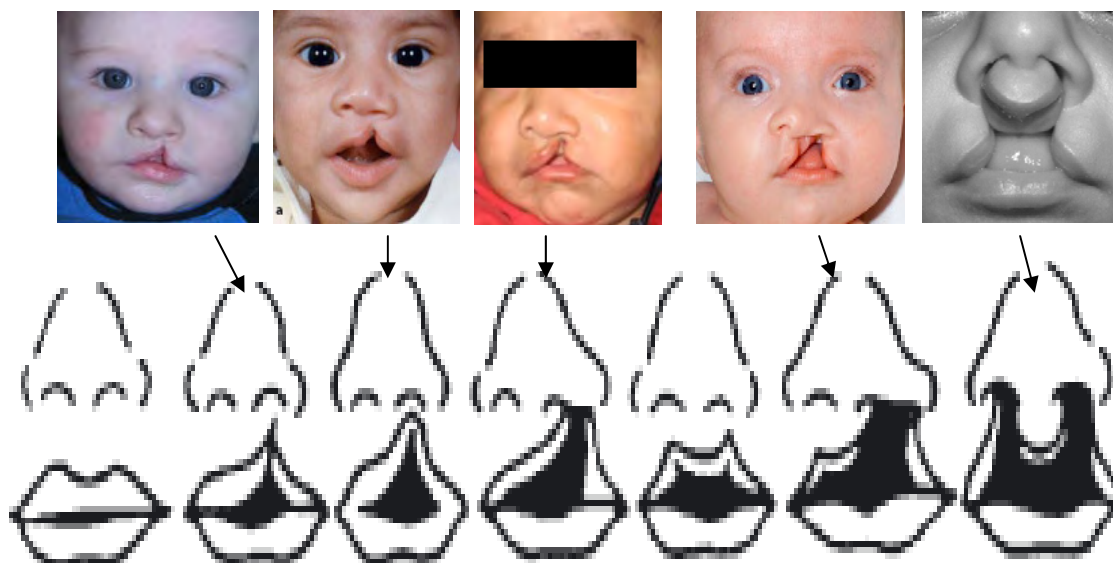


Figura 8.- Se correlaciona la variabilidad de expresión clínica en relación a severidad (forma, tamaño y extensión de las hendiduras del paladar primario) con la clasificación de Kermaham y Stark (Modificado de Seibert R 2000 y con fotos clínicas de pacientes con LPH del HIMFG tomadas con consentimiento informado).

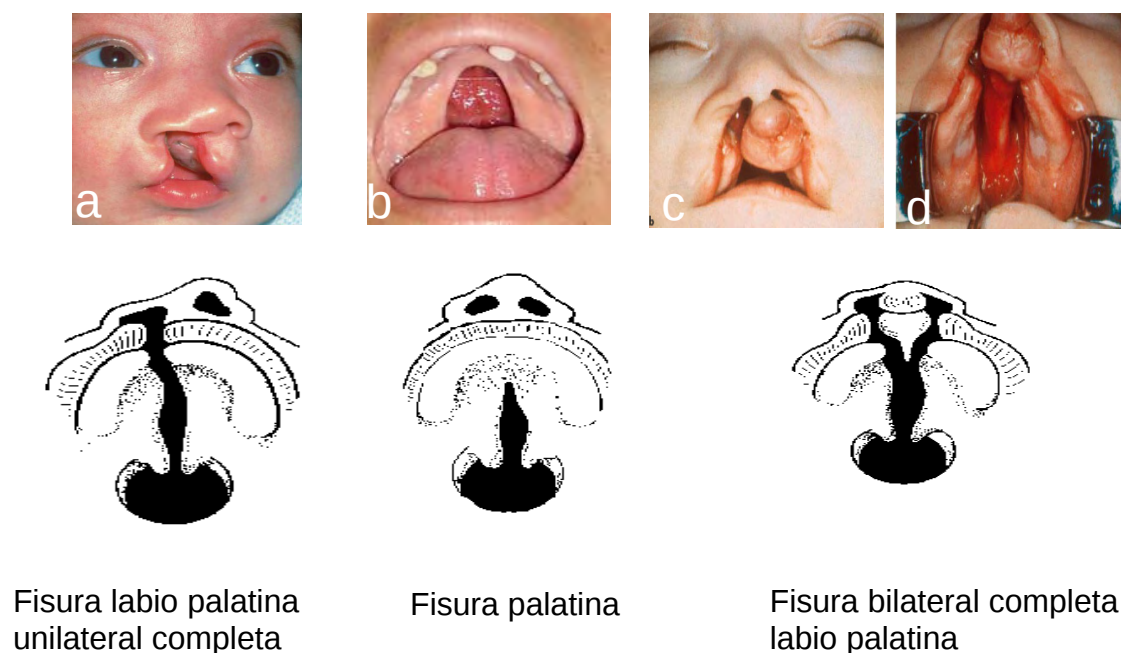


Figura 9.- a) Fisura labio palatina unilateral completa. b) Fisura palatina aislada. c,d) Fisura bilateral completa labio palatina (Modificado McCarthy J.G., 1990).

1.3 ETIOLOGÍA DEL LPH

La etiología del LPH aislado es multifactorial o poligénica por lo que el fenotipo es el resultado de la interacción del efecto acumulado de múltiples genes sumado al efecto de las influencias ambientales y corresponde al 90% de todos los casos de LPH. En el restante 10% de los casos el LPH se asocia a más 400 entidades conocidas entre ellas por ejemplo la trisomía 13 (Ulrich Muller., 2005, OMIM, 2008).

1.3.1 Herencia multifactorial

En la herencia multifactorial intervienen genes predisponentes (como es el caso particular del LPH) cuya acción y número son difícilmente identificables y confieren predisposición genética. En 1965 Falconer propuso el modelo de “umbral o propensión”. Cuando se sobrepasa cierto número de unidades de predisposición o propensión se cruza un “umbral” y los individuos estarán afectados en caso de que se añada un ambiente propicio (Yong ID., 1999). Dentro de los factores ambientales reconocidos se incluyen por ejemplo la hipoxia (por tabaco o altitud), alcohol y talidomida y la deficiencia de ácido fólico, por lo que el medio ambiente y el estado nutricional del feto pueden ser factores en la presentación del LPH (Guizar J., 2000, McInnes R et al., 2004).

La herencia multifactorial toma en cuenta para el asesoramiento genético los siguientes parámetros: 1) *Severidad de la malformación*, 2) *Relación de parentesco con el propositus* ya que el riesgo de recurrencia es mayor entre parientes, así del 20 al 30% de los pacientes con LPH tienen antecedentes heredofamiliares (Pezzetti F. et al., 2004), 3) *Número de individuos afectados en la familia*, 4) *el sexo del propósitus*, en el LPH la relación hombre mujer es de 2:1 y las madres que hayan tenido un hijo afectado tienen de 2 ó 3 veces mayor riesgo de tener otro hijo malformado ya que el umbral es mayor para las mujeres (Young I. D., 1999).

La frecuencia de la malformación congénita varía en las diferentes poblaciones de acuerdo con su carga genética propia y en la Tabla II se muestra los riesgos de recurrencia calculados para el LPH expresados en porcentajes.

TABLA 2. RIESGOS DE RECURRENCIA EN LPH

ESTATUS FAMILIAR	Paciente afectado con LH con o sin PH (%)	Paciente afectado solo con PH (%)
Frecuencia e la población general	0.1	0.04
PADRES NO AFECTADOS		
Con un hijo afectado el riesgo de tener otro niño afectado dependiendo de la circunstancia es:		
Parientes no afectados	4	2
Parientes afectados	4	7
Niño afectado con otra malformación	2	-
Consanguíneos	4	-
Afectado con LPH unilateral	4.2	-
Afectado con LPH bilateral	5.7	-
Un hijo afectado, el riesgo del siguiente embarazo con otra malformación es igual al riesgo de la población general		
Dos afectados, su riesgo para un tercer hijo afectado:	9	1
UNO DE LOS PADRES AFECTADOS		
Riesgo de tener primer hijo afectado	4	6
Un Afectado, su riesgo de tener un segundo hijo afectado	17	15

(Modificado de Fraser FC., 1971; Achauer B., Plastic Sugerí, 2000).

II. ANTECEDENTES

2.1 BASES MOLECULARES DEL LPH

Los procesos frontonasal y maxilar están influenciadas por una variedad de señales que incluyen a los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), la proteína morfogénica del hueso (BMP) y a sonic hedgehog (Shh). Las señales BMP se requieren para estimular la proliferación y crecimiento de los AF. Las proteínas Shh y BMP participan en la formación del labio y paladar primario (McInnes R et al., 2004). El factor de crecimiento transformante β -3 (TGF β -3) participa en la formación del paladar secundario, el factor de transcripción Msx-1 participa en la fusión del labio y paladar (Montenegro MA., 2005). Se conocen al menos 6 genes candidatos implicados en las hendiduras orofaciales aisladas: *TGFA*, *MSX1*, *TGF β -3*, *RARA*, *CLPTM* y *BCL3* (Lidra A.C et al., 2004, Pauws E. et al., 2007), además de los polimorfismos del gen de la metiltetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) que regula el metabolismo de la homocisteína. La deficiencia de folatos (ácido fólico) resulta en niveles elevados de homocisteína en sangre materna lo que tiene un efecto teratogénico potencial en las células de la cresta neural y por consiguiente en la embriogénesis del desarrollo de las estructuras faciales (Tolarova M. et al., 1995; Shashi V. et al., 2001).

Se ha determinado que existe una asociación o predisposición a LPH ante la presencia del polimorfismo *C677T* del gen *MTHFR* la cual es importante para la regulación del metabolismo del ácido fólico ya que la presencia de este polimorfismo lleva a un aumento de los niveles de homocisteína en sangre.

2.2 ÁCIDO FÓLICO

El ácido fólico es conocido también como vitamina B₉, su molécula se compone de ac. glutámico, ac p- aminobenzoico y un núcleo de pteridina. Es soluble en agua y está incluido en el grupo de vitaminas del complejo B. El organismo no lo sintetiza por lo que depende totalmente de su ingesta en los alimentos. Se encuentra en forma natural como poliglutamatos los cuales son convertidos a monoglutamatos por medio de una enzima conjugasa (metil carboxipeptidasa). En las vellosidades intestinales los monoglutamatos son convertidos a tetrahidrofolatos (THF) y dihidrofolatos siendo los THF los compuestos biológicamente activos.

2.3 HOMOCISTEÍNA

La homocisteína es un aminoácido azufrado con un grupo tiol libre que se forma exclusivamente como producto intermediario en el metabolismo de la metionina en su paso a cisteína, vía dependiente de vitaminas como la B₆, B₁₂, y el ácido fólico. El metabolismo de la homocisteína comienza con la ingesta de ácido fólico que es reducido a su forma activa de tetrahidrofolato, se convierte de 5,10 metilentetrahidrofolato a 5-metilentetrahidrofolato por la acción de la enzima MTHFR, éste último paso es vital para el metabolismo de los ácidos nucleicos y por ello también para la división celular. Se llevan al cabo también procesos de **remetilación** por la enzima homocisteína metil transferasa (o metionina sintasa), dependiente de vitamina B₁₂ y de N⁵- metil – tetrahidrofolato, que recicla a la homocisteína a metionina tras sufrir un proceso de metilación (De Luis D.A et al., 2004).

La **transulfuración desmetilación de la homocisteína** implica la acción de enzimas dependientes de B₆ que conducen a la degradación de la homocisteína a cisteína. La cistationina β- sintasa (CBS) se encarga de convertir a la homocisteína en serina para formar cistationina, que por acción de la cistationina liasa es escindida en cisteína y α cetobutirato y puede utilizarse en la síntesis de proteínas o como precursor del antioxidante glutatión. Estos procesos se ilustran en la Fig. 10.

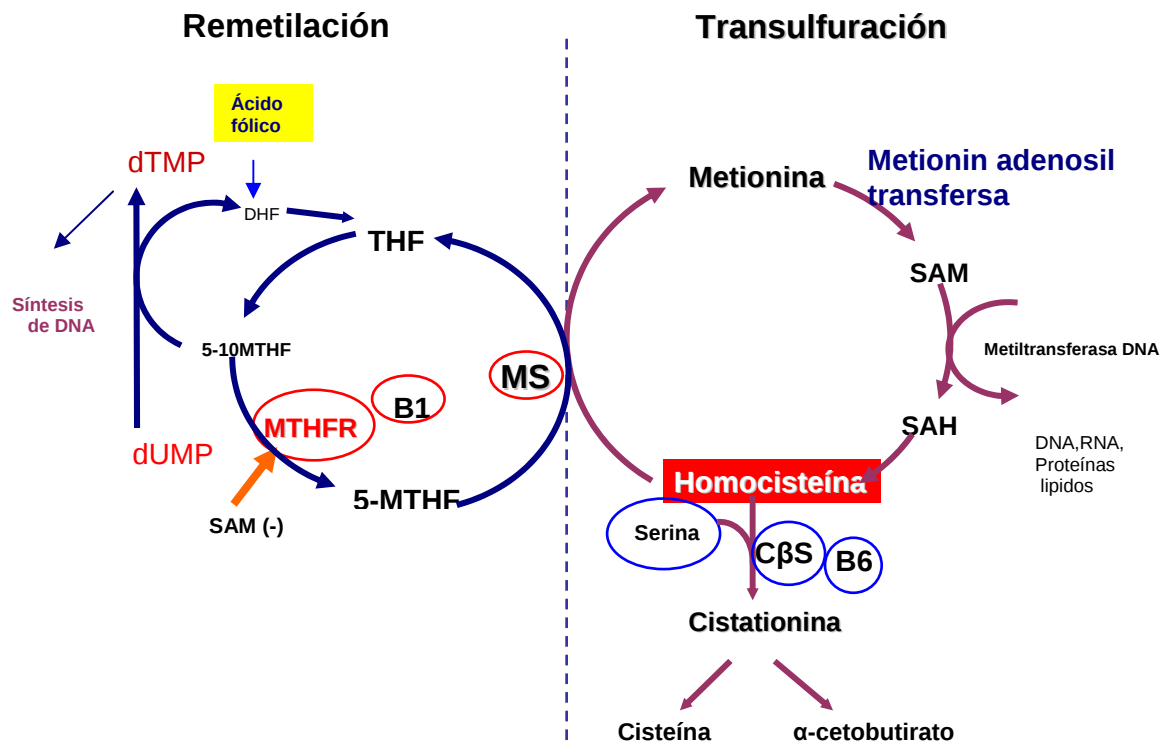


FIGURA 10.- Metabolismo de la homocisteína a través de dos vías: remetilación y transulfuración. Cistationina β sintasa (CBS), 5,10-metilenetetrahydrofolato (5,10-MTHF), metilenetetrahydrofolato reductasa (MTHFR), 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF), metionina sintetasa (MS), S-adenosilmetionina (SAM), tetrahydrofolato (THF) (Modificado de Sánchez Urbina. et al., 2006).

El proceso de transulfuración es irreversible y dirige el catabolismo de la homocisteína hacia su producto final, los sulfatos. Normalmente el 50% de la homocisteína formada se remetila a metionina sin embargo cuando hay un exceso de ingesta proteínica o de metionina, el porcentaje que se cataboliza por la vía de la transulfuración es superior.

2.3.1 El ácido fólico y la metilación del DNA

La metilación del DNA, en particular de las regiones promotoras de genes de expresión constitutiva da como resultado en términos generales la inhibición de expresión génica, por lo que resulta fundamental para el control epigenético de la transcripción, la cual entre otros aspectos interviene en la proliferación y diferenciación celular, la migración, procesos de inducción, crecimiento tisular y maduración así como apoptosis. La S-adenosilhomocisteína es un potente inhibidor de las reacciones catalizadas por metiltransferasas lo que puede ocasionar un mecanismo de toxicidad debido a la hiperhomocisteinemia secundaria a la acumulación de S-adenosilhomocisteína y con ello hipometilación (Medina M.A. et al., 2001).

La S-adenosilmetionina (y la MTHFR) es un donador primario de grupos metilo; el efecto teratogénico del folato sería el resultado de una insuficiencia de ácidos nucleicos necesarios para mantener la rápida división celular del desarrollo embrionario. El ácido fólico no solo mantiene los grupos metilo necesarios, si no que también es uno de los sustratos que dentro del metabolismo de la homocisteína disminuye los niveles de la misma, por lo tanto una disminución de ácido fólico lleva a un aumento de la homocisteína. Lo anterior induciría defectos en la migración de las células de la cresta neural por la inhibición competitiva de los receptores de N-metilo-D-aspartato (NMDA) actuando como un antagonista. Estos receptores ionotrópicos para glutamato son canales iónicos para calcio (Monyer H. et al., 1992). y si bien en edad adulta los receptores se encuentran en altas concentraciones en el encéfalo, participando en la transmisión sináptica, su activación guarda una relación más estrecha con la inducción de diversas formas de plasticidad sináptica (Goodman & Guilman., 2002).

En el desarrollo embrionario los receptores NMDA se encuentran activados en la etapa de cierre de tubo neural o de la migración de las células de la cresta neural siendo el principal regulador de los mecanismos de migración neuronal, adhesión celular, flujo celular de calcio y apoptosis (Komuro H. et al., 1993, Rosenquist T.H. et al., 1999). Se ha demostrado experimentalmente en embriones de pollo que la exposición temprana en el desarrollo embrionario con antagonistas de los receptores de NMDA, provoca malformaciones

craneofaciales y defectos de tubo neural (DTN) (Andaloro et al., 1998). La homocisteína *per se* puede ser un agente teratogénico asociado a la deficiencia de ácido fólico e inducir un desarrollo anormal (Rosenquist T.H., 1999, Marit J et al., 2003).

2.4 POLIMORFISMO C677T DEL GEN *MTHFR*

El gen *MTHFR* está localizado en el cromosoma 1p36.3, está compuesto por 11 exones los cuales tienen una extensión variable entre 102 a 432 pb y 10 intrones (Gollete et al 1994). La región promotora no presenta caja TATA pero contiene islas CpG y varios sitios de unión para SP1 (“*specificity protein 1*”) (Fig.11).

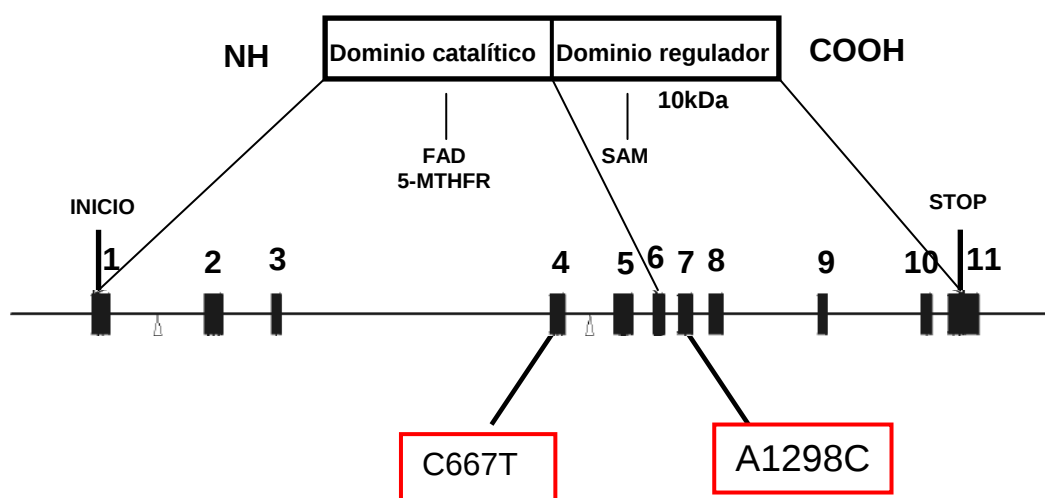


Figura 11.- Esquema que muestra la estructura del gen *MTHFR*. Los rectángulos negros representan los exones, el rectángulo en rojo señala el polimorfismo *C677T* en el exón 4 y el *A1298C* en el exon 7 (Modificado de Gos M. et al., 2002).

La enzima *MTHFR* es un dímero con dos dominios: un amino terminal o catalítico de 40 kDa, y el dominio regulador carboxilo terminal de 37 kDa, al cual se une la adenosil metionina como un importante inhibidor alostérico de la enzima.

En 1995 Frosst et al, identificaron la substitución de *C* por *T* en el nucleótido 677. La transición *C677T* ocasiona un cambio de aminoácido alanina por valina, siendo una mutación de sentido equivocado la cual afecta al dominio catalítico de la enzima creando un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Hinfl*. Una segunda variante, la substitución de adenina por citosina en la posición 1298 da por resultado glutamato en lugar del aminoácido alanina en el dominio regulador de la enzima (Van der Put et al., 1998). En este alelo la mutación está en el exón 7 y suprime un sitio de reconocimiento para la enzima *MboII*.

La homocigocidad para el alelo mutado *C677T* resulta en un enzima termolábil, con disminución en su actividad del 50–60% a 37°C y cercana al 65% a 46°C, comparado con sujetos no homocigotos para este polimorfismo (Botto L.D., 1999). Los individuos homocigotos o heterocigotos presentan niveles elevados de homocisteína en plasma con niveles bajos de folatos (Brouwer I et al., 1999). Se ha reportado que la homocigocidad del alelo *A1298C* induce una disminución en la actividad enzimática del 61% (Shotelersuk V et al., 2004).

Algunos estudios demuestran que los individuos heterocigotos compuestos para los alelos mutados *C677T* y *A1298C*, quienes presentan un genotipo *C677T* / *A1298C* tienen una reducción en la actividad *in vitro* de la MTHFR del 40–50% y un perfil bioquímico similar al observado en individuos con homocigocidad para el alelo *C677T*, con incremento en los niveles de homocisteína y disminución de los niveles de folato (Weisberg et al 1998, Van der Put et al., 1998, Botto L.D., 2000, Guérant R.M., 2006). Uno de los mecanismos por los cuales los niveles bajos de folatos predisponen a algunos sujetos a hendiduras faciales podría ser entonces la presencia del polimorfismo *C667T* en forma homocigota (Shotelersuk V et al., 2003).

La prevalencia del polimorfismo varía dependiendo de la población estudiada, se ha encontrado con mayor frecuencia en población italiana (44%); en hispanos de California (42%) y en 34% en población Japonesa (Botto L.D., et al 1999). En la población mexicana el polimorfismo *C677T* del gen *MTHFR* es el más frecuente ya que en mestizos se presenta entre el 50 y el 58.5% (Davalos I. P. et al., 2000, Mutchinick et al., 1999, González-Herrera et al., 2002). Estudios de la población de Guadalajara, Jalisco, México reportan una frecuencia del 44% y en población de Tarahumaras (Sierra de Chihuahua, México) del 34% (Davalos I. P. et al., 2000, Mutchinick et al., 1999, González-Herrera et al., 2002).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cual es la frecuencia de polimorfismo *C667T* en el gen *MTHFR* en estado homocigoto en un grupo de pacientes mexicanos con labio y/o paladar hendido no sindrómico y en sus madres que fueron atendidos en el HIMFG durante el periodo de 2007 a 2008?.

IV. JUSTIFICACIÓN:

El LPH aislado es una de las causas de consulta más importantes en nuestra Institución y su etiología es compleja al estar involucrados factores tanto genéticos como ambientales. El polimorfismo *C677T* del gen *MTHFR* implicado en el metabolismo de homocisteína se ha relacionado con la presentación de LPH. De acuerdo con la literatura revisada, este estudio no se ha realizado en población mestiza mexicana, de manera específica en pacientes con LPH y sus madres. La identificación del polimorfismo ayudará a evaluar la importancia de este factor genético, estableciendo la frecuencia del mismo en una población mestiza mexicana de pacientes que acuden al HIMFG con LPH lo que nos permitirá apoyar de una manera más completa la realización del asesoramiento genético del paciente y sus familias considerando los factores genéticos y ambientales.

V. OBJETIVO GENERAL

Describir la frecuencia del polimorfismo *C677T* del gen *MTHFR* en una población de pacientes mexicanos con labio y/o paladar hendido no sindrómico y sus madres que acudieron a consulta al HIMFG entre 2007 y 2008.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Establecer la frecuencia de polimorfismo *C677T* del gen *MTHFR* en estado homocigoto en pacientes con LPH y sus madres.
- 2.- Describir y correlacionar el fenotipo observado en los pacientes y la presencia del polimorfismo *C677T* del gen *MTHFR* en sus madres.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Observacional, descriptivo, transversal y prospectivo

Este análisis es parte del protocolo de investigación “Frecuencia del polimorfismo *C667T* del gen *MTHFR* y niveles de homocisteína en pacientes con cardiopatías congénitas y pacientes con labio hendido con o sin paladar hendido no sindrómicas” (HIM-012-2007), el cual fue aprobado por el comité de Investigación, Ética y Bioseguridad de nuestra Institución. Los padres o tutores firmaron una carta de consentimiento informado para participar en el estudio.

6.1.1 Tamaño de la muestra

Se calculó a través de la fórmula $n = (1.96)^2 P^2(1-P) / \delta^2$, dando un número de 92 pacientes. P es una primera aproximación a la proporción de la población que se quiere estimar, una proporción de 0.3 a 0.7. El valor de δ es la discrepancia máxima permisible entre el valor verdadero de P y el que se obtendrá de la muestra 5 al 10%, 1.96 factor que nos asegura que estamos dentro de los límites de error entre el 95% de los casos. Sin embargo para fines de la realización de este protocolo, se decidió usar un tamaño de muestra por conveniencia de por lo menos 30 pacientes mexicanos consecutivos.

VII. CRITERIOS DE SELECCIÓN

7.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes mexicanos en edad pediátrica que acudan al HIMFG con diagnóstico de LPH no sintomático
- Paciente y madre que deseen participar y firmen una carta de consentimiento informado

7.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes con LPH sintomático
- Paciente y sus padres que no deseen participar
- Pacientes transfundidos con sangre venosa total en los 3 meses anteriores al estudio

7.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Muestra insuficiente o inadecuada para análisis

VIII. VARIABLES

8.1 INDEPENDIENTES

El tipo y severidad del LPH en los pacientes estudiados

8.2 DEPENDIENTE

La presencia o ausencia del polimorfismo *C677T* del gen *MTHFR* en los pacientes y sus madres.

IX. PROCEDIMIENTO

9.1 ANÁLISIS CLÍNICO

- Se realizó historia clínica de los pacientes en donde se establecieron los antecedentes heredo familiares, se determinó el tipo de LPH de acuerdo a la clasificación de Kermahan y Stark (2000) y se investigó la ingesta habitual de ácido fólico tres meses antes y durante el embarazo del paciente.

9.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA ANÁLISIS

- Posterior a la firma de consentimiento informado se procedió a la obtención de 3ml de sangre periférica para la extracción de DNA, por venopunción al binomio (madre e hijo), en un tubo con EDTA.
- Se realizó extracción de DNA genómico con el Kit comercial Gentra® como se describe a continuación:
 1. A 300µl de sangre se le añadieron 900µl de solución de lisis RBC (“*red blood cell*”). Se invirtió por 20 segundos e incubó por 1 minuto a temperatura ambiente.
 2. Se centrifugó por 30 segundos a 14,000 revoluciones por minuto (rpm), posteriormente se decantó el sobrenadante para obtener un botón celular
 3. Se agitó con vortex para resuspender el botón y se añadieron 300µl de solución de lisis celular, homogenizando la mezcla.
 4. Posteriormente se agregaron 100µl de solución de precipitación de proteínas al lisado celular, obteniéndose dos fases (DNA en la parte superior y organelos y proteínas en la inferior). Se agitó con vortex y se centrifugó por 60 segundos a 14,000 rpm.
 5. Se retiró el sobrenadante y se colocó en otro tubo, se agregó isopropanol y se invirtió 50 veces, centrifugándose por 60 segundos a 14,000 rpm.
 6. El botón de DNA obtenido se lavó con etanol al 70%, y se centrifugó 60 segundos a 14,000 rpm, se decantó y para eliminar el exceso de etanol se invirtió el tubo y se dejó secar a temperatura ambiente..

7. Se agregaron 100µl de solución de hidratación y se cuantificó en un espectrofotometro, obteniéndose de manera general una concentración entre 16 y 1000ng/µl y niveles de pureza óptimos para el análisis.
8. Se verificó la integridad del DNA genómico mediante el análisis en gel de agarosa al 1% por electroforesis durante 40 minutos a 100 voltios.

9.3 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO C677T DE *MTHFR* POR RFLP

El análisis del polimorfismo se realizó mediante la técnica de fragmentos de restricción de longitud polimorfica (RFLP's), la cual constó de las siguientes etapas:

9.3.1 Análisis por RFLP's

- La región de interés del gen *MTHFR* fue amplificada por técnica de PCR de acuerdo a la técnica modificada y los oligonucleótidos publicados por Frosst P. et al 1995. La obtención del producto esperado de PCR fue confirmado en gel de agarosa al 2% por electroforesis durante una hora a 80 voltios.
- Se realizó restricción enzimática de los productos de PCR con la enzima *HinfI* de acuerdo a las especificaciones del fabricante, a 37⁰C por 3 horas y 30 minutos para establecer la presencia o ausencia del polimorfismo C667T del gen *MTHFR*.
- Los productos de la restricción enzimática fueron visualizados en un gel de agarosa al 3% por electroforesis durante 3 horas a 120 voltios, estableciéndose las frecuencias de pacientes homocigotos y heterocigotos tanto para el alelo silvestre como el alelo con el polimorfismo.
- Para confirmar la presencia del polimorfismo y usar estas muestras como estándar de oro y referencia, se realizó la secuenciación del fragmento de PCT en tres individuos (homocigoto para el alelo silvestre, homocigoto para el alelo con el polimorfismo y heterocigoto) en un equipo ABI 310.

9.3.2 Condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa

Las condiciones recomendadas para la reacción de PCR, para la amplificación del fragmento de interés del gen *MTHFR* fueron las siguientes:

TABLA 3. CONDICIONES PARA LA PCR

REACTIVOS DE LA PCR	Volumen en μl	Conc. Final
Buffer 10X	1	1x
MgCl ₂ (50 mM)	0.5	2.5mM
dNTPs(10mM)	0.2	0.2 Mm
Oligonucleótidos (10pmol/ μl)		
F= 5' TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA 3' N= 23	0.75pm	7.5 pmol
R= 5' GGT GAG AGT GGC GTG GCA GGA 3' N= 21	0.75pm	7.5 pmol
Taq pol.(5U/ μl)	0.2	1 U
MIX	3.4 μl	
DNA		50
VOLUMEN FINAL	10	

Las mezclas anteriores fueron preparadas cada una de las muestras y se amplificaron con las siguientes condiciones:

Un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min.

1.- 95°C por 50 seg	} 30 X
2.- 66°C por 50 seg	
3.- 72°C por 50 seg	

Una extensión final a 72°C por 4 minutos.

9.3.3 Condiciones de la restricción enzimática

Los productos de PCR fueron sometidos a restricción con las siguientes condiciones:

Dilución de *HinfI* (10u / μ l) para obtener una concentración final de 1u/ μ l. se tomaron 7 μ l de enzima y se adicionaron 63 μ l de H₂O lo que fue igual a 1u/ μ l. Se agregaron 70 μ l de Buffer para obtener la mezcla de Buffer/*HinfI* con volumen de 140 μ l. para un total de 70 reacciones, agregándole 210 μ l de agua destilada para obtener un volumen final de 350 μ l (“*master mix*”). De esta mezcla se tomaron 5 μ l para cada reacción.

TABLA 4. Condiciones para la restricción enzimática

Reactivos	Vol. μ l	Concentración. Final
H ₂ O	3	3/ μ l
Buffer 2 (10X)	1	1x
<i>HinfI</i> (10U/ μ l)	1	1u// μ l
Producto PCR	5	5/ μ l
Volumen final		10/μl

9.3.4. Productos esperados de la restricción enzimática

El segmento a analizar incluye parte de la secuencia del exón 4 del gen *MTHFR* el cual contiene un sitio de reconocimiento para la enzima *HinfI*, producto de un cambio de citosina por timina en el codón 677 (*C677T*) lo que se traduce en un cambio de aminoácido de alanina por valina en el aminoácido 222 de la proteína. El tamaño esperado del producto de PCR fue de 198pb de acuerdo a la localización indicada de los oligonucleótidos F (“*foward*”) y R (“*reverse*”), sobre el que se detecta la presencia o ausencia del cambio de base. La enzima de restricción reconoce un sitio de corte 5- G^{∇} ANTC-3', 3- CTNA ∇ G - 5', este corte genera los siguientes fragmentos (Fig.13):

- En un individuo homocigoto **CC** (alelo silvestre) no existe sitio de restricción.
- En un individuo homocigoto **TT** (mutado) se obtendrán dos fragmentos (FRLP) uno de 175pb y otro de 23pb.
- En un individuo heterocigoto **CT** se generan 3 fragmentos de 198pb, 175pb y 23pb.

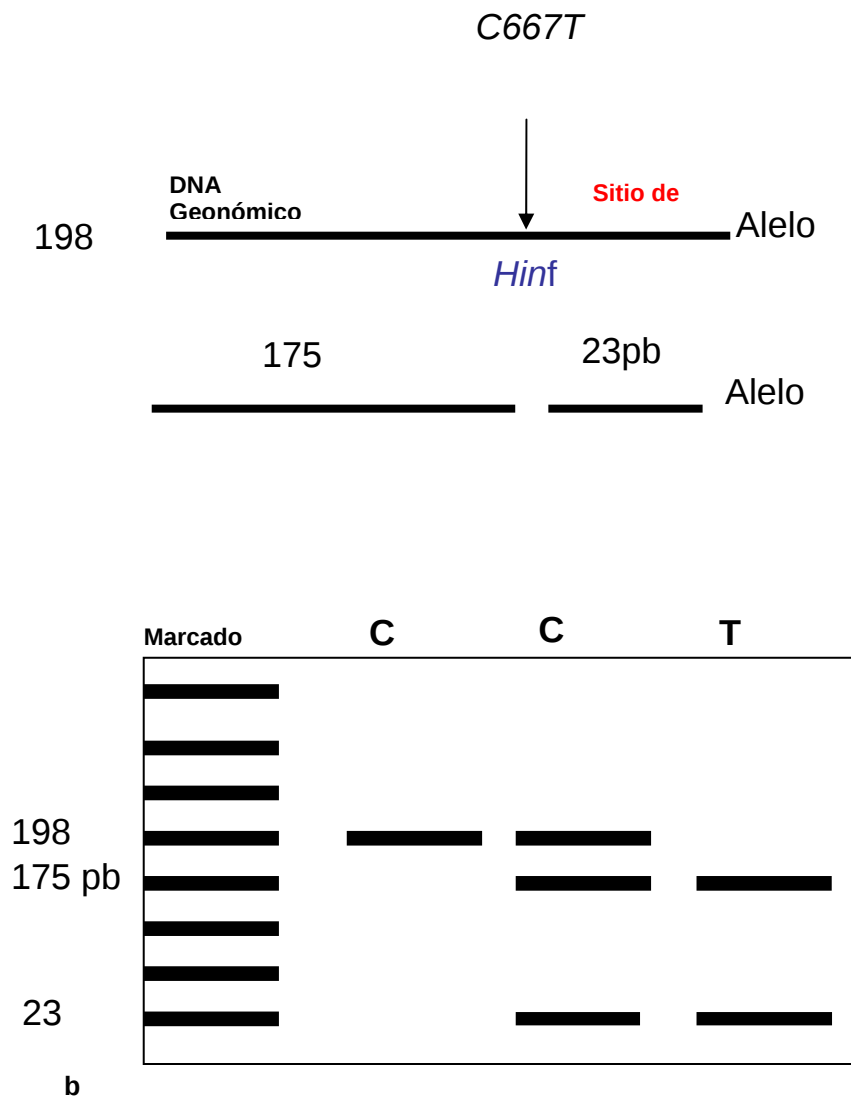


FIGURA 13. Análisis de la restricción enzimática por *HinfI* Fig.13a sitio de corte de la enzima *HinfI* y fragmentos generados. Fig.13b Posibles genotipos generados (CC, CT o TT).

X. RESULTADOS

10.1 RESULTADOS DEL ANÁLISIS CLÍNICO

Se incluyeron un total de 32 pacientes con LPH y sus madres de los cuales 17 fueron masculinos (53.12%) y 15 femeninos (46.8%). La mayor parte de ellos son residentes del Estado de México y del Distrito Federal y solo un caso provenía del estado de Hidalgo. La edad de los pacientes tuvo un rango desde RN hasta los 16 años (Tabla 5).

Tabla 5. Pacientes con LPH por grupo de edad		
EDAD (meses y años)	NO. PACIENTES	PORCENTAJE
<1 mes	2	6.3%
1m-1 a	15	46.80%
2-3 a	4	12.5%
4-5 a	3	9.4%
7-9 a	4	12.5%
10 -16 a	4	12.5%
Total	32	100%

Para su análisis clínico a los pacientes se les dividió en tres grupos:

- 1) Pacientes con labio hendido que correspondió a 5
- 2) Pacientes con LPH unilateral derecho o izquierdo que incluyó a 20
- 3) Pacientes con LPH bilateral que fueron 7 (Gráfica I y Figuras 8 y 14)

GRÁFICA I. Clasificación clínica de los pacientes en porcentajes

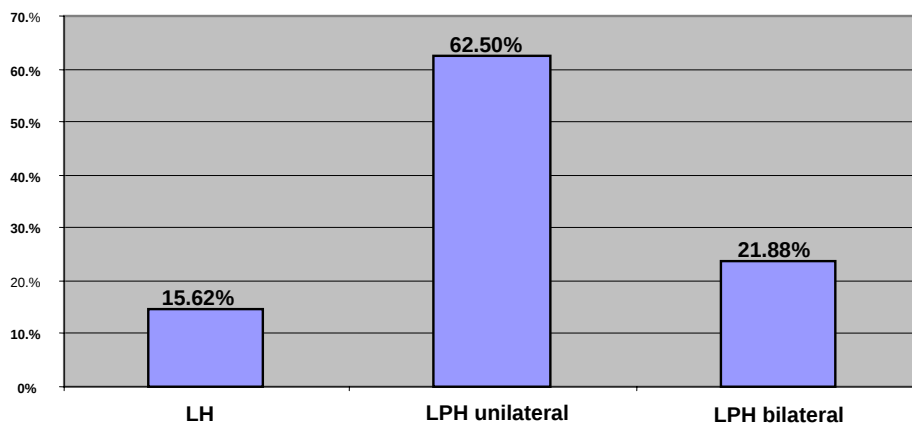


Figura 14. Evaluación clínica de dos pacientes con labio y paladar hendido unilateral izquierdo (Fig.14a) y LPH bilateral (Fig.14b).

Si consideramos a los 5 pacientes del primer grupo que incluye a las hendiduras labiales, 3 de los pacientes eran femeninos y estaban afectados del lado derecho, los otros 2 eran masculinos afectados del lado izquierdo.

En el segundo grupo el LPH se diagnóstico de tipo unilateral en 20 pacientes, de los cuales 14 fueron del lado izquierdo (70%) y 6 del lado derecho (30%), en este grupo hubo mayor proporción de alteración en hombres con 12 casos que en mujeres con 8 casos. El tercer grupo correspondió a 7 pacientes con LPH bilateral estando afectados 3 hombres y 4 mujeres. (Tabla 6).

Tabla 6. LPH UNILATERAL No PACIENTES. TOTAL: 20			
IZQUIERDO: 14 CASOS (70%)		DERECHO: 6 CASOS (30%)	
MASCULINOS	FEMENINOS	MASCULINOS	FEMENINOS
9	5	3	3

Dentro de los antecedentes heredo familiares se encontró que 10 casos de los 32 casos (31.25%) tenían por lo menos un familiar afectado, uno de los propósitos tenía dos familiares afectados (Fig. 15).

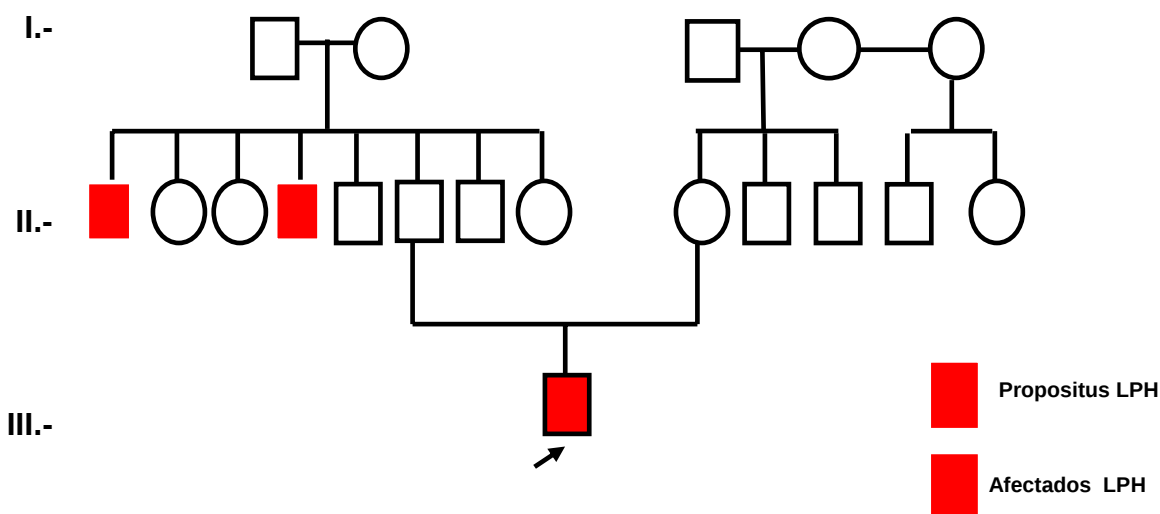


Figura 15.- Se muestra el árbol genealógico de un paciente con LPH y dos familiares afectados

En relación a la ingesta de ácido fólico, 19 de las 32 madres (lo que representa el 59.37% del total) reportaron haberlo tomado durante la gestación, mientras que el 40.62 % refirió no haberlo ingerido. Considerando solamente el grupo de 19 madres que tomaron ácido fólico, 15 lo tomaron durante el primer trimestre del embarazo (78.94%), 3 lo hicieron durante el segundo trimestre (15.78 %) y solo una durante el tercer trimestre (3.12 %) (Fig.16).

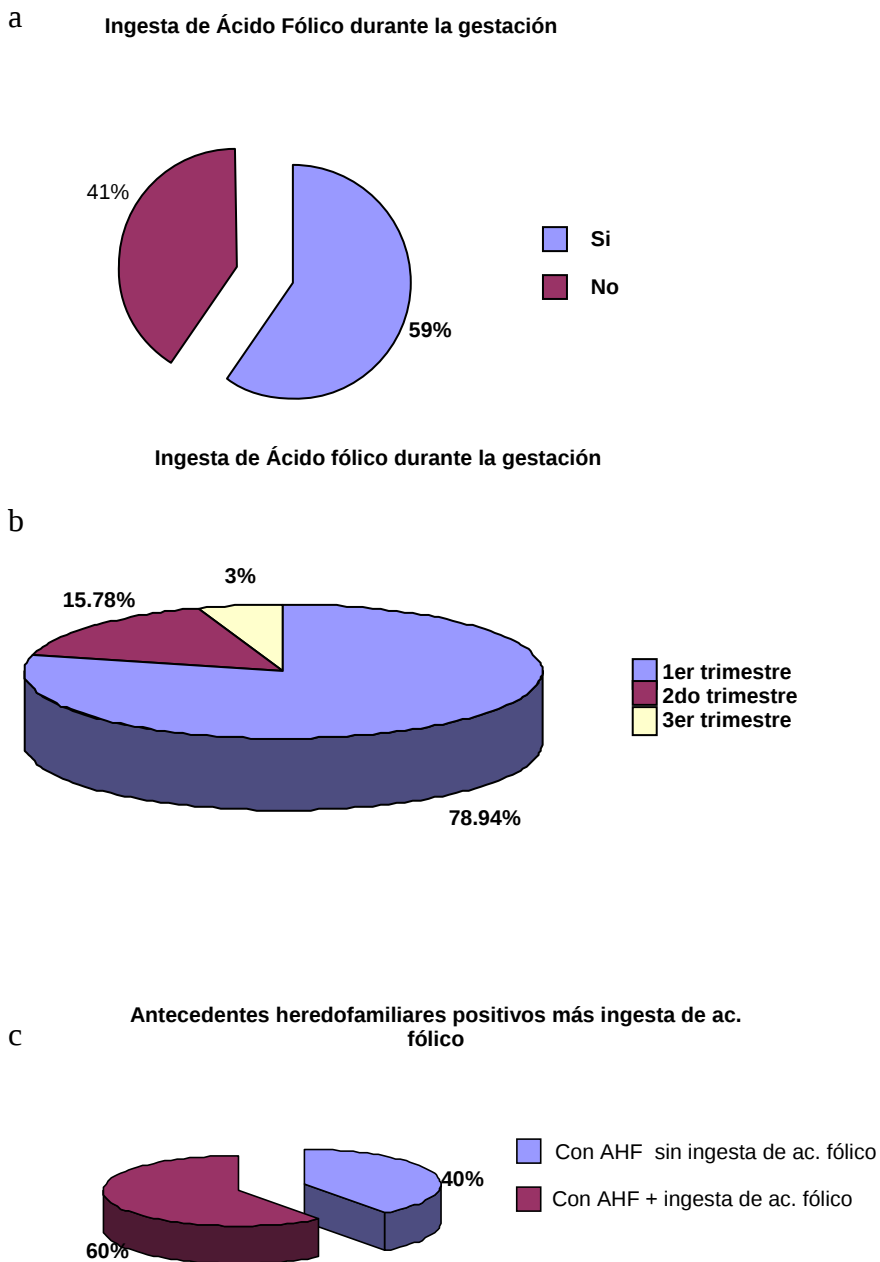


Figura 16. Se muestra la proporción de pacientes que tomaron ácido fólico. Fig.16 a Ingesta de ácido fólico durante el embarazo. Fig.16 b Ingesta de ácido fólico en relación a los trimestres. Fig.16 c. Ingesta de ácido fólico en pacientes con antecedentes heredofamiliares.

10.2 RESULTADOS DE ANÁLISIS MOLECULAR

Se obtuvo muestra de los 32 binomios (madre-hijo) lo que representó un total de 64 muestras para análisis. De acuerdo con lo descrito en la sección de material y métodos se extrajo DNA de las 64 muestras, el cual fue analizado en gel de agarosa y cuantificado por espectrofotómetro (Figura 17 y Tabla 7).

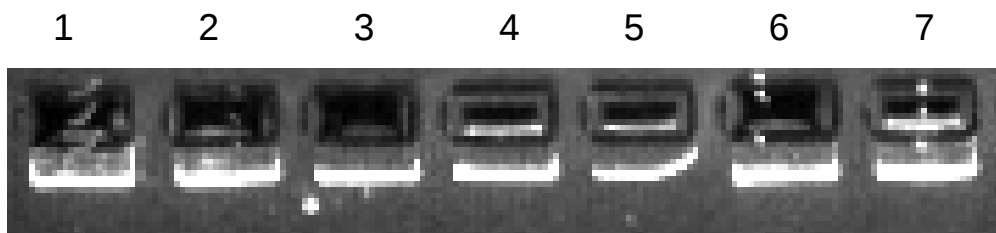


Figura 17. Gel de agarosa al 1% sometido a electroforesis durante 40 minutos a 100 voltios, en los carriles 1 a 7 se demuestra la integridad del DNA:

Tabla 7. Cuantificación de DNA				
Muestra (carril)		ng/μl	260/280 λ	260/230 λ
1	11ALPH	1060,96	1,90	2,10
2	12ALPH	592,43	1,89	2,04
3	14ALPH	565,63	1,90	1,91
4	17BLPH	825,60	1,89	1,98
5	18ALPH	904,38	1,89	2,26
6	36BLPH	684,08	1,89	1,85
7	37ALPH	539,82	1,85	1,93

Tabla 7.- Se demuestra el análisis de concentración de DNA de 7 muestras.

A continuación se realizó amplificación del producto de PCR obteniéndose en todos los casos el fragmento esperado de 198pb, en la Fig.18 se muestra un gel representativo.

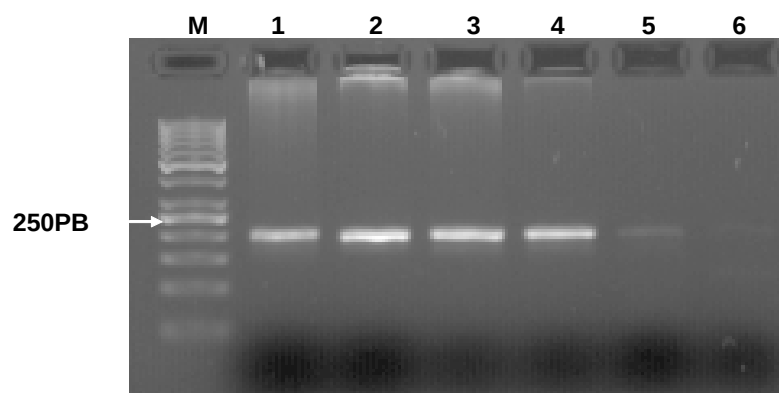


Figura 18. Gel de agarosa al 2% sometido a electroforesis durante 60 min. a 80 voltios. Se muestra en los carriles M se observa el marcador de peso molecular de 50pb en los carriles de 1 a 5 se observa el producto de PCR esperado de 198pb en el carril 6 se observa un control negativo.. En la parte inferior se identifica en la tabla el número de muestra

Carril	Muestra
M	Marcador de 50 Pares de Bases
1	Producto de PCR de 198 pares de bases de la muestra 8A
2	Producto de PCR de 198 pares de bases de la muestra 8B
3	Producto de PCR de 198 pares de bases de la muestra 20B
4	Producto de PCR de 198 pares de bases de la muestra 17B
5	Producto de PCR de 198 pares de bases de la muestra 30B
6	Se observa el control negativo.

Después de la PCR se realizó restricción enzimática de los productos. En las Figuras. 19 A y B se muestra una imagen representativa de nuestros resultados.

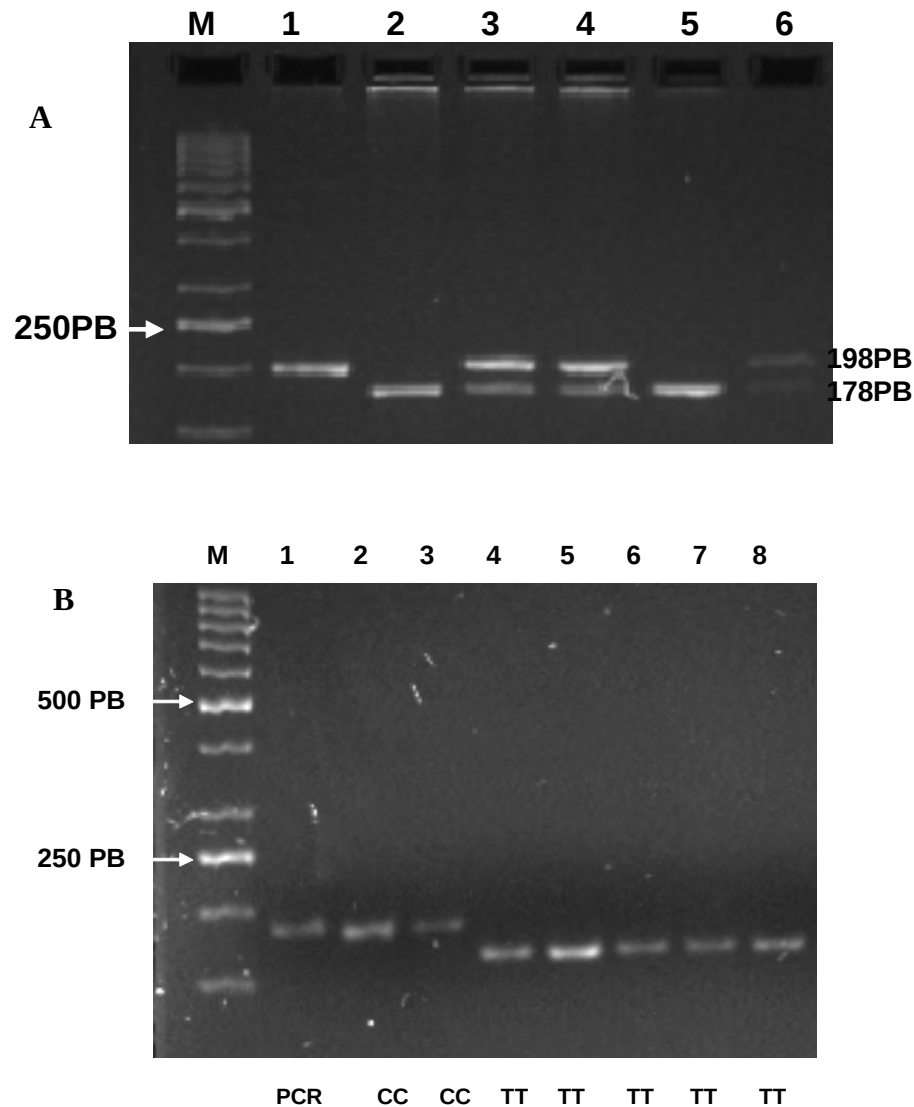


Figura 19.- Se muestran dos imágenes representativas de geles de agarosa con los resultados de los productos de restricción enzimática. Fig.19 A. Gel de agarosa. El carril M contiene al marcador de peso molecular de 50pb, en el carril 1 se observa el producto de PCR sin restricción utilizado como control negativo. En el carril 2 y 5 se observa un fragmento de 178pb que corresponde a los homocigotos para T. finalmente en los carriles 3, 4 y 6 se observan dos bandas una la primera de 198pb una segunda de 178pb que pertenecen a los individuos heterocigotos (C/T). Fig.19 B. Gel de agarosa. El carril M contiene al marcador de peso molecular de 50pb, en el carril 1 se observa el producto de PCR sin restricción utilizado como control negativo. En el carril 2 y 3 se observa un fragmento de 198pb que corresponde a los homocigotos para C de las muestras y en los carriles 4 a 8 se observan una banda de 178pb perteneciente a los individuos homocigotos para T.

Para confirmar que el producto de PCR corresponde a la región de interés se secuenciaron tres muestras de pacientes: un homocigoto CC, homocigoto TT y un heterocigoto, se identificó la región de corte de la enzima *HinfI* y posteriormente se utilizaron como controles tipo “estandar de oro” para las reacciones de restricción enzimática.

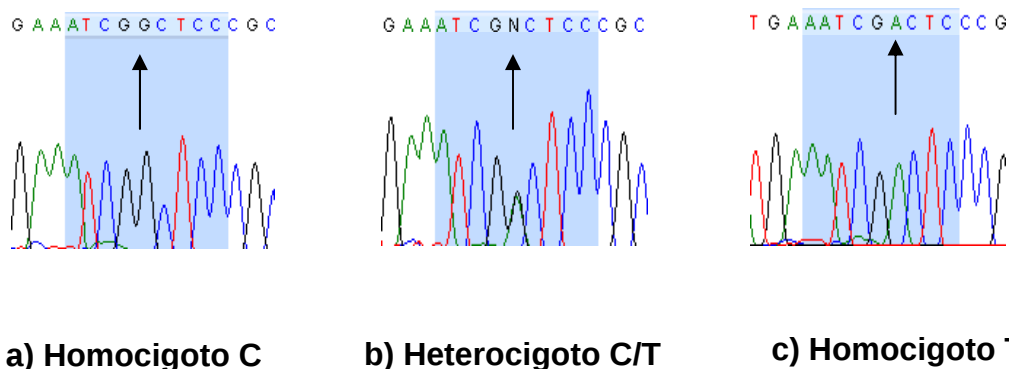


Figura 20.- Electroferogramas correspondientes a los tres posibles genotipos del polimorfismo del gen *MTHFR*. La flecha señala el sitio de cambio de la secuencia, las cuales corresponden al oligonucleótido R.

Los genotipos de los 32 pacientes y sus madres fueron analizados y clasificados en los 3 grupos mencionados, los resultados fueron concentrados en la siguiente tabla (Tabla 8).

Como se observa, en el grupo de los pacientes el genotipo más numeroso con 16 casos (50%) fue el heterocigoto CT, el segundo con 14 (43.75%) correspondió al genotipo TT que es homocigoto para el alelo mutado y finalmente solo 2 casos (6.25%) para el homocigoto para el alelo silvestre CC.

El análisis de genotipos en el grupo de madres se determinó que el TT se presentó en 15 casos (46.87%), el CT con 14 casos (43.75%) y 3 casos se encontraron para el homocigoto CC.

TABLA 8.- Porcentaje por genotipos para pacientes y sus madres.

PACIENTE			MADRE				
GENOTIPO	NUM	%/32	GENOTIPO	NUM	%/32	NUM	%
CT	16	50	CT	14	43.75	30	46.88
TT	14	43.75	TT	15	46.87	29	45.31
CC	2	6.25	CC	3	9.37	5	7.81
TOTAL	32	100		32	100	32	100

En la correlación entre el tipo de LPH y el genotipo de las madres se encontró que en el grupo con el fenotipo de labio hendido (5 pacientes), 3 fueron homocigotos para TT y 2 fueron heterocigotos CT, todas las madres de este grupo fueron heterocigotos CT.

En el grupo de LPH que incluyó a 20 pacientes se encontró que las madres fueron 9 homocigotas TT (45%), 9 heterocigotas (45%) y 2 homocigotas CC (10%). En este grupo hubo 4 binomios madre-hijo homocigotos para TT (20%).

En el grupo de LPH bilateral se encontraron 7 pacientes de los cuales sus madres fueron 2 heterocigotas y 5 homocigotas TT. Hubo 5 binomios madres hijo en que ambos fueron homocigotos TT. Los resultados anteriores se muestran en la tabla 9.

TABLA 9. Correlación de fenotipos de LPH con el genotipo en el grupo de pacientes y sus madres.

LABIO HENDIDO					LPH				LPH BILATERAL			
		GENOTIPO					GENOTIPO				GENOTIPO	
NO	MUESTRA	SEXO	HIJO	MAMA	MUESTRA	SEXO	HIJO	MAMA	MUESTRA	SEXO	HIJO	MAMA
1	17 A,B	F	TT	CT	1 A,B	F	TT	TT	2 A,B	F	CT	CT
2	24 A,B	M	TT	CT	3 A,B	F	CT	TT	14 A,B	F	TT	TT
3	26 A,B	M	TT	CT	5 A,B	M	CT	TT	16 A,B	F	TT	TT
4	30 A,B	F	CT	CT	6 A,B	F	CT	CT	21 A,B	M	CT	CT
5	32 A,B	F	CT	CT	8 A,B	M	TT	CT	34 A,B	F	TT	TT
6					9 A,B	M	TT	TT	36 A,B	M	TT	TT
7					10 A, B	M	CT	CT	37 A,B	M	TT	TT
8					11 A,B	F	CT	TT				
9					12 A,B	M	TT	TT				
10					13 A,B	F	CT	CC				
11					18 A,B	F	CT	CC				
12					19 A,B	M	TT	TT				
13					20 A,B	M	CT	CT				
14					22 A,B	M	CT	CT				
15					25 A,B	F	CT	CT				
16					28 A,B	F	CT	TT				
17					29 A,B	F	CT	CT				
18					31 A,B	M	CC	CT				
19					33 A,B	F	CC	CC				
20					35 A,B	M	TT	TT				

XI. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizó a un grupo de pacientes con LPH y a sus madres con el objetivo de establecer la frecuencia del polimorfismo *C677T* en estado homocigoto y realizar la correlación clínica por lo que fueron divididos en 3 grupos. Se incluyó un total de 32 pacientes y sus madres (binomio madre-hijo) que acudieron a evaluación en 2007 y 2008 a los departamentos de Genética y Cirugía Plástica del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

El grupo etario más frecuente independientemente del sexo, fue de menos de 1 a 12 meses, esta situación está en congruencia con el tipo de patología y su severidad, ya que por los problemas de alimentación que estos niños presentan se busca atención médica de manera más temprana y se procura evitar complicaciones que van desde el bajo peso hasta la desnutrición, así como asesoramiento sobre técnicas de alimentación. Este punto es importante ya que la corrección de la malformación no se llevará al cabo hasta que las condiciones generales del paciente, incluyendo su peso, sean las adecuadas para la cirugía.

En cuanto al lugar de origen solamente un paciente tenía su residencia fuera del D.F. y área metropolitana (estado de Hidalgo), esta situación refleja por una parte el hecho de que nuestro Hospital es un centro de referencia para manejo de esta patología y por otra, se manifiesta el área de influencia que tiene el HIMFG la cual sabemos que además se extiende hacia el área central y sur del país. Un dato que llama la atención si bien el tamaño de la muestra es pequeño, es que ya que el LPH tiene una herencia multifactorial en la que se ha considerado por ejemplo la altitud como factor de influencia, la mayoría de los casos provienen de la Cd. de México la cual tiene una altitud sobre el nivel del mar cercana a los 2500m, este factor ha sido propuesto en el caso de otras malformaciones que se presentan frecuentemente en nuestra población como por ejemplo la microtia-atresia. El factor de altitud podría también impactar el hecho de que el LPH corresponda al 1.23% del total de consulta de nuestro Hospital.

Dentro de los antecedentes heredofamiliares el 31% de los pacientes tuvo familiares afectados por esta patología. En la literatura médica se reporta que de un 20 al 30% de los pacientes tienen antecedentes heredofamiliares positivos, dato que concuerda con lo encontrado en nuestro estudio. Esta circunstancia es importante para el otorgar el asesoramiento genético ya que el riesgo de recurrencia se calcula entre otros elementos, si hay más afectados en la familia y su relación de parentesco con el propósitos (Pezzetti F. et al., 2004).

En relación a la ingesta de ácido fólico llama la atención de que a pesar de las campañas nacionales de salud, solamente 19 de 32 madres lo ingirieron durante la gestación lo que representa el 59.37 % y de estas 4 lo hicieron después del periodo recomendado que incluye el primer trimestre. Dentro de los afectados con LPH que tenían AHF positivos solamente el 40% de las madres ingirieron ácido fólico durante el primer trimestre además, si consideramos que se recomiendan dosis de aproximadamente 6mg diarios para evitar la recurrencia este aspecto tampoco fue cubierto ya que las madres de los afectados ingirieron la dosis habitual sugerida (400 microgramos) por lo que en este sentido tanto se cumplió con la dosis terapéutica para reducir el riesgo de recurrencia de LPH (Czeizel A.E. et al.,1999).

Si considerados a los pacientes estudiados como un solo grupo de 32 individuos con LPH, se encontró una frecuencia ligeramente mayor de varones afectados que de mujeres afectadas (17:15). Sin embargo las diferentes clasificaciones toman en cuenta para determinar la frecuencia por género el tipo de LPH siendo dividido en PH, LH y LPH unilateral/bilateral.

Los pacientes fueron clasificados en tres grupos clínicos: LH, LPH unilateral (derecho o izquierdo) y LPH bilateral. En este estudio se encontró que el mayor porcentaje de pacientes tuvo LPH unilateral (62.5%), seguido por el LPH bilateral (21.88%) y del LH (15.62%) lo que concuerda con la literatura ya que se reporta una mayor incidencia para LPH incluyendo al bilateral. En este estudio no se incluyeron pacientes con PH aislado por lo que no podemos determinar si esta presentación clínica es más o menos frecuente que lo reportado en otras poblaciones.

Tomados como grupo, los pacientes que presentaron labio hendido estuvieron afectados en una proporción prácticamente similar ya que de los 5 casos, las 3 mujeres tuvieron LH derecho y los 2 varones LH izquierdo, el grupo bajo estudio es pequeño pero la literatura reporta que tomado en conjunto el LH con o sin PH es más frecuente en los varones y del lado izquierdo (Steavenson R.E., 1993).

Si se toman estos datos en conjunto con el LPH, en este estudio hubo 25 varones afectados del lado izquierdo lo que concuerda con la literatura.

En este estudio se identificaron 7 pacientes con LPH bilateral (21.87% del total) de los cuales fueron 3 hombres y 4 mujeres. En este estudio fue menos frecuente el LPH bilateral que el LPH unilateral y su frecuencia fue muy similar al del LH (5 casos o 15.62%), la literatura reporta una frecuencia mayor de LPH unilateral que de bilateral.

En lo referente al análisis molecular del polimorfismo *C667T* del gen *MTHFR*, fue posible analizar tanto a los pacientes como a sus madres y considerar el binomio madre-hijo. Encontramos que en el grupo de pacientes hubo una mayor frecuencia de heterocigotos CT (50%) y homocigotos TT (43.75%) y el menor porcentaje correspondió al homocigoto CC (6.25%). El alelo silvestre es el C, el alelo mutado T se ha reportado que confiere una menor actividad enzimática a la *MTHFR* y es uno de los factores que se ha considerado en la etiología del LPH (además de estudios que lo han relacionado con los defectos de tubo neural).

En relación al grupo de madres, el genotipo TT fue el más frecuentemente encontrado con un 46.87% comparado con el CC que fue del 9,37% y del CT del 43.75%.

Si se considera la correlación de fenotipo con genotipo, la presentación clínica más severa correspondió al LPH bilateral en donde hubo 5 de 7 casos (71.42%) de binomio madre-hijo ambos homocigotos TT. Este dato aunque interesante, no puede considerarse como el factor etiológico de mayor peso, en primer lugar porque la herencia es multifactorial y en segundo porque en el grupo de LPH unilateral si bien fue el más frecuente, hubo 4 binomios madre-hijo homocigotos TT (20%).

En estudios similares realizados por Reutter H et al, 2008, en una población cetroeuropea de 181 pacientes para determinar si el alelo *C677T* era un factor significativo en la etiología del LPH, su estudio de desequilibrio de transmisión no confirmó como lo habían presentado estudios previos, una asociación con la presentación del LPH. Tampoco fue significativo en su estudio el uso de ácido fólico, lo que llevó a estos autores a concluir que la presencia del polimorfismo no hace una contribución mayor a la ocurrencia del LPH en población centro europea.

En estudios realizados por Mutchinick et al, la frecuencia reportada del polimorfismo *C677T* en población general mexicana es de 58.5% y es mayor que en otras poblaciones estudiadas, por ejemplo población europea es del 12 al 15% siendo en Italia hasta del 44% y en japoneses del 34%, lo que podría explicar que en nuestros 32 pacientes y en sus madres haya una alta frecuencia del alelo *T* porque en general es más frecuente en nuestra población la frecuencia del polimorfismo. Con base a los datos previos, se complementara el asesoramiento genético.

BIBLIOGRAFÍA

A.L.M. Iris, Van Rooij, Vermeij-Keers Christl, Does the interaction Between maternal Folate intake and the methylentetrahydrofolate reductase polymorphisms affect the Risk of Cleft lip with or without Cleft Palate? *American Journal Of Epidemiology*, 2003., 157:583-591.

Brandalize A.P.C. Bandinellie. Borba J.D. Polimorphisms in genes MTHFR, MTH and MTRR are not risk Factor For cleft lip/palate in South Brazil. *Brazilian Journal Of medical And Biological Research*, 2007.,40:787:791.

Botto L.D., Khoury M.J., Mulinare J., Erickson J.D., Periconceptional Multivitamin Use and the Occurrence of Conotruncal Heart Defects: Results From a Population-based, Case-Control Study, *Pediatrics*, 1996.,98:911-917.

Boot Mari J., Steengers-Theunissen Regine, Poelmann Robert E. Folic acid And Homocysteine Affect Neural Crest And Neuroepithelial cell Outgrowth and Differentiation in Vitro. *Developmental Dynamics*, 2003.,227:301:308.

Brauer Phillips, Rosenquist Tomas. Effects of elevated Homocysteine On Cardial Neural Crest Migration In Vitro. *Developmental Dynamics*, 2002.,224:222-230.

Boyles Abee, Allen J. Wilcox, Jack A. Taylor. Folate and one-carbon Metabolism Gene Polymorphisms and Their Associations with Oral Facial Cleft. *American Journals of Medical Genetics*, 2008.,146 440-449.

Botto Nicoletta, Andreassi Maria, Manfredi Samantha. Genetic Polimorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA Damage. *European Journal Of Human Genetics*,2003.,11:671-678.

Brouwer Ingerborg A., Marijke Van Dusseldorp, Chris M.G. Thomas. Low Dose Folic Acid Supplementation Decreases Plasma Homocysteine Concentrations a Randomized Trial. *American Journal Clinical Nutrition*, 1999.,69:99-104

Botto Lorenzo D. And Quanhe Yang. 5,10 methylentetrahydrofolate reductase gene Variants and Congenital Anomalies: A HuGe Review. *American Journal Of Epidemiology*, 2000.,151(9):872-877.

Czeizel Andrew E., Laszlo Timar. Dose depend Effect of Folic Acid on the Prevention of Orofacial Clefts *Pediatrics*,1999.,104:1-7.

Davalos R. I. P., Olivares P., Castillo M. T., Cantú J. M., Ibarra B., Moran M. C., Gallegos M. p., Chakraborty R., Rivas F., The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Ann de Genet*, 2002.,43: 89-92.

De Luis D.E., Fernández N., Aller R. Homocisteína, metabolismo y determinantes Higiénico Dietéticos. *Endocrinología Nutrición*, 2004.,51:458-463.

Duque Osorio Juan fernando, Crestas Neurales Placodas y arcos Branquiales: Una Revisión Evolutiva y Embriología de Datos Básicos Y Recientes. *Revista Académica Colombiana*, 2003.,27:291-307.

Frosst P. Blom H.J., Milos R. A candidate Genetic Risk Factor for Vascular disease: A Common Mutation Methylenetetrahydrofolate reductasa. *Nature Genetics*, 1995.,10:111-113.

Gallegos Rivas. Romeo Gutierrez Gustavo, Pèrez Lòpez Marina. Defectos congénitos Mayores en Neonatos de Mujeres Atendidas en Un hospital de Tercer Nivel, *Ginecología Y Obstetricia México*, 2007.,75:247-252.

García Suárez I. Gómez Cerezo, Rios Blanco J.J. La homocisteína. *El factor de riesgo Cardiovascular del Próximo Milenio. Anales de Medicina Interna*, 2001.,18:211-217.

González-Herrera L., García-Escalante G., Castillo-Zapata I., Canto-Herrera J., Pinto-Escalante D., Díaz-Rubio F., Del Angel R.M., Orozco-Orozco L., ,Frecuency of thermolabile variant defects in the State of Yucatan, México. *Clinical Genetic*,2002.,62:394-398.

Guérant Rodriguez Rosa María,Guérant Jean Louis, Debard Renée. Prevalence of Methylenetetrahydrofolate reductasa 677T and 1298C alleles and Folate status: a comparative study in Mexican, West African and European populations. *American Journal Clinical Nutrition*, 2006.,70:707

Goodman & Guillian A., Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 10 edición, Ed. Mc Graw Hill, Interamericana, S.A. de C.V., 2003:

Krapels Ingrid P.C., A.L.M. Iris Rooij Van. Maternal nutritional status and The Risk of Orofacial cleft offspring in Human. *The journal of nutrition*. 2004.,134:3106-3113.

Komuro H., Rakic P., Modulation of Neural Migration by NMDA Receptors, *Science*, 1993., 260: 95-97

Lamers Yvonne, Prinz-Langenohl Reinhild, Moser Rudolph et al. Supplementation With (6.S)-5-methyl tetrahydrofolate or folic acid equally reduces plasma total homocysteine concentrations in healthy woman. *American Journal Clinical Nutrition*, 2004.,79:473-478.

Lidral Andreu C., Murray Jeffrey C. Genetics Approach To Identify Disease Gens For Birth Defects With Lip/Palate as a Model. *Birth Defects Researchs*,2004.,70:893-901.

McCarthy Joseph G. Cleft Lip And Palate and Craniofacial Anomalias. Introduction to Facial Clefts. *Plastic Surgery* Edit. Sunders, 1990., 2437-2447.

McCarthy Joseph G. Cleft Lip And Palate and Craneofacial Anomalias. Embriogenesis of Cleft lip and Palate *Plastic Surgery* Edit. Sunders 1990 Vol.4 2515-2551.

Mathes Stephen J. Embriology Clasificacions, and descriptions of Craneofacial Cleft. *Plastic Surgery* Edit. Elservier 2006 Vol.6 15-43

Mathes Stephen J. Varieties, and of primary labial Cleft. *Plastic Surgery* Edit. Elservier 2006 Vol.6. 45-67.

Mills James L., Peadar Kirke, Anne M. Molloy. Methylenetetrahydrofolate reductasa termolabile Variant and Oral Cleft. *American Journal Medical Genetics*, 1999.,86:71-74

Moore K. L., Embriología Clínica, 4a.edición, Ed. Interamericna, Canadá, 2000;314-348, 187-194.

Montenegro M. A. Rojas M. Aspectos Moleculares En La Formación De La Cara y El Paladar. *Journal Morphology* 2005.,23:185-190.

Medina Miguel A. Urdiales José L. Amores Sánchez. Roles Of Homocysteine in Cell Metabolism. *European Journal Biochemist* ,2001.,268:3871-3872.

M.J. Nathalie. Van Der Put, Henny W.M. Folate, Hocysteine and neural Tube Defects An Overview. *Exp. Biol. Med*, 2001.,226: 243-270.

Mclnnes Roderick R., Michaud Jacques. Developmental Biology : Frontiers For Clinical Genetics. *Clinical Genetics*, 2004.,65:163-176

Mutchinick O.M., López M.A., Luna L., Waxman J., Babinsky V.E., RYVEMCE collaborative Group., Hig Prevalence of the Thermolabile Metylenetetrahydrofolate Reductase Variant in México: A: Country with a Very High Prevalence of Neural Tube Defects. *Molecular Genetic Metabolism*, 1999.,68: 461-467.

Oneida A Arosarena, MD. Cleft Lip and Palate. *Otolaryngol Clin N Am*,2007 (40):27-67.

Pezzetti F, M. Martinelli, L. Scapoli, F. Carinci, A. Palmieri¹, 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, *Human Mutation*,2004.

Principales causas de Malformaciones Congénitas. Departamento de Bioestadística y Archivo Clínico Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

P.C Ingrid, Gerhard A., et. Al. Periconceptional Health and Lifestyle factors on both parents affects the risk of live born Children with Orofacial Clefts. *Birth Defects Research*, 2006.,76:613-620.

Rosenquist T.H., Tatashak S. A., Selhub J., Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: Effect of folic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci*,1996.,93:1527-15232.

Rosenquist T.H., Schneider A.M., Monachan D.T., N-methyl-D-aspartate receptor agonists modulate homocysteine-induced developmental abnormalities, *FASEB* 1999.,13:1523-1531.

Sánchez Urbina Rocío, Galaviz Hernández Carlos, Sierra Ramírez Alfredo. Trascendencia de los Factores Ambientales y Genéticos en las Cardiopatías Congénitas: el caso de la enzima MTHFR *Perinatology Reproduction Human*, 2006.,20:39-47.

Scriver C. R., Beaudet A.L., William S.S., Valle D., The Metabolic & Molecular Bases Inherited Disease, eighth edition, McGraw-Hill, 2001, pag. 3897-3933.

Shotelersuk VC. Siriwan P. Maternal 677CT/1298AC genotype of the MTHFR gene as a Risk Factor of cleft lip. *Journal Medical Genetics*, 2003.,40:1-4.

Steavenson Roger E., Hall Judith G., Goodman R.M., Human Malformations and Related Anomalies. Oxford, 1993. Vol II. pag. 367-81.

Trigos Micoló Ignacio, Guzmán María Eugenia, Análisis de La Incidencia Prevalencia Y atención de Labio y paladar Hendido en México. *Cirugía Plástica*, 2003.,13:35-39.

Tolarova Marie, Harris John Reduced recurrence Of Orofacial Cleft After Periconceptional Supplementation With High Dose Folic Acid And Multivitaminic. *Teratology* ,1995;51:71-78.

Ulrich Müller. Craniofacial Abnormalities: Molecular Basis. *Enyclopedia of life sciences*. 2005.,1-5.

Verkleik Hagoort Ana, Bliet Johannes Tabatabael Sayed Fakhreadin. Hyperhomocystinemia and MTHFR Polymorphisms in Association with Orofacial Cleft and Congenital Heart defects. *American Journal of Medical Genetics*, 2007.,143:952-960.

Wilcox Allen J. Rolv Terje Lie, Kari Solvoll et. al. Folic Acid supplements An Risk Of Facial Clefts: National Population Based Case Control Study. *British Medical Journal*, 2007.,334-464.

http://www.med.unc.edu/embryo_images/unit_welcome/welcome_https/contents.htm