



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
SECRETARIA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

**ESTUDIO DE ASOCIACION DE LABIO Y PALADAR
HENDIDO CON POLIMORFISMOS EN EL GEN *MTHFR*
EN PACIENTES MEXICANOS**

TESIS

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALISTA EN GENETICA MEDICA

PRESENTA

DRA. BERNARDETTE ESTANDIA ORTEGA

TUTOR DE TESIS

DR. MIGUEL ANGEL ALCANTARA ORTIGOZA

COTUTOR

DRA. ARIADNA ESTELA GONZALEZ DEL ANGEL



MEXICO, D.F

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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).

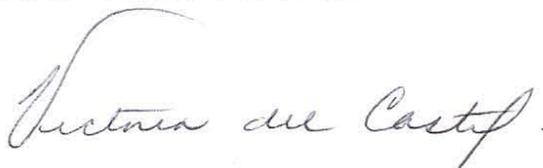
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

**ESTUDIO DE ASOCIACION DE LABIO Y PALADAR HENDIDO CON
POLIMORFISMOS EN EL GEN *MTHFR* EN PACIENTES MEXICANOS**

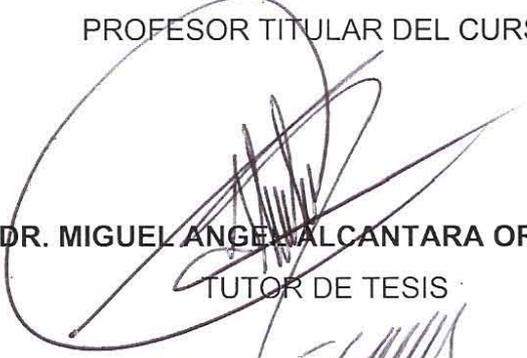


DR. JOSE REYNES MANZUR
DIRECTOR DE ENSEÑANZA

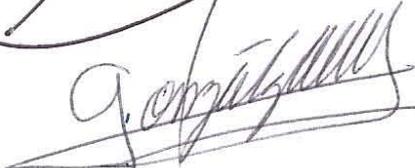
DRA. MIRELLA VAZQUEZ RIVERA
JEFE DE DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO



DRA. VICTORIA DEL CASTILLO RUIZ
PROFESOR TITULAR DEL CURSO



DR. MIGUEL ANGEL ALCANTARA ORTIGOZA
TUTOR DE TESIS



DRA. ARIADNA ESTELA GONZALEZ DEL ANGEL
COTUTOR DE TESIS

AGRADECIMIENTOS

A Jerry, mi esposo, por creer en mí y estar a mi lado siempre

A Regina y Emiliano, mi hijos, por ser mi inspiración día a día

A mi mamá por su amor incondicional en todo momento a lo largo de mi vida

Al Dr. Guillermo Sólon, mi papá, por enseñarme el camino a seguir

A mi hermana Bárbara por hacerme reír hasta en los momentos más difíciles

A la familia Díaz Padilla- Estandía por su apoyo y cariño tan especial

A Ben y Ash por caminar de la mano conmigo a lo largo de esta gran experiencia

A Paola, Mariana, Rosa, David, Karla, Alma, Vianney, Liliana y Ximena porque juntos vivimos una etapa maravillosa durante la residencia

A la Dra. Ariadna González del Angel y al Dr. Miguel Angel Alcántara Ortigoza por confiar en mi, contribuir de manera muy importante en mi desarrollo profesional, brindarme su apoyo y por ser un placer trabajar a su lado

A mis maestros por transmitirme su valiosa experiencia y conocimiento

Al Dr. José A. Velázquez Aragón por su enorme ayuda y amable disposición durante la elaboración de este proyecto

A la Biol. Matilde Bailon Giron y al Q. Mario A. Díaz Morales por su invaluable colaboración durante la toma de las muestras y su procesamiento en el Laboratorio de Biología Molecular

Al Dr. Gerardo Fernández Sobrino y al Dr. Alejandro Muñoz Paz por abrirnos la puerta de la consulta externa de Cirugía Plástica y Ortodoncia, respectivamente, para la captación de pacientes con LPHA

A la Dra. Sandra Villagómez Martínez por permitirnos la captación de controles en la Unidad de Apoyo a la Investigación Clínica del INP

INDICE

RESUMEN ESTRUCTURADO.....	1
ANTECEDENTES Y MARCO TEORICO.....	3
• EMBRIOLOGIA.....	3
• DEFINICION.....	3
• EPIDEMIOLOGIA.....	3
• ETIOPATOGENIA.....	5
• CUADRO CLINICO.....	25
• DIAGNOSTICO.....	26
• PRONOSTICO Y TRATAMIENTO.....	26
• PREVENCION.....	27
JUSTIFICACION.....	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
OBJETIVOS.....	30
HIPOTESIS.....	31
MATERIAL Y METODO.....	31
• TIPO DE ESTUDIO.....	31
• CARACTERISTICAS DEL ESTUDIO.....	31
• CRITERIOS DE INCLUSION.....	31
• CRITERIOS DE EXCLUSION.....	31
• DEFINICIONES OPERACIONALES.....	32
• TAMAÑO DE MUESTRA.....	33
• CAPTACION DE CASOS Y CONTROLES.....	34
• BANCO DE DNA.....	35
• GENOTIPIFICACION.....	35
• CONSIDERACIONES ETICAS.....	38
RESULTADOS.....	38
DISCUSION.....	56
CONCLUSIONES.....	69
ANEXOS.....	72
BIBLIOGRAFIA.....	81

ESTUDIO DE ASOCIACION DE LABIO Y PALADAR HENDIDO CON POLIMORFISMOS EN EL GEN *MTHFR* EN PACIENTES MEXICANOS

COAUTORES: Dra. Bernardette Estandía Ortega (Médico Residente de Genética Médica), Dra. Ariadna González del Angel (Subdirectora de Investigación Médica, Médico Genetista Adscrito al Laboratorio de Biología Molecular), Dr. Miguel Angel Alcántara Ortigoza (Jefe del Laboratorio de Biología Molecular, Investigador en Ciencias), Dr. José Alberto Velázquez Aragón (Investigador en Ciencias, Laboratorio de Biología Molecular), Dr. Carlos Sabas Cruz Fuentes (Investigador en Ciencias, Instituto Nacional de Psiquiatría), Dra. Sandra Villagómez Martínez (Investigadora en Ciencias, Unidad de Apoyo a la Investigación Clínica), Q. Mario Alberto Diaz Morales (Laboratorio de Biología Molecular).

RESUMEN ESTRUCTURADO

ANTECEDENTES Y MARCO TEORICO. El labio con o sin paladar hendido es un defecto congénito originado por una falla en la fusión de las prominencias fronto-nasal y maxilares entre la 4^o y 12^o semanas de la gestación. El 70% de los casos de labio paladar hendido son aislados (LPHA) y es una de las malformaciones congénitas más frecuentes, siendo su incidencia en México de 1/1000 recién nacidos vivos. El diagnóstico es clínico y se requiere de un manejo multidisciplinario a largo plazo. La etiología del LPHA es multifactorial, caracterizada por el efecto pequeño pero aditivo de factores genéticos y ambientales como la ingesta de alcohol, tabaco y ciertos fármacos por la madre durante el primer trimestre del embarazo, así como la falta de consumo periconcepcional de ácido fólico. Uno de los genes candidatos asociados a LPHA es el gen *MTHFR* que codifica para la enzima 5-10 metilentetrahidrofolato reductasa, la cual participa en el metabolismo de los folatos. Este gen presenta dos polimorfismos, c.677C>T y c.1298A>C, que confieren termolabilidad a la enzima. La variante génica c.677C>T es más frecuente en la población mexicana que en otras poblaciones. En estudios de asociación de LPHA con los polimorfismos c.677C>T y c.1298A>C y/o con los factores ambientales se ha demostrado que el consumo de ácido fólico periconcepcional disminuye el riesgo para presentar LPHA; sin embargo, la asociación de este defecto con el genotipo de *MTHFR* ha sido controversial.

JUSTIFICACION. Las malformaciones congénitas son una línea prioritaria de investigación en el Sector Salud. Es importante entender la etiología de LPHA debido a su alta incidencia en la población mexicana y mortalidad en los niños menores de 1 año. Además tiene un gran impacto en la calidad de vida del paciente y requiere de manejo multidisciplinario a largo plazo. Así mismo es preciso conocer el comportamiento de los polimorfismos c.677C>T y c.1298A>C en el gen *MTHFR* en la población mexicana dado que aún no se conoce con certeza.

OBJETIVOS. Establecer asociaciones entre la presencia de LPHA y las variantes polimórficas c.677C>T y c.1298A>C en el gen *MTHFR* en población mexicana, así como asociaciones entre LPHA con los factores genéticos y/o ambientales.

MATERIAL Y METODO. Se estudiaron 132 casos con LPHA y 369 controles en el Instituto Nacional de Pediatría. Los casos fueron seleccionados por un genetista a

través del servicio de Genética, Cirugía Plástica Reconstructiva y Ortodoncia y, los controles en la Unidad de Apoyo a la Investigación Clínica. Previo consentimiento informado se aplicó un cuestionario sobre antecedentes familiares de LPHA, consumo de ácido fólico y exposición a teratógenos durante la gestación. Se tomó muestra sanguínea (casos) y de mucosa oral (controles) para extraer el DNA. La genotipificación de las variantes alélicas c.677C>T y c.1298A>C del gen *MTHFR* se realizó por PCR-RFLP. Se determinó la frecuencia alélica y genotípica y, se analizó la asociación de LPHA con los factores genéticos y/o ambientales.

RESULTADOS Y DISCUSION. El consumo de ácido fólico en ambos grupos fue subóptimo, siendo menor en las madres de los casos (46.5% vs 74.5%). El OR para LPHA con consumo de ácido fólico (análisis de consumo pre, peri y postconcepcional en conjunto) fue de 0.29 (0.19-0.44), lo que sugiere que la ingesta de ácido fólico disminuye el riesgo de presentar el defecto. En las madres de los casos se reportó una mayor exposición a tabaco (8.3% vs 7.5%) y a alcohol (9% vs 6.7%) durante el primer trimestre del embarazo; aunque el OR para LPHA ante la exposición de estos dos teratógenos no fue estadísticamente significativo. En esta población las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos c.677C>T y c.1298A>C en el gen *MTHFR* fueron muy similares a las reportadas previamente en población mexicana. Al ser menor la frecuencia del alelo 677T en los casos (51%) que en los controles (62%) pareciera que en esta población la presencia del alelo 677T disminuye el riesgo para presentar LPHA, lo que difiere con la mayoría de los estudios de asociación de LPHA y c.677C>T en donde no se observa que el alelo 677T aumente o disminuya el riesgo para el defecto. Se observó que el alelo 677T en estado homocigoto OR 0.39 (0.23-0.68) disminuye más el riesgo para presentar LPHA que en estado heterocigoto OR 0.46 (0.27-0.77). Al igual que en otras poblaciones, no se encontró asociación entre la presencia de uno o dos alelos 1298C y LPHA. El riesgo para LPHA disminuye con el consumo de ácido fólico y el genotipo con uno o dos alelos 677T o 1298C en esta población de estudio. Se requiere continuar este análisis con un tamaño de muestra mayor para determinar si nuestras observaciones de asociación persisten. Se debe aumentar la difusión en la población de la ingesta preconcepcional de ácido fólico como medida de prevención para presentar LPHA.

ESTUDIO DE ASOCIACION DE LABIO Y PALADAR HENDIDO CON POLIMORFISMOS EN EL GEN *MTHFR* EN PACIENTES MEXICANOS

1. ANTECEDENTES Y MARCO TEORICO

EMBRIOLOGIA

Después de la concepción, una cascada de procesos coordinados que incluyen migración celular, crecimiento, diferenciación y apoptosis, da lugar al desarrollo de las estructuras craneofaciales a partir de la membrana orofaríngea (Jugessur and Murray 2005). La cavidad oral se forma mediante modificación del ectodermo hacia la 4^o semana de gestación y la formación de los labios ocurre hacia la 6^o semana de gestación por la fusión de las prominencias fronto-nasal, maxilares y mandibulares. La separación de las cavidades nasal y oral por el paladar duro o primario (porción anterior) y el paladar blando o secundario (porción posterior) se lleva a cabo entre la 6^o y la 12^o semanas de gestación (Lettieri 1993).

DEFINICION

El labio con o sin paladar hendido (LPH) es un defecto congénito originado por una falla en la fusión de las prominencias fronto-nasal y maxilares entre la 4^o y 12^o semanas de la gestación. Clínicamente se observa como una hendidura a lo largo del filtrum entre la región lateral y premaxilar del labio superior con aplanamiento alar de la nariz ipsilateral al defecto y una desviación del septum nasal hacia el lado contrario (Jones 2006). Puede acompañarse de una falta de cierre parcial o total del paladar. El labio hendido central es menos frecuente que el lateral y la presencia de labio hendido inferior es muy rara (Lettieri 1993).

EPIDEMIOLOGIA

El 70% de los casos de LPH son aislados, es decir, ocurren como una condición única que no está asociada con otra anomalía reconocible; mientras que el 30% de los casos son sindrómicos ya que presentan alteraciones en el desarrollo y/o anomalías estructurales en otras regiones diferentes de la región orofacial (Stainer

and Moore 2004). Cuando el labio hendido se presenta junto con paladar hendido aumenta el riesgo 2 o más veces de asociarse con otra anomalía (Lettieri 1993).

El labio hendido con o sin paladar hendido aislado (LPHA) es una de las malformaciones congénitas más frecuentes. Su frecuencia varía desde 1/500 hasta 1/2500 nacimientos, dependiendo del origen geográfico (Vanderas 1987) o racial (Croen 1998). En México se ha determinado la incidencia de labio paladar hendido entre 1 y 1.1 casos por cada 1000 recién nacidos vivos (Pérez-Molina, et al. 1993; Blanco-Davila 2003).

Entre el 60% y 80% de los casos de LPHA son varones (Thompson 2004), el labio hendido unilateral es el doble de frecuente que el bilateral y dos tercios de los defectos unilaterales se presentan en el lado izquierdo (Jones 2006).

TABLA 1. ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS DEL LPHA (Jones 2006)

Prevalencia	Variable, por lo general se considera 1/1000 rnv
Variación geográfica	Alta prevalencia en aborígenes australianos, Canadá y en Lejano Oriente. Baja prevalencia en Europa Meridional y África.
Diferencias raciales étnicas	o En general poblaciones de origen asiático presentan frecuencias mayores que los caucásicos, quienes presentan frecuencias mayores que los africanos.
Diferencias por género	M/F 2:1
Lateralidad	Dos tercios de los defectos unilaterales ocurren en el lado izquierdo
Tendencias temporales	La frecuencia se mantiene estable a través del tiempo
Edad materna	No tiene efecto en los casos aislados
Peso al nacimiento	Generalmente normal, puede observarse peso al nacer por debajo de la media.
Edad gestacional	Sin evidencia de mayor prematurez en los casos.
Gemelos	Gemelos monocigotos presentan concordancia de 6-19 veces mayor que gemelos dicigotos. En gemelos dicigotos la concordancia es la misma que entre hermanos.
Patrones familiares	Con antecedentes familiares 15-25%. Recurrencia en hermanos 3-5%

El grado de severidad en la presentación clínica de LPHA puede variar enormemente, desde labio hendido unilateral hasta labio bilateral con paladar y alveolo hendido. Los estudios que han distinguido labio paladar hendido del paladar hendido solo (PHS), reportan al LPHA con una frecuencia del doble con respecto al PHS (Jensen, 1998).

ETIOPATOGENIA

En cuanto a la patogénesis de las hendiduras orofaciales pueden ser clasificadas como malformaciones, deformaciones, disrupciones o displasias, siendo la gran mayoría malformaciones (Lettieri 1993). Embriológicamente, un defecto severo en el labio puede causar una hendidura en el paladar duro dando lugar a labio y paladar hendido, por lo tanto, el labio hendido solo o con paladar hendido son manifestaciones de la misma entidad con diferente grado de severidad. Por otro lado, la presencia de paladar hendido aislado se debe a una falla en la fusión palatina independiente de la región del labio. Con base en lo anterior, se considera que el labio paladar hendido es una entidad epidemiológica y etiológica diferente del paladar hendido solo (Stainer and Moore 2004).

Se sabe que la etiología del LPHA es compleja, con un tipo de herencia multifactorial. Durante los últimos 30 años el modelo del “umbral multifactorial” se ha aceptado ampliamente para explicar la agregación familiar de los defectos orofaciales. Este modelo asume que la posibilidad de presentar una malformación congénita como lo es el LPHA está determinada por el efecto pequeño pero aditivo de muchos factores genéticos y ambientales. De acuerdo con este modelo, el fenotipo con la malformación se presenta cuando se excede un umbral, convirtiendo la posibilidad continua de presentar un defecto específico en una expresión de la malformación del “todo o nada” (Fraser 1970).

Factores ambientales

La falta de una completa concordancia entre gemelos monocigotos y la variación de la incidencia entre grupos sociales, étnicos y geográficos apoyan la contribución de los factores ambientales en la etiología del LPHA (Sprintz, 2001). El ambiente intrauterino en el que se desarrolla el embrión está determinado por el genotipo de la madre así como por otros factores maternos (Zhu, Kartiko and Finnell 2009), tales como:

1. *Tabaquismo*. El tabaquismo durante el embarazo causa hipoxia en el embrión y se ha asociado con una incidencia incrementada de LPHA (Cobourne 2004). En

un meta-análisis que analiza 24 estudios (15 casos y controles y 9 cohortes) se estimó que las madres que fuman durante el primer trimestre del embarazo tienen un RR de 1.34 (CI 95%: 1.25-1.44) de tener un hijo con labio hendido con o sin paladar hendido (Little, Cardy and Munger 2004) (Figura 1).

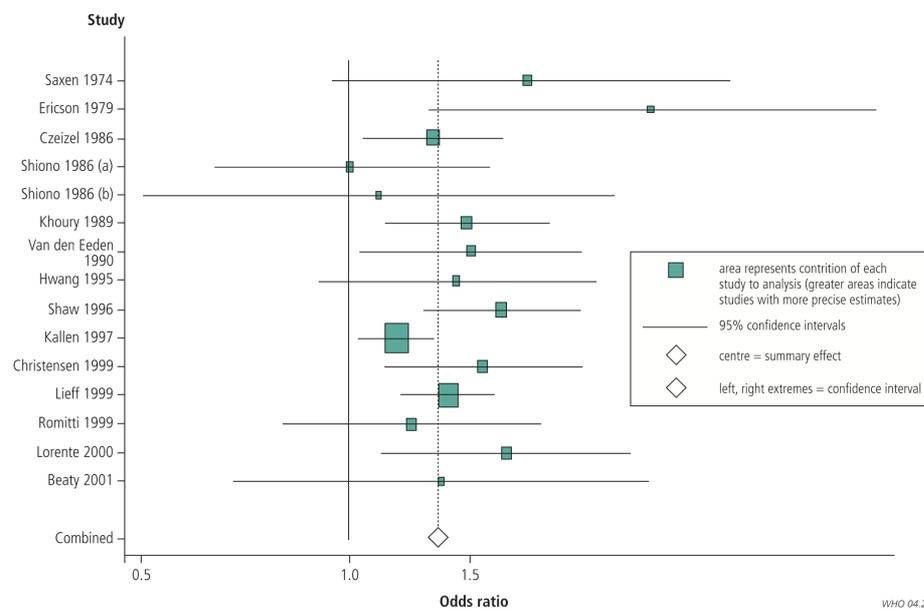


Figura 1. Meta-análisis (Little, Cardy and Munger 2004): RR para LPHA en los hijos de las mujeres que fumaron durante el embarazo.

En un estudio de casos y controles realizado posteriormente se observó un efecto dosis-respuesta del tabaquismo para LPHA durante el primer trimestre del embarazo con un OR de 1.6 (CI 95%: 1.0-2.5) en tabaquismo pasivo (convivencia con un fumador a 2m de distancia durante 2h al día) y un OR de 1.9 (CI 95%: 0.9-4.0) en madres que fumaron más de 10 cigarrillos al día (Lie, et al. 2008).

2. **Alcoholismo.** En modelos animales se ha demostrado que la exposición a alcohol durante la gestación ocasiona disrupción en la formación de la cresta neural craneal que contribuye al desarrollo facial (Cartwright and Smith 1995; Kotch and Sulik 1992; Chen, Yang, et al. 1996; Chen and Sulik 1996; Leite & Koifman, 2009). Se ha propuesto que el alcohol es un antagonista del ácido

fólico (Keyon, Nicolau and Gibbons 1998) y se ha sugerido que la ingestión de alcohol por la madre durante el inicio del embarazo sin el consumo de multivitamínicos en periodo periconcepcional resulta en un riesgo mayor de LPHA en sus hijos (Romitti, et al. 2007). DeRoo, et al. (2008) obtuvieron un OR de 2.2 (1.1-4.2) para LPHA en madres que consumieron alcohol durante el primer trimestre del embarazo de manera considerable (5 o más bebidas por ocasión). En un estudio de 274 casos y 548 controles realizado en Brasil para identificar la asociación entre la ingesta del alcohol durante el primer trimestre del embarazo y la presencia de hendiduras orofaciales, se obtuvo para LPHA un OR de 2.08 (1.27-3.41) si existe consumo materno de este teratógeno durante el inicio de la gestación (Leite and Koifman 2009). Aproximadamente 1 de cada 30 mujeres embarazadas suele abusar del consumo de alcohol y alrededor del 6% de ellas tiene descendencia con Síndrome de Alcohol Fetal o FAS (Gorlin, Cohen and Hennekam 2001) dentro del cual puede presentarse LPH (Jones 2006).

3. *Fármacos*. Se ha reportado que el consumo durante el primer trimestre del embarazo de agentes anticonvulsivantes como ácido valproico, fenitoína, primidona y trimetadiona, así como la administración de antagonistas de ácido fólico, isotretinoína y corticoesteroides aumentan el riesgo de labio paladar hendido en el producto (Jones 2006). El 6% de los hijos de mujeres que toman anticonvulsivantes presentan malformaciones al nacimiento como hendiduras faciales; Dean, et al. (1999) en 57 casos con sus progenitores y 152 controles, observaron que el polimorfismo c.677C>T en *MTHFR* presente en las madres que tomaron valproato o carbamacepina durante el embarazo aumenta el riesgo de Síndrome por Exposición Fetal a Anticonvulsivantes con un OR de 3.3 (1.29 – 8.36) al tener el alelo 677T en estado homocigoto y de 2.1 (0.97– 4.57) con presencia de uno o dos alelos 677T. De acuerdo al North American AED Pregnancy Registry de 684 mujeres que consumieron lamotrigina durante su embarazo, 5 de ellas tuvieron hijos con alguna hendidura orofacial (1 LH, 1 LPH, 3 PHS); el riesgo relativo para labio hendido aislado fue de 5.8 (0.8-41.1) y para LPHA fue de 6.0 (0.9–42.8) (Holmes, et al. 2008). En el estudio de casos y controles realizado por Pradat, et al. 2003 utilizando la base de datos MADRE, que incluye 11,150 niños con malformaciones, se encontró asociación entre la exposición a corticoesteroides durante el primer trimestre del embarazo (Pradat, et al. 2003) y la ocurrencia de LPHA (OR 2.59; 95% CI, 1.18–5.67). En Hungría se realizó un estudio de casos (1,374) y controles (38,151) para determinar la asociación entre LPHA y la ingesta de fármacos durante el primer trimestre del

embarazo, se identificó un riesgo elevado para LPHA en los hijos de aquellas madres que consumieron durante los primeros meses de la gestación fenitoína (OR 3.0, 1.5-5.8), oxprenolol (OR 4.2, 1.8-10.0), aminofenazona (OR 1.7, 1.2-2.4), amoxicilina (OR 15.9, 4.9-51.2), diazepam (OR 1.7, 1.3-2.3), fenobarbital (OR 2.1, 1.2-3.8) y tietilperacina (OR 1.7, 1.1-2.5) (Puhó, et al. 2007).

4. *Altitud.* Se sugiere que la hipoxia debida a la altitud durante el embarazo pudiera estar asociada con un aumento en la incidencia de defectos congénitos, entre ellos LPH (Castilla, Lopez-Camelo and Campaña 1999).
5. *Fiebre.* La regulación de la temperatura corporal permite que se lleven a cabo procesos biológicos como proliferación, diferenciación, migración y maduración en el organismo, por lo que la pérdida de la homeotermia puede resultar en alteración y disrupción del metabolismo, desnaturalización proteica y muerte celular (Goldstein, et al. 2003). Estudios realizados en animales y humanos durante los últimos 50 años han aportado evidencia del efecto teratogénico que tiene el incremento de $>1.5^{\circ}$ C en la temperatura corporal materna durante el embarazo. En un estudio multicéntrico de casos y controles se observó un incremento en el riesgo de LPHA (OR 1.28 CI 1.01-1.63) en mujeres que cursaron con fiebre durante los primeros 2 meses de embarazo. El riesgo fue mayor en las madres que no tomaron antipiréticos, lo cual sugiere que un adecuado control de la temperatura durante el inicio del embarazo puede disminuir los efectos deletéreos de la fiebre sobre el producto (Hashmi, et al. 2010).
6. *Acido fólico.* El folato es un donador de carbono involucrado en la biosíntesis de purinas y pirimidinas como en la remetilación de homocisteína produciendo grupos metilo para la metilación del DNA, proteínas y lípidos. Por lo tanto, el folato es importante para la expresión de múltiples genes esenciales en la proliferación y diferenciación celular durante la embriogenésis (van Rooij, et al. 2003). Existen dos hipótesis sobre el mecanismo patogénico de la deficiencia de folato: la hipometilación del DNA y el efecto teratogénico de la hiperhomocisteinemia. Cuando la concentración de 5-metiltetrahidrofolato está reducida, la remetilación de homocisteína en metionina disminuirá y pocos grupos metilos quedarán disponibles para la metilación de DNA. La hipometilación puede cambiar la transcripción y supresión de algunos genes involucrados en la formación del labio, alveolo y/o paladar y el nivel elevado de

homocisteína resultante es posible que sea teratogénico (Rosenquist, Ratashak and Selhub 1996; Andalaro, Monaghan and Rosenquist 1998; Rosenquist, Schneider and Monogham 1999). Varios estudios de casos y controles e intervenciones han propuesto que el consumo periconcepcional de ácido fólico protege contra la ocurrencia y recurrencia de LPHA (Czeizel 1993; Briggs 1976; Tolarova and Harris 1995; Shaw, Lammer and OMalley 1995; Itikala, et al. 2001) y en el estudio realizado por van Rooij, et al. (2003) se menciona que el genotipo en *MTHFR* de la madre parece tener mayor importancia que el del padre o el hijo dado que la madre provee el ambiente en el que se desarrolla el embrión y éste es totalmente dependiente de los niveles de folato durante la gestación. Se observó que el riesgo para LPHA en las madres con genotipo 677TT o 1298CC en *MTHFR* era mayor (OR 10.0 CI: 95% 1.3-79.1 y OR 6.5 CI: 95% 1.4-30.2 respectivamente) si no consumían suplemento de ácido fólico y tenían baja ingesta de folato en la dieta durante el periodo periconcepcional. Por lo anterior se sugiere que es posible compensar el efecto de la actividad enzimática reducida, como resultado de los polimorfismos en el gen *MTHFR*, aumentando el consumo materno de ácido fólico a través de un suplemento y/o en la dieta (van Rooij, et al., 2003). En el estudio realizado por Wilcox, et al. 2007 para determinar el papel de los suplementos de ácido fólico, dieta rica en folatos y multivitamínicos en la prevención de hendiduras faciales se observó que la suplementación con ácido fólico durante el inicio del embarazo a una dosis igual o mayor a 400 µg/día se asoció a una disminución en el riesgo de LPHA (OR ajustado 0.61, CI 95%: 0.39-0.96). Independiente de los suplementos de ácido fólico, la ingesta de dietas ricas en frutas, en vegetales y en otros alimentos con alto contenido de folato disminuyeron el riesgo de LPHA (OR ajustado 0.75, CI 95%: 0.50-1.11). El riesgo más bajo de LPHA se presentó en las madres con dieta rica en folatos e ingesta de suplemento de ácido fólico y multivitamínicos (OR 0.36, CI 95%: 0.17-0.77). Los resultados obtenidos en el meta-análisis realizado por Badovinac, et al. 2007 apoyan la hipótesis del efecto protector de la ingesta de suplemento de ácido fólico durante el embarazo para la presencia de LPHA (Figura 2).

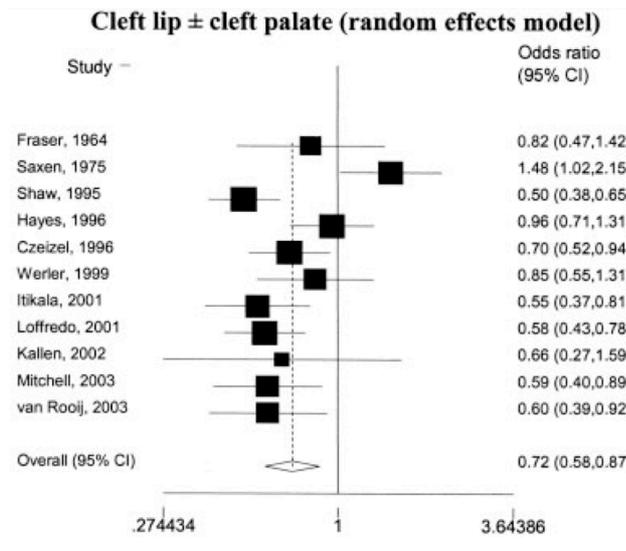


Figura 2. Meta-análisis de 12 estudios de casos y controles con LPH y consumo de ácido fólico (Badovinac, et al. 2007).

Se ha demostrado una reducción del 48-50% en la ocurrencia de LPHA en madres que consumieron multivitamínicos en el periodo periconcepcional (Shaw, Lammer and OMalley 1995; Itikala, et al. 2001).

Igualmente se ha reportado protección significativa contra LPHA en respuesta a la suplementación con una alta dosis de ácido fólico (10mg) en el estudio de Tolarova and Harris (1995); en este estudio observaron que en el grupo sin suplemento de ácido fólico el 4.05% (77/1824) de los embarazos resultó en un niño con LPHA en comparación con el grupo que consumió ácido fólico en el que sólo el 1.4% (3/211) presentó el defecto, lo cual representa un 65.4% de disminución en la ocurrencia.

Factores genéticos

La contribución de los factores genéticos en el LPHA se ha establecido mediante estudios en gemelos, en los cuales se ha calculado que el índice de heredabilidad del LPHA es 0.60, lo que significa que el 60% de su etiología se explica por factores genéticos y un 40% por factores ambientales (Cobourne 2004).

Como se ha mencionado, actualmente se considera que el LPHA está determinado por el efecto pequeño pero aditivo de diversos genes que actúan en conjunto con factores ambientales específicos. Se ha estimado que cada locus incrementa el riesgo de recurrencia en familiares en primer grado de tres a seis veces (Farrall and Holder 1992; Mitchell and Christensen 1996). El hermano de un niño afectado tiene un riesgo 30

veces mayor de padecer LPHA que el resto de la población, además de que la concordancia entre gemelos monocigotos varía de 25 a 45%, mientras que en gemelos dicigotos es de 3-6% (Mitchell and Risch 1992; Gorlin, Cohen and Hennekam 2001).

Los avances recientes, en el análisis de enfermedades multifactoriales, logrados en el campo de la Genética y de la Biología Molecular, han permitido la identificación de genes asociados con el LPHA. Algunos de los genes que confieren susceptibilidad para este defecto son *IRF6* (*Interferon Regulating Factor 6*), *MSX1* (*Muscle Segment Homeobox 1*), *TGFA* (*Transforming Growth Factor Alpha*), *PVRL1* (*Polivirus Receptor Like 1*), *TGFB3* (*Transforming Growth Factor Beta 3*) y *MTHFR* (*Methylenetetrahydrofolate Reductase*) (Jones 2006).

- GEN *MTHFR*

El gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) localizado en 1p36.3, tiene un cDNA con una secuencia de 2.2 kb y está conformado por 11 exones y 10 intrones (Goyette, et al. 1998) una región promotora sin caja TATA, islas CpG, múltiples sitios potenciales de unión a SP1 y sitios de unión para muchos otros factores de transcripción (Gaughan, et al. 2000) (Figura 3).

Gaughan, et al. 2000 mediante análisis de Northern blot identificaron transcritos de 2.8 kb, 7.2 kb y 9.0 kb en cerebro, músculo, placenta y estómago. Los transcritos de diferente tamaño resultan de sitios alternos de inicio de la transcripción y señales de poliadenilación. La cantidad total de enzima es baja y la proporción de cada transcrito difiere entre tejidos.

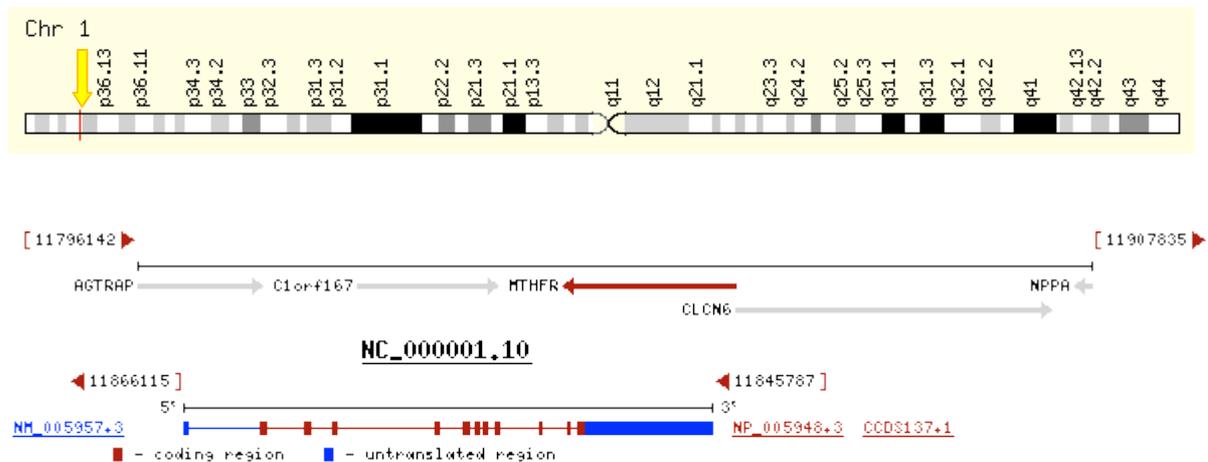


Figura 3. Localización (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFR>) y estructura del gen *MTHFR* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4524>)

Este gen codifica para una enzima que en su forma activa es un homodímero con un peso molecular de 150 KDa (Goyette, et al. 1998) (Figura 4).

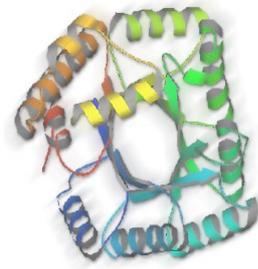


Figura 4. Esquema de la enzima MTHFR
(www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/date/1b5t.html).

La enzima es la 5-10 metilentetrahidrofolato reductasa la cual tiene un papel principal en el metabolismo de los folatos pues convierte el 5,10 metilentetrahidrofolato, un donador de carbono en la biosíntesis de los nucléotidos, en 5 metilentetrahidrofolato, un donador de carbono en la remetilación de la homocisteína a metionina (OMIM, 607093) (Figura 5).

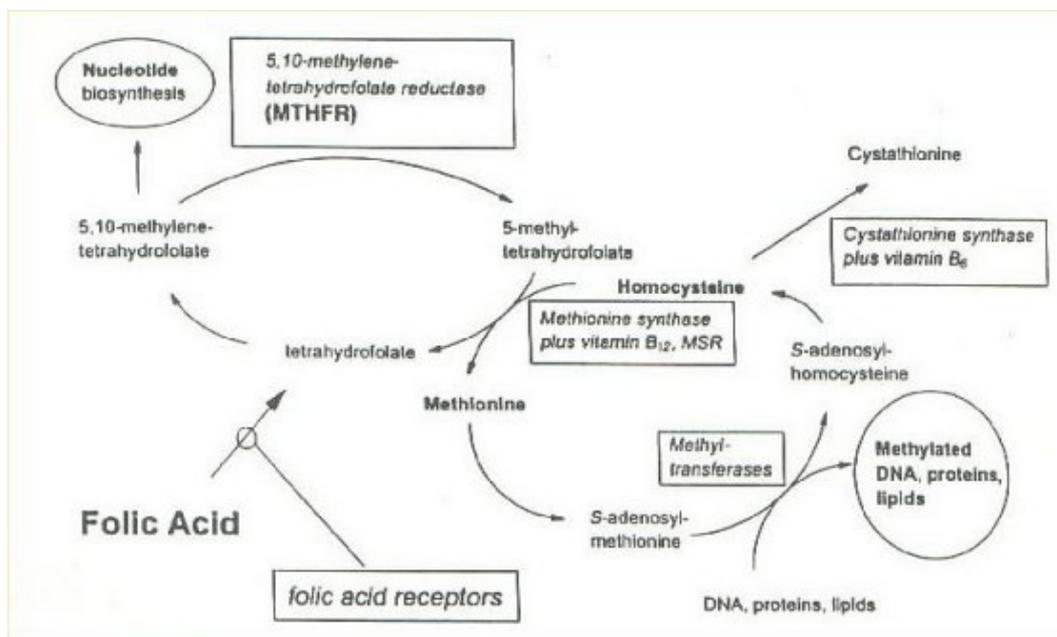


Figura 5. Vía metabólica del folato. La enzima MTHFR cataliza la conversión de 5,10 metilentetrahidrofolato en 5-metiltetrahidrofolato, forma en la que circula mayormente el folato (Botto and Yang 2000)

MUTACIONES EN *MTHFR*

Sibani, et al. 2003 estipularon que 29 mutaciones raras en *MTHFR* habían sido identificadas en pacientes con homocistinuria. En 11 familias con deficiencia de *MTHFR*, Tonetti, et al. 2003 identificaron 14 mutaciones, de las cuales 10 no habían sido descritas. No encontraron correlación bioquímica o clínica con mutaciones específicas.

TABLA 2. POLIMORFISMOS Y MUTACIONES EN EL GEN *MTHFR* (den Dunnen and Antonarakis 2000)

Polimorfismos en el gen <i>MTHFR</i> que confieren termolabilidad a la enzima	Algunas mutaciones en <i>MTHFR</i> causantes de homocistinuria por deficiencia en la <i>MTHFR</i>
c.1298A>C / p.E429A	c.559C>T / p.R184X
c.677C>T / p.A222V	c.482G>A / p.R158Q
	c.983A>G / p.N324S
	c.1027T>G / p.W339G
	c.1084C>T
	c.1711C>T
	c.1081C>T
	c.1755G>A / p.M581I
	c.1141C>T / p.R377C
	p.L323P

POLIMORFISMOS EN *MTHFR*

Se han encontrado variantes génicas en *MTHFR*, las cuales aumentan la termolabilidad de la enzima, pero que *per se* no condicionan ninguna enfermedad; dos de estas variantes son c.677C>T y c.1298A>C. Ambas variantes son polimorfismos de nucleótido único (SNP) en el gen *MTHFR* cuya presencia disminuye la actividad enzimática, ocasionando hiperhomocistinemia, particularmente en estados deficientes de folato.

La frecuencia del polimorfismo c.677C>T es relativamente elevada alrededor del mundo. Wilken, et al. (2003) estudiaron la distribución geográfica y étnica del polimorfismo c.677C>T en el gen *MTHFR* en más de 7,000 recién nacidos de 16 regiones en Europa, América, Medio Oriente y Australia. El genotipo TT fue particularmente común en el norte de China (20%), sur de Italia (26%) y México (32%). Incluso se encontró evidencia de gradientes geográficos en Europa (aumento de norte a sur) y en China (decremento de norte a sur). La frecuencia del genotipo TT fue baja en los recién nacidos de ancestría africana, intermedia en los recién nacidos de origen europeo y alta en los de ancestría hispanoamericana. McAndrew, et al. (1996) encontraron que la frecuencia alélica de la forma termolábil c.677C>T en estado heterocigoto fue de 0.30 en caucásicos y 0.10 en africano-americanos. Estos hallazgos sugirieron la existencia de eventos selectivos causantes de esta marcada variación. Kumar, et al. (2005), en un grupo de 400 individuos hindús, determinaron que la frecuencia del genotipo 1298CC fue de 19.46%, lo cual fue mucho más alta que la reportada en población caucásica (9.4%), china (3.3%) y japonesa (1.6%). La frecuencia del alelo 1298C fue de 14.7% y del genotipo 1298CC de 2.3% en un estudio realizado en individuos residentes en la ciudad de México (Guéant-Rodríguez, et al. 2006).

Friso, et al. (2002) observaron el efecto del folato en la metilación del DNA genómico con énfasis en la interacción del polimorfismo c.677C>T en el gen *MTHFR*. Los resultados mostraron una correlación directa de la metilación del DNA con el nivel de folato y una correlación inversa con los niveles plasmáticos de homocisteína. Los genotipos TT tienen un nivel de metilación de DNA disminuido en comparación con aquellos con genotipo CC. Por lo que se considera que el polimorfismo c.677C>T influye en la metilación del DNA a través de la interacción con el folato.

MTHFR Y LPHA

Existen diversos estudios de asociación de los polimorfismos c.677C>T y c.1298A>C con LPHA, así como de la interacción gen-ambiente entre polimorfismos en el gen *MTHFR* y la ingesta del ácido fólico periconcepcional (Ver tabla 3, 4).

Tabla 3. Estudios de asociación de polimorfismos en el gen *MTHFR* con LPHA (odds ratio, riesgo relativo)

Autor y año	Diseño del estudio y origen étnico	Frecuencia alelo menor	Frecuencia alelo mayor	Frecuencia genotípica	Frecuencia genotípica	Frecuencia genotípica	OR/RR
Shaw, et al. 1998 (California)	Casos y controles			677TT (%)	677CT (%)	677CC (%)	Todos
	Casos 310			Casos	Casos	Casos	TT vs CC
	Hispanos 88			Todos 12.9	Todos 41.0	Todos 46.1	0.89 (0.55-1.4)
	Caucásicos 191			Hispanos 13.6	Hispanos 51.1	Hispanos 35.2	CT vs CC
	Africanos 8			Caucásicos 13.1	Caucásicos 38.2	Caucásicos 48.7	0.78 (0.56—1.1)
	Otros 23			Africanos 12.5	Africanos 12.5	Africanos 75.0	
				Otros 8.7	Otros 34.8	Otros 56.5	Hispanos
	Controles 383			Controles	Controles	Controles	TT vs CC
	Hispanos 103			Todos 12.8	Todos 46.5	Todos 40.7	0.65 (0.28-1.5)
	Caucásicos 225			Hispanos 18.9	Hispanos 42.3	Hispanos 31.5	CT vs CC
	Africanos 13			Caucásicos 10.8	Caucásicos 50.0	Caucásicos 36.2	1.1 (0.58-2.0)
	Otros 41			Africanos 15.4	Africanos 23.1	Africanos 61.5	Caucásicos
			Otros 2.4	Otros 29.3	Otros 68.3	TT vs CC	
						0.90 (0.48-1.7)	
						CT vs CC	
						0.57 (0.38-0.86)	
						Africanos	
						TT vs CC	
						0.67 (0.01-16.2)	
						CT vs CC	
						0.44 (0.01-7.6)	
						Otros	
						TT vs CC	
						4.3 (0.41-45.1)	
						CT vs CC	
						1.4 (0.41-5.0)	
						Genotipo 677TT no confiere un riesgo elevado para LPHA	

Tolarova, et al. 1998 (Argentina)	Casos y controles Latinos	677TT Casos 19 (17.1) Controles 8 (7.5)	677CT Casos 49 (44.1) Controles 52 (49.1)	677CC Casos 43 (38.8) Conroles 46 (43.4)	OR 1.21 (0.71-2.08)
	Variante c.677C>T Casos 111 Controles 106	1298CC Casos 2 (1.9) Controles 7 (6.8)	1298AC Casos 39 (36.1) Controles 33 (32.0)	1298AA Casos 67 (62.0) Controles 63 (61.2)	OR 0.96 (0.55-1.68)
	Variante c.1298A>C Casos 108 Controles 103				Genotipos 677TT y 1298CC no confieren un riesgo elevado para LPHA
Mills, et al. 1999 (Irlanda)	Casos y controles Caucásicos	677TT Casos 10 (15.2 %) Controles 83 (9.8%)			OR 1.65 (0.81-3.35)
	Casos 66 Controles 848				Genotipo 677TT no confiere un riesgo elevado para LPHA
Martinelli, et al. 2001 (Italia)	Casos y controles Caucásicos	677TT Casos 12 (18.7) Controles 17 (16.0)	677CT Casos 30 (46.9) Controles 43 (40.6)	677CC Casos 22 (34.4) Controles 46 (43.4)	OR 1.46 (0.77-2.78)
	Casos 64 Controles 106				Genotipo 677TT no confiere un riesgo elevado para LPHA
Grunert, et al. 2002 (Alemania)	Casos y controles Caucásicos	677TT Casos 6 (9.1) Controles 25 (13.6)	677CT Casos 26 (39.4) Controles 69 (37.5)	677CC Casos 34 (51.5) Controles 90 (48.9)	OR 0.90 (0.51-1.58)
	Variante c.677C>T Casos 66 Controles 184	1298CC Casos 7 (10.8) Controles 27 (14.6)	1298AC Casos 30 (46.1) Controles 80 (43.5)	1298AA Casos 28 (43.1) Controles 77 (41.9)	OR 0.95 (0.54-1.68)
	Variante c.1298A>C Casos Controles				Genotipos 677TT y 1298CC no confieren un riesgo elevado para LPHA

van Rooij, et al. 2003 (Holanda)	Casos y controles caucásicos			677 TT Casos 6 (5.7) Controles 4 (3.1)	677 CT Casos 45 (42.9) Controles 54 (42.2)	677 CC Casos 54 (51.4) Controles 70 (54.7)	OR 1.14 (0.68-1.91) OR 1.08 (0.63-1.87)
	Variante c.677C>T Casos 105 Controles 128			1298 CC Casos 12 (12.8) Controles 11 (9.6)	1298 AC Casos 34 (36.2) Controles 43 (37.4)	1298 AA Casos 48 (51.0) Controles 61 (53.0)	Genotipos 677TT y 1298CC no confieren un riesgo elevado para LPHA
	Variante c.1298A>C Casos 94 Controles 115						
Shotelersuk, et al. 2003 (Tailandia)	Casos y controles asiáticos	677T Casos 0.11 Controles 0.12	677C Casos 0.89 Controles 0.88	677 TT Casos 0 (0.0) Controles 2 (1.0)	677 CT Casos 25 (22.9) Controles 46 (22.8)	677 CC Casos 84 (77.1) Controles 154 (76.2)	
Pezzetti, et al. 2004 (Italia)	Variante c.677C>T Casos 109 Controles 202	1298C Casos 0.28 Controles 0.27	1298A Casos 0.72 Controles 0.73	1298 CC Casos 6 (5.5) Controles 14 (6.9)	1298 AC Casos 48 (44.0) Controles 80 (39.6)	1298 AA Casos 55 (50.5) Controles 108 (53.5)	OR 1.13 (0.71-1.80)
	Variante c.1298A>C Casos 109 Controles 202						Genotipos 677TT y 1298CC no confieren un riesgo elevado para LPHA
	Casos y controles caucásicos	677T Casos 0.48 Controles 0.41	677C Casos 0.52 Controles 0.59	677 TT Casos 24 (21.8) Controles 43 (14.9)	677 CT Casos 58 (52.7) Controles 151 (52.2)	677 CC Casos 28 (25.5) Controles 95 (32.9)	OR 1.43 (0.87-2.35)
Pezzetti, et al. 2004 (Italia)	Variante c.677C>T Casos 110 Controles 289			1298 CC Casos 8 (7.3) Controles 43 (14.9)	1298 AC Casos 46 (41.8) Controles 151 (52.2)	1298 AA Casos 56 (50.9) Controles 95 (32.9)	OR 0.47 (0.30-0.74)
	Variante c.1298A>C Casos 110 Controles 289						Genotipos 677TT y 1298CC no confieren un riesgo elevado para LPHA

Gaspar, et al. 2004 (Brasil)	Casos y controles latinos	677T Casos 0.29 Controles 0.28	677C Casos 0.71 Controles 0.72	677TT Casos Blancos 32(9.5%) No blancos 5(7.5%) Otros 2(11.8%) Total 39(9.2%)	677CT Casos Blancos 140(41%) No blancos 23(34.3%) Otros 9(52.9%) Total 172(40.6%)	677CC Casos Blancos 168(49.5%) No blancos 39(58.2%) Otros 6(35.3%) Total 213(50.2%)	OR 0.98 (0.77-1.25)
	Sao Paulo Casos 172 Controles 243						Genotipos 677TT y 1298CC no confieren un riesgo elevado para LPHA
Ceará Casos 252 Controles 401			Controles Blancos 37(7.8%) No blancos 8(8.9%) Otros 3(3.7%) Total 48(7.4%)	Controles Blancos 202(42.6%) No blancos 39(43.3%) Otros 28(35.0%) Total 269(41.8%)	Controles Blancos 235(49.6%) No blancos 43(47.8%) Otros 49(61.3%) Total 327(50.8%)		
Zhu, et al. 2006 (China)	Casos y controles asiáticos			677TT	677CT	677CC	Norte 677TT OR 6.31 (1.35-29.48) 677CT OR 5.63 (1.18-26.93)
	Habitantes del Norte 65 Habitantes del Sur 74			Norte 25 Sur 4	Norte 34 Sur 45	Norte 6 Sur 25	Sur 677TT OR 0.41 (0.13-1.34) 677CT OR 1.46 (0.74-2.86)
							El genotipo 677TT y 677CT se asoció con un riesgo elevado para LPHA en los casos del Norte de China
Chevrier, et al. 2007 (Francia)	Casos y controles caucásicos			677TT	677CT	677CC	OR 0.54 (0.3-1.1)
	Casos 148 Controles 168			Casos 22 (14.9%) Controles 33 (19.6%)	Casos 60 (40.5%) Controles 81 (48.2%)	Casos 66 (44.6%) Controles 54 (32.1%)	Genotipos 677TT no confiere un riesgo elevado para LPHA

Brandalize, et al. 2007 (Brasil)	Casos y controles latinos Casos 114 Controles 100	677T Casos 0.37 Controles 0.35	677C Casos 0.63 Controles 0.65	677TT Casos 19 Controles 14	677CT Casos 46 Controles 41	677CC Casos 49 Controles 45	Sin diferencia significativa entre las frecuencias del alelo 677T y el genotipo 677TT de casos y controles
Mills, et al. 2008 (Irlanda)	Casos y controles caucásicos MTHFR 677 Casos 492 Controles 1599 MTHFR 1298 Casos 407 Controles 1050			677 TT Casos 54 (11.0%) Controles 63 (10.2%) 1298 CC Casos 33 (8.1%) Controles 92 (8.8%)	677 CT Casos 221 (44.9%) Controles 721 (45.1%) 1298 AC Casos 172 (42.3%) Controles 439 (41.8%)	677 CC Casos 217(44.1%) Controles 715 (44.7%) 1298 AA Casos 202 (49.6%) Controles 519 (49.4%)	OR 1.08 (0.78-1.50) Genotipos 677TT y 1298CC no confieren un riesgo elevado para LPHA
Dávalos-Rodríguez, et al. 2009 (México)	Casos y controles hispanos Casos 67 Controles 70	677T Casos 52 (39%) Controles 58 (41%)	677C Casos 82 (61%) Controles 82 (59%)	677TT Casos 7 (10%) Controles 11 (16%)	677CT Casos 38 (57%) Controles 36 (51%)	677CC Casos 22 (33%) Controles 23 (33%)	Sin diferencia significativa entre las frecuencias del alelo 677T y el genotipo 677TT de casos y controles
Ali, Singh and Raman, 2009	Casos y controles Casos 323 Controles 214	677T Casos 16.87% Controles 9.35%	677C Casos 83.13% Controles 90.65%	677TT Casos 3.41% Controles 0.93%	677CT Casos 26.93% Controles 16.82%	677CC Casos 69.66% Controles 82.24%	CC vs CT OR 1.89 (1.22-2.92) CC vs TT OR 4.30 (0.94-19.66) AA vs AC OR 0.71 (0.49-1.02) AA vs CC OR 0.58 (0.29-1.64) El genotipo 677TT confiere mayor riesgo para LPHA

Tabla 4. Interacciones gen-ambiente entre *MTHFR* y suplemento de ácido fólico durante el embarazo

Autor y año	Origen étnico	Diseño del estudio	Ingesta periconcepcional de ácido fólico		Casos %	Controles %	OR/RR
Shaw, 1998	Hispanos Caucásicos Africanos Otros (California)	Casos y controles					OR
			677CC	Sí	73	102	0.74 (0.39-1.4)
			677TT	Sí	19	36	1.4 (0.54-3.6)
			677CC	No	41	27	0.82 (0.54-1.2)
			677TT	No	17	8	0.79 (0.40-1.6)
			677CC	Si	73	102	
			677CT	Si	73	124	
			677CC	No	41	27	El genotipo 677TT y la falta de ingesta de ácido fólico periconcepcional por la madre no confieren un mayor riesgo para LPHA
			677CT	No	36	30	
			383 controles Hispanos 103 Caucásicos 225 Africanos 13 Otros 41				
Wyszynski, 2000 (Reanálisis de los datos de Shaw)	Hispanos Caucásicos Africanos Otros (California)	Casos y controles	Casos				OR 1.0 (reference)
			677CC	Si	73	102	OR 0.8 (0.5-1.2)
			677CT	Si	19	36	OR 0.7 (0.4-1.4)
			677TT	No	41	27	OR 2.1 (1.2-3.8)
			677CC	No	36	30	OR 1.7 (0.9-3.0)
			677CT	No	17	8	OR 3.0 (1.2-7.2)
			677TT				La falta de ingesta periconcepcional de vitaminas con el genotipo 677TT y 677CC se asoció con mayor riesgo para LPHA
Van Rooij, 2003	Caucásicos (Holanda)	Casos y controles	Casos				OR
			677TT	No	1.9	0.8	3.5 (0.3-42.4)
			677TT	Si	3.9	2.4	2.4 (0.5-12.3)
			677CT	No	25.2	22.6	1.7 (0.7-3.9)
			677CT	Si	16.5	20.2	1.3 (0.5-3.1)
			677CC	No	37.9	32.2	1.7 (0.8-3.8)
677CC	Si	14.6	21.8	1.0 (referente)			
				Sin asociación con Riesgo elevado para LPHA			

Madres					OR
677TT	No	5.5	1.2	5.9 (1.1-30.9)	1.2 (0.4-3.7)
	Si	4.8	5.5	1.3 (0.6-2.5)	
677CT	No	25.3	26.2	0.8 (0.4-1.8)	
	Si	10.9	17.7	1.7 (0.9-3.2)	
677CC	No	37.7	29.3	1.0 (reference)	
	Si	15.8	20.1		
					Genotipo materno 677TT y falta de ingesta periconcepcional de ácido fólico eleva el riesgo para LPHA
Casos					OR
1298CC	No	8.7	6.4	1.7 (0.5-5.8)	
	Si	4.4	2.7	2.7 (0.5-14.3)	
1298AC	No	20.6	17.3	1.8 (0.7-4.5)	
	Si	15.2	20.9	1.0 (0.4-2.6)	
1298AA	No	35.9	28.2	1.9 (0.8-4.4)	
	Si	15.2	124.5	1.0 (reference)	
					Sin asociación con riesgo elevado para LPHA
Madres					OR
1298CC	No	8.1	5.2	2.2 (0.7-6.5)	
	Si	4.8	4.5	1.3 (0.4-4.5)	
1298AC	No	31.5	23.4	1.9 (0.9-3.9)	
	Si	9.7	18.2	0.7 (0.3-1.7)	
1298AA	No	29.0	24.0	1.7 (0.8-3.4)	
	Si	16.9	24.7	1.0 (reference)	
					Genotipo materno 1298CC y falta de ingesta periconcepcional de ácido fólico eleva el riesgo para LPHA

Jugessur, 2003	Caucásicos (Noruega)	Casos y controles 173 tríos	Pacientes			RR			
			677TT	No		1.44 (0.73-2.82)			
				Si		4.31 (1.55-12.01)			
			677CC	No		1.0 (reference)			
				Si		1.0 (reference)			
							El genotipo 677CT o 677TT y la ingesta de ácido fólico periconcepcional confiere riesgo elevado para LPHA		
			Madres			RR			
			677TT	No		1.44 (0.73-2.82)			
				Si		0.78 (0.33-1.85)			
			677CC	No		1.0 (reference)			
				Si		1.0 (reference)			
						Sin asociación con riesgo elevado para LPHA			
Chevrier, 2007	Caucásicos (Francia)	Casos y controles 148 casos 168 controles	Casos			OR			
			677TT	Baja ingesta		0.46 (0.1-1.5)			
				Alta ingesta		0.43 (0.2-1.1)			
			677CT	Baja ingesta		0.47 (0.2-1.1)			
				Alta ingesta		0.66 (0.3-1.3)			
			677CC	Baja ingesta		1.0 (reference)			
				Alta ingesta		1.0 (reference)			
						Sin asociación con riesgo elevado para LPHA			
						Madres			OR
						677TT	Baja ingesta		1.19 (0.4-3.6)
							Alta ingesta		0.48 (0.1-2.0)
						677CT	Baja ingesta		1.35 (0.6-3.3)
				Alta ingesta		0.92 (0.4-1.8)			
			677CC	Baja ingesta		1.0 (reference)			
				Alta ingesta		1.0 (reference)			
						Sin asociación con riesgo elevado para LPHA			

Boyles, 2008	Caucásicos (Notuega)	Casos y conroles 377 casos 763 controles familiares	Casos 677TT	<400µg	RR 0.72
			677CT		Sin asociación con riesgo elevado para LPHA
			677CC		RR 0.037
			Madres 677TT		Sin asociación con riesgo elevado para LPHA
677CT	<400µg	RR 0.77			
677CC	Sin asociación con riesgo elevado para LPHA				
Casos 677TT	>400µg	RR 0.86			
677CT		Sin asociación con riesgo elevado para LPHA			
677CC		RR 0.86			
Madres 677TT		Sin asociación con riesgo elevado para LPHA			
677CT	>400µg	RR 0.86			
677CC	Sin asociación con riesgo elevado para LPHA				

Como se observa en las tablas, la mayoría de los estudios no encuentran asociación entre los polimorfismos c.677C>T y c.1298A>C y LPHA, excepto en el primer estudio de Mills, et al. (1999), Zhu, et al. (2006), Chevrier, et al. (2007) y Ali, Singh and Raman (2009) descritos a continuación.

Mills, et al. (1999) examinaron la prevalencia de la variante c.677C>T en individuos irlandeses con hendidura orofacial y en un grupo control elegido al azar. En 848 controles 83 (9.8%) fueron homocigotos TT (variante termolábil de MTHFR). Este genotipo se encontró en 7/27 individuos (25.9%) con paladar hendido aislado y en 10/66 individuos (15.2%) con labio hendido con o sin paladar hendido. El OR para LPHA fue de 1.65 (0.81-3.35), para paladar hendido solo el OR fue de 3.23 (1.32-7.86) y al combinar los dos grupos el OR fue de 2.06 (1.16-3.66). En este trabajo se concluyó que en la población irlandesa la homocigocidad de la variante c.677C>T que confiere termolabilidad a la enzima MTHFR es significativamente más frecuente en aquellos con paladar hendido aislado, lo cual podría ser etiológicamente importante. Sin embargo, Mills, et al., (2008) en un estudio posterior con un tamaño de muestra mayor de la población irlandesa (492 casos con LPHA, 321 con PHS y 1599 controles) observaron que el polimorfismo c.677C>T en realidad no es un factor de riesgo para LPHA (OR 1.08, 0.78-1.50) ni para PHS (OR 0.96, 0.64-1.43).

Zhu, et al. (2006) estudiaron el polimorfismo c.677C>T en 170 tríos chinos y observaron una moderada asociación entre el alelo 677T y la presencia de labio hendido con o sin paladar hendido en familias del norte de China, más no en el sur de este país. En los padres heterocigotos del norte de China se observó el doble de posibilidad de transmitir el alelo de riesgo 677T a los casos en comparación con los padres del sur (OR 2.24, 95% CI:1.08-4.65), lo que sugirió heterogeneidad genética en el desarrollo de LPHA entre las poblaciones del norte y del sur en China.

Chevrier, et al. (2007) realizaron un estudio de asociación de hendiduras orofaciales no sindrómicas con el polimorfismo *MTHFR* c.677C>T en 148 niños con LPHA, 59 niños sólo con paladar hendido y 168 controles. El OR para LPHA fue menor con el genotipo 677TT (OR 0.54, CI 0.3-1.1) que con el genotipo 677CT (OR 0.65, CI 0.4-1.1) y, para paladar hendido el OR con el genotipo 677TT (OR 0.33, 0.1-1.0) fue también menor que con el genotipo 677CT (OR 0.78, 0.4-1.5). Aunque sus resultados no fueron estadísticamente significativos y su tamaño de muestra fue limitado, los autores sugieren que el alelo 677T está asociado con un riesgo disminuido para LPHA y PHS.

Ali, Singh and Raman (2009) realizaron un estudio de asociación de tres polimorfismos (*IRF6* 820GG, c.677C>T y c.1298A>C en el gen *MTHFR*) con riesgo para presentar LPHA incluyendo a 323 casos, 116 madres, 108 padres y 214 controles. Encontraron que la homocigocidad para *MTHFR* 677T en los controles y en los padres sanos fue

<1% mientras que en el grupo de los casos fue mayor (3.4%); asimismo el OR para LPHA fue de 4.30 (0.94-19.66). La frecuencia del genotipo 677CT fue también alta en los casos (26.93%) y en las madres de los casos (31.90%) con respecto a los controles (16.82%) con un OR para los casos con LPHA de 1.89 (1.22-2.92) y en las madres de 2.32 (1.36-3.94). Con los datos anteriores se concluye que los homocigotos 677TT muestran una asociación mayor, aunque no estadísticamente significativa, para presentar LPHA con relación a los heterocigotos 677CT. La variante c.1298A>C en el gen *MTHFR* no mostró asociación alguna con riesgo para LPHA ni en estado heterocigoto (OR 0.71, 0.49-1.02) ni en homocigoto (OR 0.58, 0.29-1.64) y el genotipo *IRF6* 820GG confirió un riesgo bajo (OR 1.84, 1.25-2.70). Sin embargo, la combinación de los genotipos *IRF6*820GG/*MTHFR*677CT presente en el 22.29% de los pacientes y en 5.61% de los controles se asoció con un riesgo mayor para LPHA (OR 3.52, 1.82-6.69).

CUADRO CLINICO

El grado de severidad de LPH puede variar enormemente, desde labio hendido unilateral hasta labio bilateral con paladar hendido (Cobourne 2004) (Figura 6).

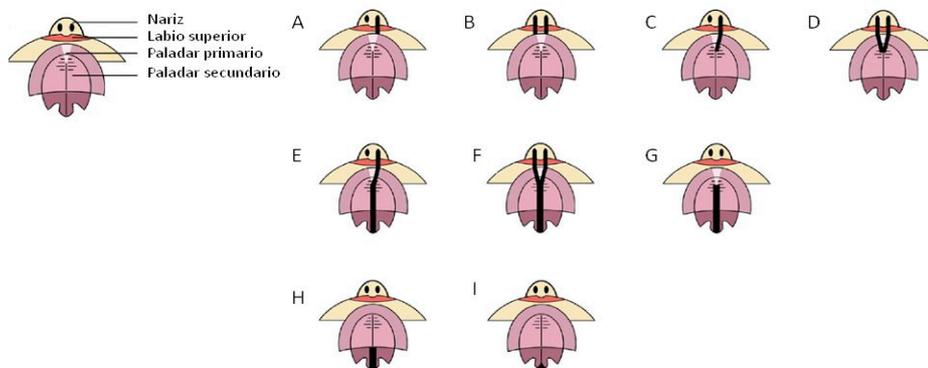


Figura 6. Tipos de defectos orofaciales. A) Labio hendido unilateral; B) Labio hendido bilateral; C) Labio y paladar primario hendido unilateral; D) Labio y paladar primario hendido bilateral; E) Labio y paladar completo hendido unilateral F) Labio y paladar completo hendido bilateral; G) Paladar secundario hendido aislado; H) Paladar blando hendido aislado; I) Paladar blando hendido submucoso.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de LPH es clínico, se establece mediante la exploración física desde el nacimiento. Actualmente la detección prenatal del labio hendido es posible mediante ultrasonido; sin embargo, puede no ser detectado mediante escaneo obstétrico de rutina y una hendidura labial pequeña puede pasar desapercibida incluso por personal especializado. Además, el paladar hendido solo es difícil de identificar mediante ultrasonido durante el embarazo (Firth, Hust and Hall 2005). La frecuencia de detección ultrasonográfica de hendiduras orofaciales en etapa prenatal varía en la literatura de 18% a 56% (Exalto, et al. 2009).

PRONOSTICO Y TRATAMIENTO

El pronóstico de los pacientes con LPHA que son sometidos al tratamiento adecuado y oportuno suele ser muy bueno (Jones 2006).

El tratamiento debe contemplar el aspecto estético y lingüístico, así como enfocarse en las complicaciones más frecuentes de los pacientes con este defecto, por lo que se requiere de un equipo multidisciplinario y seguimiento a largo plazo (Jones 2006).

La reconstrucción quirúrgica del defecto implica varias intervenciones a lo largo del crecimiento y desarrollo del individuo pero debe iniciar a edad temprana ya que existe evidencia de mejores resultados en el área de lenguaje si se realiza la corrección del paladar antes del primer año de vida (Jones 2006).

Dentro de las complicaciones que suelen presentarse en LPHA se encuentran:

- a. *Dificultad para la alimentación.* Dentro de los cuidados inmediatos necesarios del paciente con LPHA se encuentra la alimentación. Generalmente el reflejo de succión y deglución son normales y a pesar de que el reflujo nasofaríngeo puede estar presente, existe bajo riesgo de aspiración. Se ha observado que dar seno materno posterior a la reparación del labio hendido promueve un mejor crecimiento en el niño. Actualmente se cuenta con una gran variedad de dispositivos para facilitar la alimentación en los pacientes con LPHA (Jones 2006).
- b. *Infecciones del oído y pérdida auditiva.* Los cuadros de otitis media se pueden presentar hasta en un 30% de los pacientes con LPHA y pueden dar lugar a hipoacusia conductiva secundaria unilateral o bilateral, por lo que en ocasiones

- se deben colocar tubos de ventilación como tratamiento profiláctico (Vallino, Zucker and Napoli 2008).
- c. *Alteraciones en el lenguaje.* A causa de la hendidura en el labio y el paladar, la función velofaríngea puede verse alterada causando frecuentemente errores en la articulación de las palabras. También pueden presentarse retraso en el lenguaje y resonancia anormal (voz hipo o hipernasal). Estas complicaciones hacen necesaria la terapia de lenguaje en los pacientes con LPHA (Vallino, Zucker and Napoli 2008).
 - d. *Problemas dentales.* Es común la necesidad de tratamiento por el servicio de Ortodoncia para corregir las diferentes alteraciones en la dentición y en la oclusión tales como: diente supernumerario, fusión dental, mordida cruzada, mordida abierta, mordida profunda y apiñamiento, entre otras (Vallino, Zucker and Napoli 2008).
 - e. *Rendimiento escolar.* A pesar de que se ha identificado una amplia variedad de problemas emocionales y de aprendizaje relacionados con LPHA, la mayoría de los pacientes asisten a escuelas de un nivel académico normal y tienen un desarrollo psicosocial adecuado (Endriga and Kapp-Simon 1999).

PREVENCIÓN

En cuanto a la prevención, la madre deberá evitar durante el embarazo los factores ambientales que se sabe aumentan el riesgo de LPHA como consumo de tabaco, alcohol y medicamentos antagonistas de ácido fólico, fiebre y condiciones de hipoxia (altitud).

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-034-SSA2-2002 para la *Prevención y Control de los Defectos al Nacimiento* (SSA, 2002) y las "Bases técnicas para la suplementación con vitaminas y minerales en la infancia y adolescencia" del *Programa de Acción: Infancia y adolescencia* de la Secretaría de Salud (SSA, 2003), la suplementación con ácido fólico para prevenir la ocurrencia de malformaciones congénitas como los defectos del tubo neural debe ser de 0.4mg/día en toda mujer en edad reproductiva, especialmente durante la etapa periconcepcional (3 meses previos al embarazo y los 3 primeros meses del mismo) y para disminuir el riesgo de recurrencia en las mujeres con antecedentes de haber tenido productos con defectos del tubo neural de 4mg/día igualmente en el periodo periconcepcional.

Por otro lado la Guía Clínica no. 201 (2007) de la Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada indica que para disminuir el riesgo de recurrencia de LPHA, se debe mantener un estado nutricional adecuado mediante una dieta rica en

alimentos que contengan folato y la ingesta diaria de un suplemento multivitamínico con ácido fólico a una dosis de 5mg desde los tres meses previos al embarazo hasta las primeras 12 SDG; recomienda continuar el consumo de 0.4-1.0mg de ácido fólico desde la 12 SDG hasta el final del embarazo y durante todo el periodo de lactancia y; en toda mujer en edad reproductiva sin antecedente de familiares con LPHA se sugiere el consumo de 0.4-1.0mg de ácido fólico desde los tres meses previos al embarazo hasta las primeras 12 SDG (Wilson 2007).

Otro aspecto importante en el manejo de los pacientes con LPHA es el asesoramiento genético. Este debe ser brindado por un genetista con base en los antecedentes familiares (Tabla 5) y el grado de severidad del cuadro clínico (Tabla 6) para poder establecer el riesgo de recurrencia en la descendencia del paciente, de los padres y de los familiares cercanos (Thompson 2004; Mills, et al. 2009).

TABLA 5. RIESGOS DE RECURRENCIA (%) DE LPHA (Thompson 2004)

Familiares afectados	Labio hendido con o sin paladar hendido
HERMANOS SANOS	
Padres sanos	0.1
Un padre afectado	3
Ambos padres afectados	34
UN HERMANO AFECTADO	
Padres sanos	3
Un padre afectado	11
Ambos padres afectados	40
DOS HERMANOS AFECTADOS	
Padres sanos	8
Un padre afectado	19
Ambos padres afectados	45
UN HERMANO Y UN FAMILIAR DE 2° GRADO	
Padres sanos	6
Un padre afectado	16
Ambos padres afectados	43
UN HERMANO Y UN FAMILIAR DE 3° GRADO	
Padres sanos	4
Un padre afectado	14
Ambos padres afectados	44

TABLA 6. RIESGO DE LPHA EN HERMANOS SEGUN EL GRADO DE SEVERIDAD DEL PROBANDO AFECTADO (Thompson 2004)

Fenotipo del probando	Incidencia de hermanos con LPHA (%)
Labio hendido unilateral sin paladar hendido	4.0
Labio y paladar hendido unilateral	4.9
Labio hendido bilateral sin paladar hendido	6.7
Labio y paladar hendido bilateral	8.0

2. JUSTIFICACION

Según el Programa Nacional de Salud de México actual (SSA 2007-2012) la mayoría de las muertes infantiles que ocurren en el primer mes de vida se deben a enfermedades congénitas y perinatales, razón por la cual se considera a las malformaciones congénitas una línea prioritaria de investigación en el Sector Salud. Además de ratificar la importancia de enfermedades que causan un número considerable de muertes es necesaria la atención de aquellas que condicionan discapacidad y que requieren un manejo integral con costos en atención altos. Uno de estos casos son las malformaciones congénitas, ya que representan el 4.3% de las causas que condicionan años de vida saludable perdidos (AVISA) en mujeres y 4.0% de AVISA perdidos en hombres. La existencia de estos defectos al nacimiento está generando un nuevo reto a nuestro sistema de salud porque se requiere de una atención perinatal con mayor tecnología y de fortalecimiento de las estrategias de prevención.

Dentro de las malformaciones congénitas se encuentra el labio paladar hendido aislado una de las primeras causas de mortalidad en niños menores de 1 año de edad. Dado que el labio paladar hendido aislado tiene una alta prevalencia (desde 1/500 hasta 1/2500 nacimientos) e incidencia (1 y 1.1 casos por cada 1000 recién nacidos vivos) en la población mexicana, se considera importante conocer los factores genéticos y ambientales que participan en su etiología para plantear medidas que contribuyan a disminuir su ocurrencia y recurrencia en nuestro país. El labio paladar hendido aislado, al igual que muchos otros defectos al nacimiento, tiene un gran impacto en la calidad de vida del paciente y requiere de un manejo multidisciplinario a

largo plazo pues ocasiona problemas relacionados con la alimentación, la dentición, el lenguaje, la audición, el aspecto emocional y psicosocial.

Como se mencionó previamente, uno de los genes que podría contribuir a la presencia del labio y el paladar es *MTHFR* que codifica para la enzima metilentetrahidrofolato reductasa. Este gen participa en el desarrollo craneofacial y sus polimorfismos se han relacionado con un mayor riesgo de presentar ciertas malformaciones congénitas como defectos de cierre de tubo neural, sin embargo, los resultados obtenidos en la mayoría de los estudios de asociación a nivel internacional no han mostrado asociación de las variantes génicas de *MTHFR* c.677C>T y c.1298A>C con LPH. En México sólo existe un estudio de estas variantes polimórficas y el LPHA (Dávalos-Rodríguez, et al. 2009), en el que no se reportó asociación, sin embargo no se analizó el efecto de los factores ambientales con la presentación del defecto. Por lo anterior consideramos importante realizar el presente trabajo con la finalidad de determinar si existe asociación de las variantes c.677C>T y c.1298A>C con LPH así como la posible contribución de factores ambientales.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Existirán asociaciones entre la presencia del labio paladar hendido aislado con las variantes c.677C>T y c.1298A>C del gen *MTHFR*?

4. OBJETIVOS

Establecer asociaciones entre la presencia de labio paladar hendido aislado y las variantes polimórficas del gen *MTHFR* a estudiar en población mexicana.

- Determinar la frecuencia de los polimorfismos del gen *MTHFR* en el grupo problema y en el grupo de comparación.
- Determinar la magnitud de la asociación con respecto a la presencia LPHA y las variantes polimórficas analizadas.

Establecer asociaciones entre la presencia de LPHA vs factores genéticos y ambientales.

5. HIPOTESIS

Existirán asociaciones positivas entre la presencia del labio paladar hendido aislado con las variantes mayores o menores de los polimorfismos c.677C>T y c.1298A>C del gen *MTHFR*.

6. MATERIAL Y METODO

TIPO DE ESTUDIO: Casos (grupo problema) y controles (grupo de comparación)

CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO: Observacional, prospectivo, transversal, comparativo.

CRITERIOS DE INCLUSION

Grupo problema (casos)

- Pacientes con labio hendido con o sin paladar hendido aislado.
- Cualquier género.
- Edad 0-18 años.
- Firma de carta de consentimiento y/o asentimiento informado (Anexo I y III).
- Residencia de la familia en el Distrito Federal o en el Estado de México (zona conurbada) el año anterior al nacimiento del paciente.

Grupo de comparación (controles)

- Personas sin labio paladar hendido aislado o sindrómico.
- Cualquier género.
- Edad 0-18 años.
- Sin participación vigente en otro protocolo de investigación.
- Firma de carta de consentimiento informado o de asentimiento (Anexo II y IV).
- Residencia de la familia en el Distrito Federal o en el Estado de México (zona conurbada) el año anterior al nacimiento del paciente.

CRITERIOS DE EXCLUSION

- Exclusión temporal de pacientes transfundidos en un periodo menor a tres meses.

- Obtención insuficiente de muestra para la obtención de DNA.

DEFINICIONES OPERACIONALES

Factor nutricional de prevención: consumo de nutrientes por la madre que disminuyen el riesgo de presentar malformaciones en el producto. Para el presente estudio factor nutricional de prevención es la ingesta de ácido fólico preconcepcional y/o durante el primer trimestre del embarazo.

Factores ambientales: condiciones no genéticas derivadas del entorno que pueden aumentar o disminuir el riesgo a presentar una enfermedad o malformación de etiología multifactorial.

Factores genéticos: genotipos que pueden aumentar o disminuir el riesgo de presentar una enfermedad o malformación de etiología multifactorial por la presencia de polimorfismos en ciertos genes.

Gen candidato: gen cuya función o producto tiene propiedades bioquímicas que sugieren que la presencia de polimorfismos o mutaciones en él se relacionan con la presencia de una enfermedad o malformación.

Labio con o sin paladar hendido aislado: hendidura orofacial congénita que se origina por una falla en la fusión de las prominencias fronto-nasal y maxilares entre la 4º y 12º semanas de la gestación y no se encuentra asociada con otra anomalía reconocible.

Periodo periconcepcional: tiempo que comprende los tres meses previos al embarazo y el primer trimestre de éste.

Periodo preconcepcional: tiempo que comprende los tres meses previos al embarazo.

Periodo postconcepcional: tiempo que comprende el primer trimestre del embarazo.

Polimorfismo: variante en la secuencia del DNA que se observa en por lo menos el 1% de la población sana. En este estudio los polimorfismos son c.677C>T y c.1298A>C en el gen *MTHFR*.

Teratógeno: agente físico, químico o biológico cuya exposición durante el periodo de organogénesis aumenta la incidencia o produce malformaciones congénitas. En este estudio el antecedente de consumo de alcohol, tabaco y/o medicamentos durante el primer trimestre de la gestación se considera exposición a teratógenos.

Variante menor: alelo con una menor frecuencia en la población.

Variante mayor: alelo con una mayor frecuencia en la población.

TABLA 7. TIPOS DE VARIABLES

Edad	Cuantitativa discreta
Sexo	Cualitativa, dicotómica, nominal
LH o LPH izquierdo, derecho, bilateral	Cualitativa nominal
Lugar de nacimiento	Cualitativa nominal
Edad materna	Cuantitativa discreta
Trabajo de madre en embarazo	Cualitativa, dicotómica, nominal
Padres con LPH	Cualitativa, dicotómica, nominal
Familiares con LPH en primer grado	Cualitativa, dicotómica, nominal
Familiares con LPH en segundo grado	Cualitativa, dicotómica, nominal
Ingesta ácido fólico preconcepcional	Cualitativa, dicotómica, nominal
Acido fólico en 1er. trimestre del embarazo	Cualitativa, dicotómica, nominal
Alcohol en 1er. trimestre del embarazo	Cualitativa, dicotómica, nominal
Medicamentos en 1er. trimestre del embarazo	Cualitativa, dicotómica, nominal
Tabaquismo en 1er. trimestre del embarazo	Cualitativa, dicotómica, nominal

TAMAÑO DE MUESTRA

El tamaño de muestra fue obtenido a través de la utilización del programa Power for Associations With Error ó PAWE (Gordon, et al. 2002). Los parámetros utilizados para la determinación del tamaño de muestra fueron los siguientes: cálculo de muestra para un poder fijo, método libre de modelaje genético, modelo de error de Gordon Heath Liu Ott en donde se asume un error en la asignación de un alelo 1 a un alelo 2 y viceversa de manera excluyente, nivel de significancia de 0.05, nivel de poder 0.95, valores de ϵ del modelo de Gordon, $\epsilon_1 = 0.02$ y $\epsilon_2 = 0.02$, frecuencia más baja del alelo menor de cada polimorfismo en el grupo problema y en el grupo de comparación. La frecuencia más baja descrita del alelo menor (T) del polimorfismo *MTHFR* c.677C>T en el grupo problema fue 0.244 y en el grupo de comparación fue 0.350 (van Rooij, et al. 2003). El análisis se realizó asumiendo que los alelos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg y se obtuvo que el número mínimo de individuos en el grupo problema es de 198, mientras que el número de individuos en el

grupo de comparación debe ser de 397. Para el polimorfismo *MTHFR* c.1298A>C la frecuencia descrita más baja del alelo menor (C) del polimorfismo en el grupo problema fue de 0.419 y en el grupo de comparación fue 0.570 (van Rooij, et al. 2003). El análisis se realizó asumiendo que los alelos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg y se obtuvo que el número mínimo de individuos en el grupo problema es de 111, mientras que el número de individuos en el grupo de comparación es de 222. Las hojas con el reporte de resultados del programa PAWE se encuentran en el anexo VI.

CAPTACION DE CASOS Y CONTROLES

1. *Elección de casos.* Se captaron pacientes de 0-18 años de edad, de cualquier género, con residencia de la familia en el Distrito Federal o en el Estado de México el año anterior a su nacimiento y con diagnóstico de LPHA confirmado por un genetista, en el servicio de Genética Médica, Cirugía Plástica Reconstructiva y Ortodoncia del Instituto Nacional de Pediatría. Se realizó historia clínica completa de cada uno de ellos.
2. *Elección de controles.* El grupo de comparación fue captado en la Unidad de Apoyo a la Investigación Clínica del INP. Este grupo se integró con individuos de 0-18 años de edad, de cualquier género, con residencia de la familia en el Distrito Federal o en el Estado de México el año anterior a su nacimiento que no estuvieran participando en otro protocolo de investigación y que no presentaran malformaciones congénitas.
3. *Firma de carta de consentimiento y/o asentimiento informado.* Posterior a brindarle toda la información sobre el protocolo de investigación a los padres y al niño o joven (caso o control), se solicitó la firma de una carta de consentimiento a los padres y la firma de una carta de asentimiento a los casos o controles \geq de 10 años de edad.
4. *Aplicación de cuestionario.* En ambos grupos se aplicó a la madre un cuestionario sobre los antecedentes heredofamiliares de LPHA, la exposición a teratógenos durante el primer trimestre de la gestación y consumo de ácido fólico preconcepcional y/o durante la gestación (Anexo V).
5. *Toma de muestra.* Se realizó raspado de mucosa oral en el grupo de comparación y en el grupo problema se hizo punción directa para obtener en un tubo con EDTA (anticoagulante) 3-5ml de sangre periférica. La toma de muestra en ambos casos fue única y se identificó con el mismo número del cuestionario y la carta de consentimiento y/o asentimiento informado.

BANCO DE DNA

Una vez tomada la muestra de mucosa oral en el grupo de comparación y de sangre periférica en el grupo problema, se realizó la extracción de DNA mediante la técnica de precipitación salina con el kit Puregene™ (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA) a partir de los leucocitos en sangre periférica y de las células de mucosa oral. Las muestras de DNA obtenidas se conservaron a una temperatura de 4°C hasta su análisis.

GENOTIPIFICACION

Los polimorfismos c.677C>T y c.1298A>C del gen *MTHFR* fueron analizados mediante el método PCR-RFLP, el cual se describe a continuación:

TABLA 8. ESTANDARIZACION DE PCR PARA AMPLIFICAR EL GEN <i>MTHFR</i>		
	Polimorfismo c.677C>T	Polimorfismo c.1298A>C
Buffer	3.0 µl	3.0 µl
MgCl ₂	3.0 µl	3.0 µl
DNTPs	1.0 µl	1.0 µl
Primer F	1.0 µl	1.5 µl
Primer R	1.0 µl	1.5 µl
Taq Gold	0.2 µl	0.2 µl
DNA	4.0 µl	4.0 µl
H ₂ O	16.8 µl	15.8 µl

1. *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*. Inicialmente se realizó la amplificación de ambos polimorfismos mediante PCR en el termociclador Applied Biosystems modelo Gene Amp PCR System 2720, bajo el programa descrito en la tabla 9. La secuencia de los primers utilizados para ambos polimorfismos se muestra en la tabla 10.

TABLA 9. CONDICIONES DEL TERMOCICLADOR APPLIED BIOSYSTEMS MODELO GENE AMP PCR SYSTEM 2720

	Polimorfismo c.677C>T	Polimorfismo c.1298A>C
Desnaturalización inicial	94°C 9 min	94°C 10 min
Desnaturalización	94°C 35 seg	94°C 35 seg
Alineación	66°C 40 seg	62°C 40 seg
Extensión	72°C 35 seg	72°C 35 seg
Extensión final	72°C 10 min	72°C 10 min
	4°C ∞	4°C ∞
	35 ciclos	35 ciclos

TABLA 10. SECUENCIA DE PRIMERS Y ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN PARA LOS POLIMORFISMOS A ANALIZAR POR PCR-RFLP

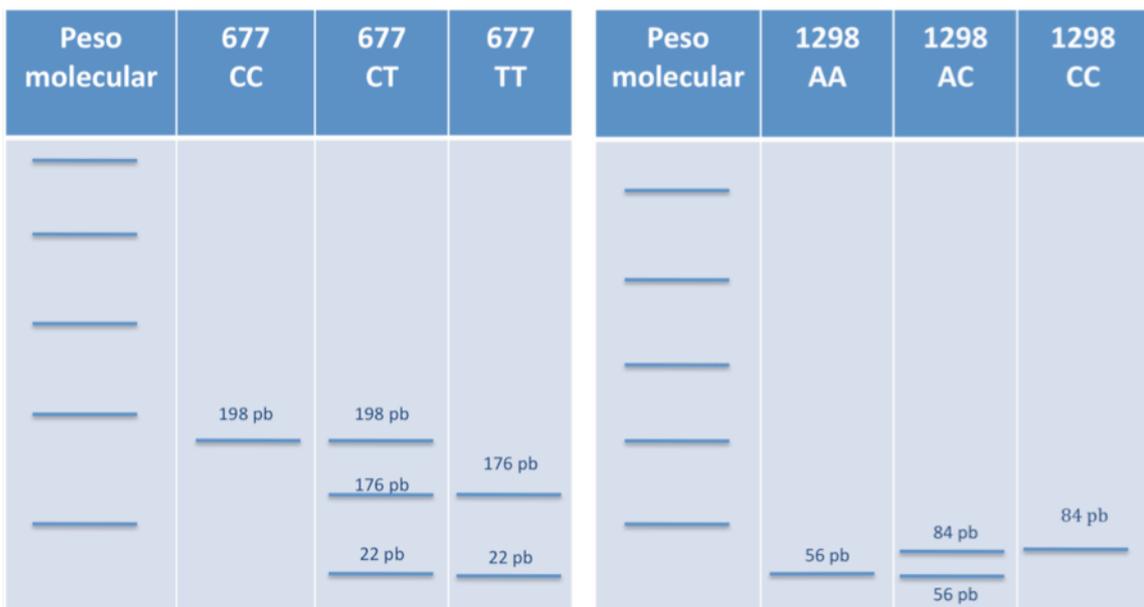
Gen	Polimorfismo	Primer sentido 5'---3'	Primer antisentido 5'---3'	Endonucleasa
MTHFR	c.677C>T	TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA	AGGACGGTGCGGTGAGAGTG	<i>HinFI</i>
MTHFR	c.1298A>C	CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC	CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG	<i>MbolI</i>

2. *Electroforesis del producto de PCR.* Mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio se observó el producto de PCR de los polimorfismos (c.677C>T de 198 pb y c.1298A>C de 173 pb).
3. *Restricción enzimática.* Una vez amplificadas las secuencias a analizar se llevó a cabo la digestión de los productos con enzimas de restricción específicas para determinar la presencia del polimorfismo en estado heterocigoto u homocigoto. El polimorfismo c.677C>T crea un sitio extra de reconocimiento específico (RFLP) para la endonucleasa *HinFI* y el polimorfismo

c.1298A>C elimina un sitio de restricción (RFLP) para la endonucleasa *MbolI*, lo que permite su identificación.

4. *Electroforesis de los productos de digestión.* La diferencia de tamaño de 30 bases entre las bandas de los productos de digestión para ambos polimorfismos permitió su visualización y análisis en un gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio.
5. *Patrones de restricción.* El polimorfismo c.677C>T del gen *MTHFR* en estado homocigoto 677CC (Ala/Ala) se observó como una banda de 198 pb, el estado heterocigoto 677CT (Ala/Val) como tres bandas de 198, 176 y 22 pb y la variante homocigota 677TT (Val/Val) como dos bandas de 176 pb y 22 pb. El patrón resultante para el polimorfismo c.1298A>C en estado homocigoto 1298AA (Glu/Glu) fue de 5 fragmentos (56, 31, 30, 27 y 19 pb), en estado heterocigoto 1298AC (Glu/Ala) de 6 fragmentos (84, 56, 31, 30, 27 y 19 pb) y en la variante homocigota 1298CC (Ala/Ala) de 4 fragmentos (84, 31, 30 y 19 pb). Los fragmentos 84 y 56 pb se pueden identificar en un gel de agarosa al 4%, el resto de las bandas no es posible visualizarlas en el gel por su bajo peso molecular (Figura 7). La técnica elegida para el análisis de estos polimorfismos en *MTHFR* es la descrita por van der Put, et al. 1998.

Figura 7. Patrones de restricción por polimorfismos en el gen *MTHFR*



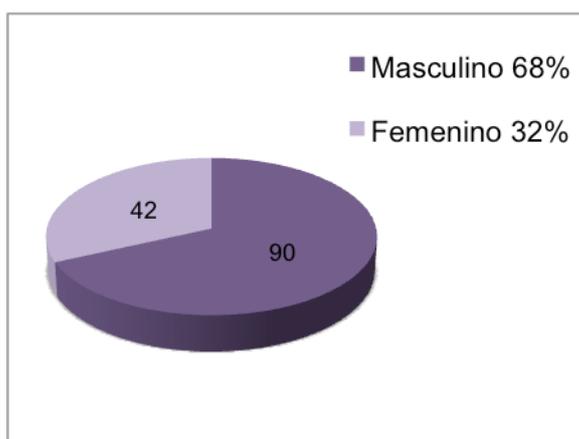
CONSIDERACIONES ETICAS

Este protocolo de investigación se realizó con base en la Declaración de Helsinki, La Ley General de Salud, Las Buenas Prácticas Clínicas y ELSI (del inglés “Ethical, Legal and Social Issues”). Fue aprobado para su realización por parte de los Comités de Investigación y Etica del Instituto Nacional de Pediatría.

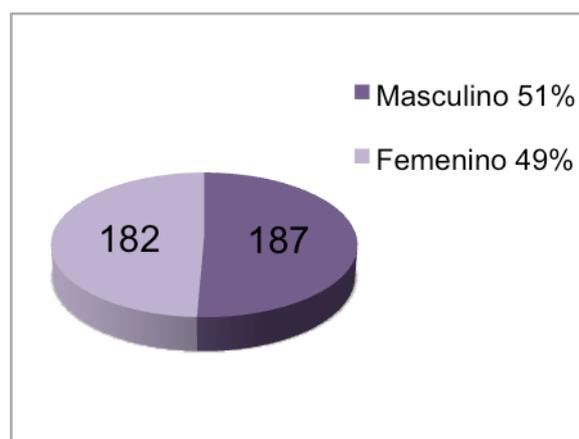
7. RESULTADOS

El presente estudio se realizó en 132 casos con LPHA y 369 controles que acudieron al Instituto Nacional de Pediatría. El 68% de los casos y el 51% de los controles fueron del género masculino como se representa en la gráfica 1 y 2.

Gráfica 1. Género en casos

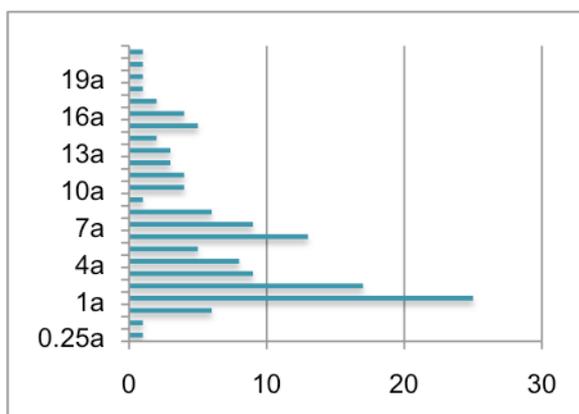


Gráfica 2. Género en controles

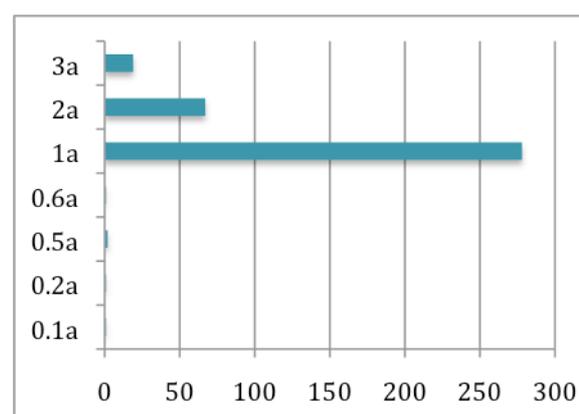


El promedio de edad de los casos fue de 5.7 años (DS 4.97) mientras que el de los controles fue de 1.27 años (DS 0.56) como se muestra en las gráficas 3 y 4.

Gráfica 3. Edad en casos



Gráfica 4. Edad en controles



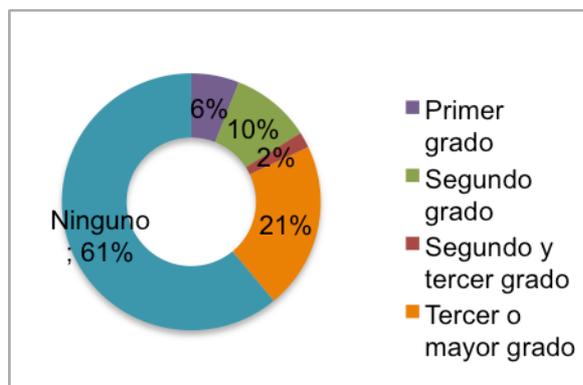
Conforme a los criterios de inclusión todos los casos y los controles nacieron en el Distrito Federal o zona conurbada (Estado de México). Con respecto a los padres y abuelos, tanto de los casos como de los controles, todos fueron mexicanos pero originarios de diferentes estados de la República Mexicana. Sin embargo, en ambos grupos la madre residió en el Distrito Federal o zona conurbada durante el periodo gestacional.

Referente a la lateralidad del defecto se observó que el 44% se presentó del lado izquierdo, el 24% del lado derecho y el 31% en forma bilateral

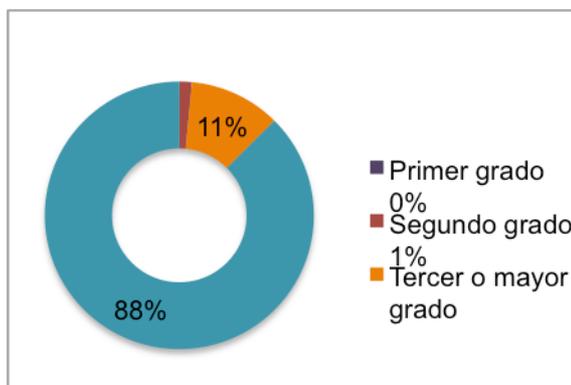
Con relación a la edad materna, el promedio fue 24.84 años (DS 6.45) en el grupo de los casos y 25.68 años (DS 6.61) en el de los controles.

En cuanto a los antecedentes familiares de LPHA se reportó un mayor porcentaje de familiares afectados de primero (6% vs 0%), segundo (10% vs 1%) y tercer o mayor grado (21% vs 11%) en los casos en comparación con los controles, representado en las gráficas 5 y 6.

Gráfica 5. Antecedentes familiares en casos



Gráfica 6. Antecedentes familiares en controles



Al interrogatorio sobre el trabajo de la madre durante el embarazo se identificó que el 37.12% de las madres de los casos y el 31.7% de las madres de los controles sí trabajaron durante la gestación. En el grupo de los casos se mencionaron diferentes actividades laborales, sin embargo no relacionadas a exposición a factores ambientales de riesgo asociados a la presencia de LPHA en el producto; sólo una de las madres mencionó haber estado expuesta a thinner y pinturas tóxicas en una fábrica de reparación de calzado, sin embargo se desconoce si fue en el primer trimestre de gestación o durante toda la gestación.

Dentro de los factores ambientales que se evaluaron en este estudio se encuentra la ingesta de ácido fólico por la madre durante el periodo preconcepcional, periconcepcional o postconcepcional. La diferencia en la frecuencia de consumo de

ácido fólico en los tres periodos en ambos grupos fue muy evidente ya que hubo un menor consumo de ácido fólico peri y postconcepcional en las madres de los casos (46.5%) en comparación con las madres de los controles (74.5%) y es de llamar la atención el bajo consumo de ácido fólico en el periodo periconcepcional en las madres del mismo grupo (1.5% vs 13%) (Tabla 11).

TABLA 11. FRECUENCIAS DE CONSUMO DE ACIDO FOLICO					
PERIODO	NUNCA	PRE CONCEPCIONAL	PERI CONCEPCIONAL	POST CONCEPCIONAL	NR
CASOS	68/132= 51.5%	0=0%	2/132=1.5%	59/132=45%	3/132= 2%
CONTROLES	91/369= 24.5%	4/369=1%	47/369=13%	227/369=61.5%	0=0%

Se calculó el efecto del consumo de ácido fólico pre, peri y postconcepcional en la presentación del LPHA y se obtuvo un OR 0.29 lo que indica que el consumir ácido fólico antes y/o al inicio del embarazo disminuye el riesgo de presentar el defecto (Tabla 12), mientras que el OR para LPHA con vs sin consumo de ácido fólico en el periodo periconcepcional fue de 0.05.

TABLA 12. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN CONSUMO DE ACIDO FOLICO		
	CONSUMO	SIN CONSUMO
CASOS	61	68
CONTROLES	278	91
	OR 0.29 (0.19-0.44) p < 0.0001	

TABLA 13. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN CONSUMO CONSUMO DE ACIDO FOLICO PERICONCEPCIONAL		
	CONSUMO PERICONCEPCIONAL	SIN CONSUMO
CASOS	2	68
CONTROLES	47	91
	OR 0.05 (0.1-0.24) p < 0.0001	

En cuanto a la exposición a agentes teratogénicos se observó que el 30% de las madres de los casos y el 15% de las de controles consumieron medicamentos durante los primeros 3 meses del embarazo. En ambos grupos sólo el 2% ingirió más de un medicamento y sólo se identificó uno (amoxicilina) relacionado con la presencia de LPHA, el cual fue referida su ingesta sólo en una madre de cada grupo.

Otros teratógenos analizados fueron el tabaco y el alcohol. Con respecto al consumo de tabaco, el 8.3% de las madres de los casos y el 7.5% de las madres de los controles fumó al inicio del periodo gestacional. Al comparar las madres que fumaron contra las que no fumaron durante el primer trimestre del embarazo se obtuvo un OR 0.89 no estadísticamente significativo (Tabla 14). El OR para presentar LPHA con vs sin consumo de ácido fólico en las madres con antecedente de tabaquismo en el primer trimestre del embarazo fue 0.53 (Tabla 15).

TABLA 14. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN ANTECEDENTE DE TABAQUISMO EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO

	TABAQUISMO POSITIVO	TABAQUISMO NEGATIVO
CASOS	11	120
CONTROLES	28	341
OR 0.89 (0.43-1.85) p < 0.76		
1 caso sin información sobre el consumo de tabaco		

TABLA 15. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN CONSUMO DE ACIDO FOLICO Y ANTECEDENTE DE TABAQUISMO EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO

ACIDO FOLICO CONSUMO	TABAQUISMO POSITIVO	CASOS	CONTROLES
SIN CONSUMO	POSITIVO	5	17
	POSITIVO	6	11
OR 0.53 (0.13-2.20) p 0.38			

Con relación al alcohol, el 9% de las madres de los casos y el 6.7% de las madres de los controles ingirió bebidas alcohólicas durante el primer trimestre del embarazo. En los dos grupos el tipo de alcohol más frecuentemente consumido fue cerveza (50 vs 52%). El riesgo para LPHA obtenido al comparar a las madres que bebieron alcohol durante el inicio de la gestación con las que no lo hicieron no fue estadísticamente significativo (OR 0.710) (Tabla 16), sin embargo se observa una disminución en el riesgo para LPHA en aquellas madres que a pesar de haber ingerido alcohol consumieron simultáneamente ácido fólico (OR 0.35) (Tabla 17).

TABLA 16. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN INGESTA DE ALCOHOL EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO

	INGESTA	SIN INGESTA
CASOS	12	117
CONTROLES	25	343
OR 0.710 (0.34-1.45) p 0.36		
3 casos y 1 control sin información sobre la ingesta de alcohol		

TABLA 17. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN CONSUMO DE ACIDO FOLICO E INGESTA DE ALCOHOL EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO

ACIDO FOLICO	ALCOHOL	CASOS	CONTROLES
CONSUMO	SI INGESTA	7	20
SIN CONSUMO	SI INGESTA	5	5
OR 0.35 (0.07-1.58) p 0.17			

Se realizó la genotipificación de los polimorfismos c.677C>T y c.1298A>C en el gen *MTHFR* mediante PCR-restricción y electroforesis en geles de agarosa. En la figura 8 se muestra la imagen de los geles de agarosa tras realizar la electroforesis de los dos polimorfismos donde se observan los homocigotos para el alelo mayor y menor, así como los heterocigotos para cada variante.

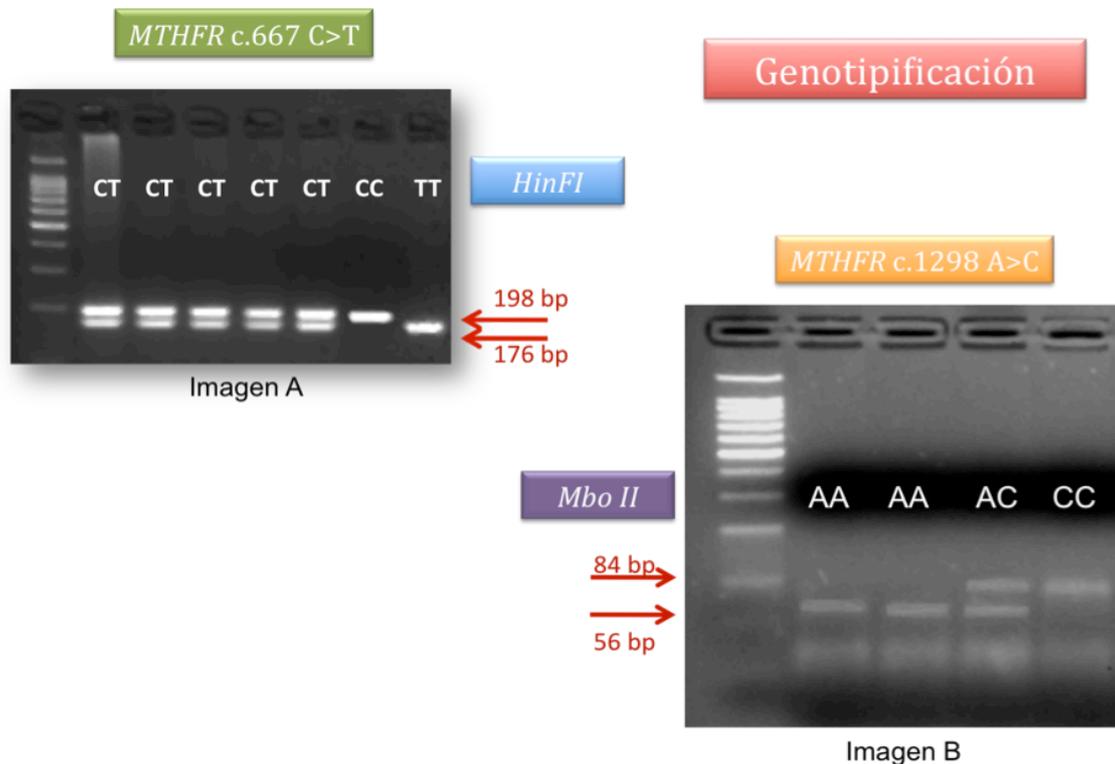


Figura 8. Genotipificación de los polimorfismos c.677C>T y c.1298A>C en el gen *MTHFR*. Imagen A. Gel de agarosa al 4% de los productos de PCR-restricción con la enzima *HinFI*. El polimorfismo c.677C>T en estado homocigoto 677CC se visualiza mediante una banda de 198 pb, en estado heterocigoto 677CT por dos bandas, una de 198pb y una de 176 pb y, en homocigotos 677TT se identifica una banda de 176 pb. Imagen B. Gel de agarosa al 4% de los productos de PCR-restricción con la enzima *MboII* donde se visualiza que el polimorfismo c.1298A>C en estado homocigoto 1298AA se identifica mediante una banda de 56 pb, en estado heterocigoto 1298AC una de 84pb y una de 56 pb y, en los homocigotos 1298CC se observa una banda de 84pb. El resto de los fragmentos originados en ambos polimorfismos no se pueden identificar en un gel de agarosa por su bajo peso molecular.

Los dos polimorfismos analizados en el gen *MTHFR* fueron c.677C>T y c.1298A>C. El cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas de ambas variantes se puede observar en las tablas 18 y 19. La frecuencia del alelo c.677T fue mayor que la del alelo 677C en ambos grupos, siendo más elevada en controles al compararla con los casos. En cuanto al alelo 1298C su frecuencia fue menor que la del alelo 1298A en ambos grupos, siendo similar al compararla entre grupos.

TABLA 18. FRECUENCIAS ALÉLICAS		
ALELO	CASOS	CONTROLES
677 T	0.51	0.62
677 C	0.49	0.38
1298 C	0.14	0.17
1298 A	0.86	0.83

TABLA 19. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS		
GENOTIPO <i>MTHFR</i>	CASOS	CONTROLES
677TT	39/132 (30%)	142/369 (38%)
677CT	55/132 (41%)	172/369 (47%)
677CC	38/132 (29%)	55/369 (15%)
1298CC	4/132 (3%)	16/369 (4%)
1298AC	25/132 (19%)	94/369 (26%)
1298AA	103/132 (78%)	259/369 (70%)

Mediante la prueba exacta de Fisher se compararon los genotipos observados con los esperados, estos últimos obtenidos a través de la fórmula $p^2+2pq+q^2=1$; donde p es la frecuencia del alelo mayor y q la del alelo menor para cada polimorfismo. Se encontró que el polimorfismo c.677C>T estuvo en equilibrio de Hardy-Weinberg en los controles ($\alpha=0.82$) y en los casos ($\alpha=0.056$), al igual que el polimorfismo c.1298A>C tanto en los controles ($\alpha=0.064$) como en los casos ($\alpha=0.11$).

Se analizó el efecto de los alelos para LPHA de los polimorfismos c.677C>T y c.1298A>C en *MTHFR* tanto en estado heterocigoto como en estado homocigoto. Al comparar el efecto del alelo 677T vs el alelo 677C se observó que la presencia de un sólo alelo 677T en el genotipo disminuye el riesgo para presentar LPHA (OR 0.46) y que este alelo en estado homocigoto disminuye aún más el riesgo (OR 0.39). Con respecto al efecto de uno o dos alelos 1298C vs el alelo mayor 1298A no se obtuvo un valor estadísticamente significativo ($p > 0.05$), es decir, no se observó menor o mayor riesgo para presentar LPHA (Tabla 20).

TABLA 20. COMPARACION ENTRE HETEROCIGOTOS Y HOMOCIGOTOS PARA LOS POLIMORFISMOS c.677C>T y c.1298A>C EN EL GEN <i>MTHFR</i> Y RIESGO A PRESENTAR LPHA		
MTHFR 677	CASOS	CONTROLES
CC vs CT	38 vs 55=0.69	55 vs 172=0.32
	OR 0.46 (0.27-0.77) p: 0.00293	
MTHFR 677	CASOS	CONTROLES
CC vs TT	38 vs 39=0.97	55 vs 142=0.38
	OR 0.39 (0.23-0.68) p: 0.00076	
MTHFR 1298	CASOS	CONTROLES
AA vs AC	103 vs 25=4.12	259 vs 94=2.75
	OR 0.66 (0.40-1.01) p: 0.11	
MTHFR 1298	CASOS	CONTROLES
AA vs CC	103 vs 4=25.75	259 vs 16=16.18
	OR 0.629 (0.20-1.92) p: 0.41	

Dado que el LPHA es una entidad multifactorial se realizó el análisis de la interacción de los factores genéticos, en este caso los polimorfismos c.677C>T y c.1298A>C en *MTHFR* y los factores ambientales estudiados: consumo de ácido fólico e ingesta de alcohol y tabaco durante el primer trimestre del embarazo.

Al asociar la presencia de LPHA con consumo vs sin consumo de ácido fólico pre, peri o postconcepcional y el genotipo del polimorfismo c.677C>T no se obtuvo un cambio significativo en el OR con la presencia de uno o dos alelos 677T OR 0.32 (Tabla 21) ni con el alelo 677T en estado homocigoto OR 0.30 (Tabla 22) al compararlo con el OR para LPHA con vs sin consumo de ácido fólico sin considerar el genotipo OR 0.29 (Tabla 12).

TABLA 21. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN CONSUMO DE ACIDO FOLICO Y GENOTIPO CON UNO O DOS ALELOS 677T EN <i>MTHFR</i>			
ACIDO FOLICO	GENOTIPO <i>MTHFR</i>	CASOS	CONTROLES
	677		
CONSUMO	CT + TT	44	234
SIN CONSUMO	CT + TT	47	80
		OR 0.32 (0.19-0.51) p < 0.0001	

TABLA 22. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN CONSUMO DE ACIDO FOLICO Y GENOTIPO CON DOS ALELOS 677T EN *MTHFR*

ACIDO FOLICO	GENOTIPO <i>MTHFR</i>	CASOS	CONTROLES
	677		
CONSUMO	TT	18	106
SIN CONSUMO	TT	20	36
OR 0.30 (0.14-0.64) p < 0.0017			

Al realizar el análisis de la presencia de LPHA con vs sin consumo de ácido fólico pre, peri o postconcepcional y el genotipo del polimorfismo c.1298A>C se obtuvo un cambio significativo en el OR con la presencia de uno o dos alelos 1298C (OR 0.17) (Tabla 23) al compararlo con el OR para LPHA con vs sin consumo de ácido fólico sin considerar el genotipo (OR 0.29) (Tabla 12) y con el efecto de un alelo 1298C (OR 0.66) o dos alelos 1298C (OR 0.62) sin considerar el consumo de ácido fólico (Tabla 20).

TABLA 23. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN CONSUMO DE ACIDO FOLICO Y GENOTIPO CON UNO O DOS ALELOS 1298C EN *MTHFR*

ACIDO FOLICO	GENOTIPO <i>MTHFR</i>	CASOS	CONTROLES
	1298		
CONSUMO	AC + CC	11	85
SIN CONSUMO	AC + CC	18	25
OR 0.17 (0.075-0.43) p < 0.0001			

TABLA 24. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN CONSUMO DE ACIDO FOLICO Y GENOTIPO CON DOS ALELOS 1298C EN *MTHFR*

ACIDO FOLICO	GENOTIPO <i>MTHFR</i>	CASOS	CONTROLES
	1298		
CONSUMO	CC	0	10
SIN CONSUMO	CC	4	6
OR No se puede calcular por falta de casos con consumo de ácido fólico y genotipo con dos alelos 1298C			

En el análisis de asociación de la presencia de LPHA con vs sin el consumo de ácido fólico en periodo periconcepcional y el genotipo con uno o dos alelos 677T se obtuvo un OR de 0.89 (Tabla 25), mayor al OR para LPHA con vs sin consumo de ácido fólico sin considerar el genotipo OR 0.05 (Tabla 13). Pareciera que el genotipo no disminuye el riesgo para LPHA, sin embargo el número de individuos es muy bajo en los grupos.

TABLA 25. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN CONSUMO DE ACIDO FOLICO PERICONCEPCIONAL Y GENOTIPO CON UNO O DOS ALELOS 677T EN *MTHFR*

ACIDO FOLICO	GENOTIPO <i>MTHFR</i> 677	CASOS	CONTROLES
CONSUMO	CT + TT	2	38
SIN CONSUMO	CT + TT	47	80
OR 0.89 (0.02-0.38) p < 0.0001			

TABLA 26. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN CONSUMO DE ACIDO FOLICO PERICONCEPCIONAL Y GENOTIPO CON DOS ALELOS 677T EN *MTHFR*

ACIDO FOLICO	GENOTIPO <i>MTHFR</i> 677	CASOS	CONTROLES
CONSUMO	TT	0	11
SIN CONSUMO	TT	20	36
OR No se puede calcular por falta de casos con consumo de ácido fólico periconcepcional y genotipo con dos alelos 677T			

TABLA 27. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN CONSUMO DE ACIDO FOLICO PERICONCEPCIONAL Y GENOTIPO CON UNO O DOS ALELOS 1298C EN

MTHFR

ACIDO FOLICO	GENOTIPO <i>MTHFR</i>	CASOS	CONTROLES
	1298		
CONSUMO	AC + CC	0	15
SIN CONSUMO	AC + CC	18	25

OR No se puede calcular por falta de casos con consumo de ácido fólico periconcepcional y genotipo con con uno o dos alelos 1298C

TABLA 28. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN CONSUMO DE ACIDO FOLICO PERICONCEPCIONAL Y GENOTIPO CON DOS ALELOS 1298C EN *MTHFR*

ACIDO FOLICO	GENOTIPO <i>MTHFR</i>	CASOS	CONTROLES
	1298		
CONSUMO	CC	0	0
SIN CONSUMO	CC	4	6

OR No se puede calcular por falta de casos y controles con consumo de ácido fólico periconcepcional y genotipo con dos alelos 1298C

Al comparar la presencia de LPHA con vs sin tabaquismo en el primer trimestre del embarazo y el genotipo con uno o dos alelos 677T (Tabla 29) se obtuvo un OR de 0.83, muy similar al obtenido sin considerar el genotipo OR 0.89 (Tabla 14), sin diferencia estadísticamente significativa. Al considerar el alelo 677T sólo en estado homocigoto (Tabla 30) el OR 0.57 fue menor que el obtenido sin tomar en cuenta el genotipo 0.89 (Tabla 14), sin embargo el valor tampoco es estadísticamente significativo.

TABLA 29. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN ANTECEDENTE DE TABAQUISMO EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO Y GENOTIPO CON UNO O DOS ALELOS 677T EN *MTHFR*

TABACO	GENOTIPO <i>MTHFR</i>	CASOS	CONTROLES
	677		
CONSUMO	CT + TT	8	23
SIN CONSUMO	CT + TT	85	291
OR 0.83 (0.36-1.94) p < 0.68			

TABLA 30. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN ANTECEDENTE DE TABAQUISMO EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO Y GENOTIPO CON DOS ALELOS 677T EN *MTHFR*

TABACO	GENOTIPO <i>MTHFR</i>	CASOS	CONTROLES
	677		
CONSUMO	TT	4	9
SIN CONSUMO	TT	34	133
OR 0.57 (0.16-1.98) P < 0.39			

TABLA 31. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN ANTECEDENTE DE TABAQUISMO EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO Y GENOTIPO CON UNO O DOS ALELOS 1298C EN *MTHFR*

TABACO	GENOTIPO <i>MTHFR</i>	CASOS	CONTROLES
	1298		
CONSUMO	AC + CC	0	8
SIN CONSUMO	AC + CC	28	102
OR No se puede calcular por falta de casos con antecedente de tabaquismo materno en el primer trimestre del embarazo y genotipo con uno o dos alelos 1298C			

TABLA 32. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN ANTECEDENTE DE TABAQUISMO EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO Y GENOTIPO CON DOS ALELOS 1298C EN *MTHFR*

TABACO	GENOTIPO <i>MTHFR</i> 1298	CASOS	CONTROLES
CONSUMO	CC	0	0
SIN CONSUMO	CC	4	16

OR No se puede calcular por falta de casos y controles con antecedente de tabaquismo materno en primer trimestre del embarazo y genotipo con dos alelos 1298C

Al comparar la presencia de LPHA con vs sin tabaquismo en el primer trimestre del embarazo con consumo de ácido fólico pre, peri y postconcepcional y el genotipo con uno o dos alelos 677T (Tabla 33) se obtuvo un OR de 0.45, mayor al obtenido sin la ingesta de tabaco OR 0.32 (Tabla 21), sin embargo el valor no es estadísticamente significativo.

TABLA 33. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN ANTECEDENTE DE TABAQUISMO EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO, CONSUMO DE ACIDO FOLICO Y GENOTIPO CON UNO O DOS ALELOS 677T EN *MTHFR*

TABACO	ACIDO FOLICO Y GENOTIPO 677	CASOS	CONTROLES
CONSUMO	CONSUMO DE ACIDO FOLICO, CT + TT	5	13
SIN CONSUMO	CONSUMO DE ACIDO FOLICO, CT + TT	39	221

OR 0.45 (0.15-1.35) p < 0.18

TABLA 34. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN ANTECEDENTE DE TABAQUISMO EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO, CONSUMO DE ACIDO FOLICO Y GENOTIPO CON UNO O DOS ALELOS 1298C EN *MTHFR*

TABACO	ACIDO FOLICO Y GENOTIPO 1298	CASOS	CONTROLES
CONSUMO	CONSUMO DE ACIDO FOLICO, AC + CC	0	6
SIN CONSUMO	CONSUMO DE ACIDO FOLICO, AC + CC	11	79
OR No se puede calcular por falta de casos con antecedente de tabaquismo materno en primer trimestre del embarazo, consumo de ácido fólico y genotipo con uno o dos alelos 1298C			

Se llevó a cabo el análisis de la presencia de LPHA sin vs con consumo de ácido fólico pre, peri y postconcepcional y tabaquismo en el primer trimestre del embarazo y el genotipo con uno o dos alelos 677T (Tabla 35) y se obtuvo un OR de 1.3, mayor al obtenido sin considerar el consumo de ácido fólico OR 0.83 (Tabla 29), sin embargo existe un número muy bajo de individuos en cada grupo y el valor obtenido no es estadísticamente significativo.

TABLA 35. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN CONSUMO DE ACIDO FOLICO, ANTECEDENTE DE TABAQUISMO EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO Y GENOTIPO CON UNO O DOS ALELOS 677T EN *MTHFR*

ACIDO FOLICO	TABACO Y GENOTIPO 677	CASOS	CONTROLES
CONSUMO	SI TABAQUISMO CT + TT	5	13
SIN CONSUMO	SI TABAQUISMO CT + TT	2	7
OR 1.3 (0.2-8.81) p < 0.75			

TABLA 36. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN CONSUMO DE ACIDO FOLICO, ANTECEDENTE DE TABAQUISMO EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO Y GENOTIPO CON UNO O DOS ALELOS 1298C EN *MTHFR*

ACIDO FOLICO	TABACO Y GENOTIPO	CASOS	CONTROLES
	1298		
CONSUMO	SI TABAQUISMO	0	6
	AC + CC		
SIN CONSUMO	SI TABAQUISMO	0	2
	AC + CC		
OR No se puede calcular por falta de casos con y sin consumo de ácido fólico, antecedente de tabaquismo materno en primer trimestre del embarazo y genotipo con uno o dos alelos 1298C			

El OR obtenido para la presencia de LPHA con vs sin ingesta de alcohol en el primer trimestre del embarazo y el genotipo con uno o dos alelos 677T fue de 0.62 (Tabla 37) y considerando el alelo 677T sólo en estado homocigoto (Tabla 38) el OR fue de 0.91; en ambos casos el valor no fue estadísticamente significativo, con relación al OR de 0.71 cuando se considera solo ingesta de alcohol.

TABLA 37. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN INGESTA DE ALCOHOL EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO Y GENOTIPO CON UNO O DOS ALELOS 677T EN *MTHFR*

ALCOHOL	GENOTIPO <i>MTHFR</i>	CASOS	CONTROLES
	677		
INGESTA	CT + TT	9	20
SIN INGESTA	CT + TT	82	293
OR 0.62 (0.27-1.41) p < 0.27			

TABLA 38. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN INGESTA DE ALCOHOL EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO Y GENOTIPO CON DOS ALELOS 677T

EN <i>MTHFR</i>			
ALCOHOL	GENOTIPO <i>MTHFR</i>	CASOS	CONTROLES
	677		
INGESTA	TT	2	7
SIN INGESTA	TT	35	134
OR 0.91 (0.18-4.59) p <0.91			

Para el análisis de la presencia de LPHA con vs sin ingesta de alcohol en el primer trimestre del embarazo y el genotipo con uno o dos alelos 1298C (Tabla 39) no se obtuvo un valor estadísticamente significativo.

TABLA 39. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN INGESTA DE ALCOHOL EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO Y GENOTIPO CON UNO O DOS ALELOS

1298C EN <i>MTHFR</i>			
ALCOHOL	GENOTIPO <i>MTHFR</i>	CASOS	CONTROLES
	1298		
INGESTA	AC + CC	1	5
SIN INGESTA	AC + CC	27	105
OR 1.28 (0.14-11.46) p <0.81			

TABLA 40. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN INGESTA DE ALCOHOL EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO Y GENOTIPO CON DOS ALELOS 1298C

EN <i>MTHFR</i>			
ALCOHOL	GENOTIPO <i>MTHFR</i>	CASOS	CONTROLES
	1298		
INGESTA	CC	0	1
SIN INGESTA	CC	4	15
OR No se puede calcular por falta de casos con ingesta de alcohol y genotipo con dos alelos 1298C			

Al realizar el análisis de la presencia de LPHA con vs sin ingesta de alcohol en el primer trimestre del embarazo con consumo de ácido fólico y el genotipo con uno o dos alelos 677T (Tabla 41) se obtuvo un OR de 0.45, mayor al obtenido sin considerar la ingesta de alcohol OR 0.32 (Tabla 21), sin embargo el valor no es estadísticamente significativo.

TABLA 41. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN INGESTA DE ALCOHOL EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO, CONSUMO DE ACIDO FOLICO Y GENOTIPO CON UNO O DOS ALELOS 677T EN *MTHFR*

ALCOHOL	ACIDO FOLICO Y GENOTIPO	CASOS	CONTROLES
	677		
INGESTA	CONSUMO DE ACIDO FOLICO, CT + TT	6	16
SIN INGESTA	CONSUMO DE ACIDO FOLICO, CT + TT	37	218
OR 0.45 (0.16-1.23) p < 0.14			

TABLA 42. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN INGESTA DE ALCOHOL EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO, CONSUMO DE ACIDO FOLICO Y GENOTIPO CON UNO O DOS ALELOS 1298C EN *MTHFR*

ALCOHOL	ACIDO FOLICO Y GENOTIPO	CASOS	CONTROLES
	1298		
INGESTA	CONSUMO DE ACIDO FOLICO, AC + CC	0	3
SIN INGESTA	CONSUMO DE ACIDO FOLICO, AC + CC	11	82
OR No se puede calcular por falta de casos con ingesta de alcohol en primer trimestre del embarazo, consumo de ácido fólico y genotipo con uno o dos alelos 1298C			

En el análisis de la presencia de LPHA sin vs con consumo de ácido fólico pre, peri y postconcepcional e ingesta de alcohol en el primer trimestre del embarazo y el genotipo con uno o dos alelos 677T (Tabla 43) se obtuvo un OR de 0.37, menor al obtenido sin considerar el consumo de ácido fólico OR 0.62 (Tabla 37), sin embargo

existe un número muy bajo de individuos en los grupos y el valor obtenido no es estadísticamente significativo.

TABLA 43. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN CONSUMO DE ACIDO FOLICO, INGESTA DE ALCOHOL EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO Y GENOTIPO CON UNO O DOS ALELOS 677T EN *MTHFR*

ACIDO FOLICO	ALCOHOL Y GENOTIPO	CASOS	CONTROLES
	677		
CONSUMO	INGESTA DE ALCOHOL, CT + TT	6	16
SIN CONSUMO	INGESTA DE ALCOHOL, CT + TT	4	4
OR 0.37 (0.07-1.99) p < 0.25			

TABLA 44. ODDS RATIO DE PRESENTAR LPHA CON VS SIN CONSUMO DE ACIDO FOLICO, INGESTA DE ALCOHOL EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO Y GENOTIPO CON UNO O DOS ALELOS 1298C EN *MTHFR*

ACIDO FOLICO	ALCOHOL Y GENOTIPO	CASOS	CONTROLES
	1298		
CONSUMO	INGESTA DE ALCOHOL, AC + CC	0	3
SIN CONSUMO	INGESTA DE ALCOHOL, AC + CC	1	2
OR No se puede calcular por falta de casos con consumo ácido fólico, ingesta de alcohol en primer trimestre del embarazo y genotipo con uno o dos alelos 1298C			

En las tablas 24, 26, 27, 28, 31, 32, 34, 36, 40, 42 y 44 se muestran los datos que no pudieron ser analizados por falta de casos y/o controles en los grupos correspondientes.

8. DISCUSION

Dado que el Instituto Nacional de Pediatría es un hospital de tercer nivel y cuenta con un equipo multidisciplinario en el que participa el genetista, se realizó una evaluación completa y adecuada en los casos para seleccionar estrictamente a los pacientes con labio y/o paladar hendido aislado y descartar a aquellos con LPH como parte de un síndrome.

Como era lo esperado por lo descrito en la literatura (Jones 2006; Mossey, et al. 2009), la mayoría de los casos (68%) fue del género masculino con una relación de género de M/F 2:1.

Los casos fueron incluidos durante su seguimiento por la consulta externa de Genética, Ortodoncia y Cirugía Plástica lo que explica que el promedio de edad en este grupo haya sido de 5.7 años, mientras que en el grupo de los controles el promedio de edad fue de 1.27 años ya que fueron captados a través de Unidad de Apoyo a la Investigación Clínica del INP donde se aplica el esquema de vacunación infantil. Dado que el promedio de edad en los dos grupos fue distinto es muy probable que no hayan estado expuestos a factores ambientales similares durante la etapa prenatal o posnatal; por lo que una limitante del presente trabajo es la falta de control de la exposición de factores ambientales en el grupo control vs los casos.

A pesar de haber seleccionado únicamente a los casos y controles originarios del Distrito Federal o zona conurbada (Estado de México) nuestra población de estudio se considera heterogénea. Una estrategia para controlar relativamente los factores ambientales fue seleccionar a casos y controles cuya madre hubiera residido en el Distrito Federal o zona conurbada durante el periodo gestacional.

Con respecto a la lateralidad se obtuvo un mayor porcentaje de casos con LPH unilateral izquierdo (44%) vs derecho (24%) lo cual correlaciona con lo observado previamente (Jones 2006).

Se observó agregación familiar con más frecuencia en el grupo de los casos que en el de los controles (familiares afectados de primer grado 6% vs 0%, segundo grado 10% vs 1% y tercer o mayor grado 21% vs 11%), lo cual se explica debido a que el LPHA es un defecto congénito de etiología multifactorial (Fraser 1970; Thompson 2004).

El porcentaje de madres que trabajó durante su embarazo fue muy similar en ambos grupos y ninguna de las actividades referidas se relacionaron a exposición a factores ambientales de riesgo asociados a la presencia de LPHA en el producto (Mossey, et al. 2009).

LPHA Y ACIDO FOLICO

A pesar de las campañas en el Sector Salud y de la evidencia en la literatura sobre la importancia del consumo periconcepcional de ácido fólico para la prevención de malformaciones congénitas como el LPHA (Badovinac, et al. 2007), en nuestro estudio el porcentaje de ingesta en ambos grupos fue subóptimo, siendo muy bajo en las madres de los casos antes y/o al inicio del embarazo comparada con el grupo control (46.5% vs 74.5%) y menor aún en el periodo periconcepcional en las madres del mismo grupo (1.5% vs 13%)(Tabla 11).

Al calcular el efecto del consumo de ácido fólico en la presentación del LPHA se obtuvo un OR de 0.29 [(0.19-0.44) $p < 0.0001$] (Tabla 12) lo que indica que el consumir ácido fólico (al analizar el consumo pre, peri y postconcepcional en conjunto) disminuye el riesgo de presentar el defecto. Estos hallazgos nos obligan a incidir más en la prevención de la ocurrencia y recurrencia, de ésta y otras malformaciones congénitas, a través de la suplementación con ácido fólico durante el periodo periconcepcional ya que en la literatura se refiere que una mujer que consume algún suplemento con ácido fólico durante ese periodo del embarazo disminuye en un 29% la probabilidad de tener un hijo con LPHA (Badovinac, et al. 2007).

El mecanismo patogénico por el cual la disminución de folato tiene un efecto detrimental aún no se conoce bien. El folato tiene una importancia fundamental en la síntesis de purinas y pirimidinas, las cuales son los componentes básicos del DNA y tRNA. Por lo tanto, una deficiencia en folato puede repercutir en el proceso de multiplicación celular. Por otro lado, la homocisteína es el derivativo no metilado de la metionina, que es, después de su conversión a S-adenosilmetionina, el donador de grupos metilo más importante en el organismo. La hipometilación puede modificar la transcripción de algunos genes que pueden interferir en la morfogénesis del labio y paladar. Una MTHFR menos funcional en la madre puede resultar en un aumento de homocisteína en plasma y llegar hasta el líquido amniótico, donde se desarrolla el producto, a niveles que correlacionan con los de la madre. En este caso, los niveles elevados de homocisteína en el embrión pueden dar lugar a disrupción del desarrollo normal del paladar y a apoptosis inducida por estrés oxidativo (Gaspar, et al. 2004).

En la literatura se menciona que es posible que el uso de multivitamínicos pre o periconcepcional sea un marcador de un buen estado general de salud en la madre o que esté relacionado con hábitos saludables como no fumar o no ingerir alcohol durante el embarazo (Johnson and Little 2008); incluso puede considerarse como un marcador de planeación del embarazo lo cual recientemente se ha asociado inversamente con la presencia de hendiduras orofaciales (Mossey, davies and Little 2007).

LPHA Y TERATOGENOS QUIMICOS

Con respecto a la exposición a agentes teratogénicos farmacológicos se observó que el 30% de las madres de los casos y el 15% de las madres de los controles consumieron medicamentos durante los primeros 3 meses del embarazo. De los medicamentos referidos no se identificó ninguno relacionado con la presencia de LPHA con excepción de la amoxicilina en 1 madre de cada grupo; la ingesta de este antibiótico se ha asociado previamente a la presencia de LPHA en el estudio realizado por Puhó, et al. (2007) con un OR de 15.9 (4.9-51.2), sin embargo en el presente trabajo dado el bajo número de madres con exposición a este teratógeno no se pueden hacer conclusiones al respecto.

En estudios realizados previamente se ha identificado un riesgo elevado para LPHA al consumir tabaco durante el embarazo (Little, Cardy and Munger 2004) lo que ha justificado la realización de campañas anti-tabaquismo. Sin embargo, a pesar de la evidencia que existe en la literatura sobre el efecto teratogénico del tabaco, es de llamar la atención que en la población estudiada en el presente trabajo, el 8.3% (11/132) de las madres de los casos y el 7.5% (28/369) de las madres de los controles fumó al inicio del periodo gestacional, razón por la que consideramos que debemos incidir aún más en brindar información a nuestra población con relación a la prevención del LPHA y otros defectos en el producto de la gestación al evitar por completo el tabaquismo durante la gestación.

En nuestro estudio no se obtuvo un OR estadísticamente significativo para LPHA en las madres que fumaron contra las que no lo hicieron en casos y controles [OR 0.89 (0.43-1.85) $p < 0.76$] (Tabla 14). Sin embargo se observa que el consumo simultáneo de ácido fólico tiende a disminuir el riesgo para LPHA conferido por el tabaquismo de la madre durante el primer trimestre del embarazo [OR 0.53 (0.13-2.20) $p 0.38$] (Tabla 15).

El no haber encontrado asociación entre el consumo de tabaco y LPHA en este estudio puede deberse al tamaño de muestra ya que los efectos de interacción gen-ambiente requieren del análisis de un mayor número de individuos. Además de contar con un tamaño de muestra mayor, también es necesario la medición detallada y precisa de la exposición al tabaco, es decir, se debe determinar el tiempo de exposición y la cantidad de cigarrillos consumidos por la madre durante el embarazo; la falta de esta información es una debilidad del presente estudio, por lo cual probablemente por ello no observamos estadísticamente una relación de riesgo entre tabaquismo y LPH. Por último, es importante considerar en nuestra población en un futuro, el análisis de polimorfismos en otros genes que se han descrito en la literatura

confieren susceptibilidad para presentar LPHA en los niños cuyas madres fumaron durante el embarazo (Shi, Wehby and Murray 2008); como ejemplo están los genes *NAT1* (Lammer, et al. 2004), *EPHX* y *GSTT1* (Shi, et al. 2007).

Otro teratógeno que se ha asociado a un mayor riesgo de presentar LPHA es el alcohol (DeRoo, et al. 2008; Leite and Koifman 2009). En nuestra población el 9% (12/132) de las madres de los casos y el 6.7% (25/369) de las madres de los controles ingirió bebidas alcohólicas durante el primer trimestre del embarazo lo cual llama la atención pues se conocen bien los efectos teratogénicos de éste. En nuestra población tampoco se obtuvo un OR estadísticamente significativo para LPHA en las madres que ingirieron alcohol durante el primer trimestre del embarazo contra las que no lo hicieron [OR 0.710 (0.34-1.45) p 0.36] (Tabla 16), pero sí se obtuvo una disminución en el OR si se tenía el antecedente de consumo de ácido fólico (al analizar el consumo pre, peri y postconcepcional en conjunto) [OR 0.35 (0.07-1.58) p 0.17] (Tabla 17) y aunque los valores no fueron estadísticamente significativos, se ve la tendencia del efecto protector del ácido fólico para LPHA.

En el estudio de Romitti, et al. (2007) (2,484 controles y 596 casos con LPHA) compararon el OR de los casos con LPHA cuyas madres ingirieron alcohol (bebidas destiladas) durante el primer trimestre del embarazo pero sin consumo de ácido fólico (OR 1.8, 0.7-5.0) con relación al OR de los casos cuyas madres tomaron alcohol (bebidas destiladas) pero sí consumieron ácido fólico (OR 1.2, 0.7-2.0); como era de esperarse las mujeres que ingirieron alcohol pero no consumieron ácido fólico tuvieron un mayor riesgo de presentar LPHA, aunque los datos obtenidos por estos autores no fueron estadísticamente significativos. El no haber encontrado asociación en nuestro estudio entre el antecedente de ingesta de alcohol en la madre durante el primer trimestre del embarazo y LPHA es probable que se haya debido al tamaño de muestra que es menor al descrito por Romitti, et al. (2007).

Otro factor a considerar por lo cual no observamos esta asociación en nuestro estudio es la falta de información sobre el tipo de bebida alcohólica, la cantidad consumida en cada ocasión y la frecuencia de exposición a esta sustancia teratogénica, ya que tanto estudios realizados en animales como en humanos sugieren que la dosis consumida de alcohol por episodio, más que la frecuencia o la cantidad total a través del tiempo, es la medición más relevante al analizar los potenciales efectos adversos del alcohol en el feto (Gladstone, Nulman and Koren 1996).

LPHA Y POLIMORFISMOS EN *MTHFR*

En este estudio los dos polimorfismos analizados fueron c.677C>T y c.1298A>C en el gen *MTHFR*, los cuales se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg tanto en los controles como en los casos.

LPHA Y FRECUENCIAS ALELICAS c.677C>T

El polimorfismo c.677C>T se encuentra distribuido de manera heterogénea alrededor del mundo con la frecuencia del alelo 677T más alta en México y más baja en Africa y, un gradiente de sur a norte en Europa. En el estudio realizado por Guéant-Rodriguez, et al. (2006) en 1277 adultos jóvenes sanos originarios de la Ciudad de México, Oeste de Africa (Bénin y Togo), Francia e Italia (Sicilia) se reportaron las frecuencias alélicas de los polimorfismos c.677C>T y c.1298A>C. Para el alelo 677T la frecuencia fue de 9% en el Oeste de Africa, 36.1% en Francia, 47.3% en Italia y 58% en la Ciudad de México; estas frecuencias son muy similares a la obtenida en el grupo control de este estudio (62%).

En el presente trabajo, al ser menor la frecuencia del alelo 677T en los casos (51%) que en los controles (62%) (Tabla 18) pareciera que en esta población de estudio la presencia del alelo 677T disminuye el riesgo para presentar LPHA, lo cual ha sido mencionado previamente (Chevrier, et al. 2007). Por otro lado, Zhu, et al. (2006) al estudiar el polimorfismo c.677C>T en 170 tríos chinos también observaron una moderada asociación entre la presencia de labio hendido con o sin paladar hendido con el genotipo 677TT (OR 6.31, 1.35-29.48) y el genotipo 677CT (OR 5.63, 1.18-26.92) en familias del norte de China, más no en la población del sur de este país (OR 0.41, 0.13-1.34 con genotipo 677TT y OR 1.46, 0.74-2.86 con genotipo 677CT). De acuerdo a nuestros resultados, consideramos que se requiere en un futuro aumentar el tamaño de nuestra muestra para establecer si la asociación que observamos con el alelo 677T se mantiene como posible protector para LPHA.

El presente resultado difiere a lo descrito en la mayoría de los estudios de asociación de LPHA y el polimorfismo c.677C>T, en los cuales no observan un alelo de riesgo con la presencia de LPHA, incluso en estudios previos se ha sugerido que el 677T, a diferencia de lo que se observa en estudios de defectos de tubo neural, no aumenta el riesgo para LPHA cuando está presente en la madre (van Rooij, et al. 2003, Gaspar, et al. 2004, Nurk, et al. 2004) o en el niño (Shaw et al. 1998, Shotelersuk, et al. 2003, Gaspar, et al. 2004), aunque ninguno alcanzó diferencia estadísticamente significativa.

Con respecto al paladar hendido solo (PHS), en el estudio de Jugessur, et al. (2003) encontraron que los niños con uno o dos alelos 677T obtuvieron mayor riesgo para presentar este defecto; con una copia del alelo 677T el RR fue de 2.1 (1.2-3.6) y con

dos copias del alelo 677T el RR fue de 1.7 (0.7-5.4); el genotipo materno no contribuyó al riesgo. Mills, et al. (1999) observaron que en la población irlandesa el genotipo 677TT es significativamente más frecuente en aquellos con paladar hendido solo (PHS) y obtuvieron un OR de 3.23 (CI 95%1.32-7.86, p 0.02). En el presente trabajo no contamos con casos con PHS por lo que la asociación con los polimorfismos génicos no se llevó a cabo.

LPHA Y FRECUENCIAS ALELICAS c.1298A>C

La distribución de la variante c.1298A>C en *MTHFR* es menos conocida. Las frecuencias del alelo 1298C reportadas en diferentes poblaciones por Guéant-Rodriguez, et al. (2006) fueron 13.9% en el Oeste de Africa, 35.7% en Francia, 28.1% en Italia y 14.7% en la Ciudad de México, esta última muy similar a la obtenida en los controles de esta población de estudio (17%).

Pezzetti, et al. (2004) sugieren que la presencia del alelo 1298C pudiera conferir cierta protección contra el LPHA pues la frecuencia del alelo 1298C en su estudio fue más baja en los casos (0.28) que en los controles (0.36) a diferencia de la frecuencia del alelo 677T que fue mayor en los casos (0.48) que en los controles (0.41), en el análisis de haplotipo se observó desequilibrio de ligamiento completo entre los dos marcadores ($\chi^2=327.94$, 3 df, $P<10^{-5}$). Se ha demostrado que el polimorfismo c.677C>T (van der Put, et al. 1998) tiene mayor impacto que c.1298A>C en la actividad específica de la enzima MTHFR y éste último tiene poco o ningún efecto en los niveles plasmáticos de homocisteína y folato. Con base en esto se propone que el polimorfismo c.1298A>C no se encuentra directamente relacionado al riesgo para presentar LPHA sino tal vez por un efecto secundario debido al desequilibrio de ligamiento con c.677C>T o posiblemente con otra mutación responsable de la malformación (Pezzetti, et al. 2004, Jagomagi, et al. 2010). En este estudio la frecuencia del alelo 1298C fue ligeramente menor en casos (0.14) que en controles (0.17), sin embargo la frecuencia del alelo 677T fue mayor en los controles (0.62) que en los casos (0.51) por lo que no existe una correlación de nuestros resultados con lo descrito por Pezzetti, et al. (2004).

LPHA Y FRECUENCIAS GENOTIPICAS DE *MTHFR*

Con respecto a las frecuencias genotípicas, Guéant-Rodriguez, et al. (2006) reportaron el genotipo 677TT en el 35% y el 1298CC en el 2.3% de los individuos de la Ciudad de México (n=300), frecuencias muy semejantes a las determinadas en nuestra población siendo el 38% 677TT y el 4% 1298CC. En este estudio la frecuencia del genotipo 677TT fue mayor en los controles que en los casos (38% vs 30%) lo cual no apoya lo

observado por Tolarova, et al. (1998) quienes analizaron el polimorfismo c.677C>T en pacientes con LPHA originarios de Argentina y observaron que la homocigocidad (TT) era tres veces más frecuente en casos que en los controles y por Mills, et al. (1999) quienes realizaron un estudio de casos y controles en Irlanda y encontraron que el genotipo 677TT en *MTHFR* fue más frecuente en los pacientes con LPHA que en los controles.

En este estudio al analizar el efecto del genotipo con la presencia del LPHA, se observó que el alelo 677T en estado heterocigoto u homocigoto, a diferencia del alelo 1298C, modifica el riesgo para presentar LPHA, dado que al tener el alelo 677T en estado heterocigoto disminuye el riesgo para presentar LPHA [OR 0.46, (0.27-0.77) p 0.00293] mientras que en estado homocigoto parece que lo disminuye aún más [OR 0.39 (0.23-0.68) p 0.00076]. Con respecto al efecto de uno o dos alelos 1298C en el riesgo para LPHA no se obtuvo un valor estadísticamente significativo ($p > 0.05$) (Tabla 20).

En la literatura existen múltiples estudios de asociación entre estos dos polimorfismos en *MTHFR* y la presencia de LPHA, unos apoyan los resultados de este estudio pero la mayoría difieren al no observar asociación con LPHA. Dentro de los que presentan evidencia a favor de este trabajo se encuentra el estudio de Jugessur, et al. (2003) en el que se observa un RR para LPHA menor cuando el niño tiene un genotipo con dos alelos 677T (RR 0.74, CI 0.34-1.69) que cuando sólo tiene un alelo 677T (RR 1.05, CI 0.72-1.54), aunque los resultados no son estadísticamente significativos. Chevrier, et al. (2007) también obtuvieron un OR menor con el genotipo 677TT (OR 0.54, CI 0.3-1.1) que con el genotipo 677CT (OR 0.65, CI 0.4-1.1) en los niños, sin embargo sus resultados tampoco son estadísticamente significativos. Igualmente, Shaw, et al. (1998) estudiaron un grupo de niños hispanos en el cual el OR obtenido para LPHA con genotipo 677TT fue menor (OR 0.65, CI 0.28-1.5) que con genotipo 677CT (OR 1.1, CI 0.58-2.0) y Zhu, et al. (2006) en la población del sur de China obtuvieron un OR menor para LPHA con el genotipo 677TT (OR 0.41, CI 0.13-1.34) en comparación con el genotipo 677CT (OR 1.46, CI 0.74-2.86), en ambos estudios los resultados no fueron estadísticamente significativos. En el primer estudio de Mills, et al., (1999) se concluyó que en la población irlandesa la homocigocidad de la variante c.677C>T que confiere termolabilidad a la enzima MTHFR es significativamente más frecuente en aquellos con paladar hendido aislado, más no en LPHA, lo cual podría ser etiológicamente importante; sin embargo en un estudio posterior (Mills, et al., 2008) al aumentar el tamaño de muestra observaron que la variante c.677C>T no es un factor de riesgo para LPHA (OR 1.08, 0.78-1.50) ni para PHS (OR 0.96, 0.64-1.43).

Con respecto a la presencia del polimorfismo c.677C>T en las madres, Martinelli, et al. (2001) observaron una frecuencia significativamente mayor en la frecuencia del alelo 677T en las madres de los casos con respecto a las de los controles. Así mismo, en el estudio de van Rooij, et al. (2003) se menciona que el genotipo materno de *MTHFR* parece tener mayor efecto en la presencia de LPHA que el genotipo del niño y el del padre pues la falta de consumo de folato periconcepcional y el genotipo materno 677TT o 128CC aumenta de 10 a 6 veces respectivamente el riesgo para presentar LPHA; este hallazgo parece ser lógico ya que la madre provee el ambiente del embrión durante su desarrollo y el embrión es totalmente dependiente de los niveles de folato de su madre. Igualmente, los resultados obtenidos en el estudio de Shotelersuk, et al. (2003) indican un posible involucro de la vía del folato con la presencia del LPHA y apoyan la influencia del genotipo materno más que el efecto del genotipo del embrión y, aunque la presencia independiente de los polimorfismos c.677C>T y c.1298A>C disminuye la actividad enzimática de la *MTHFR*, la heterocigosidad compuesta de c.677C>T y c.1298A>C es la que se ha asociado a un nivel más elevado de homocisteína y baja concentración de folato en sangre. En este trabajo no se analizó esta asociación ya que no se llevó a cabo el análisis genético en los progenitores de los casos y controles.

En contra de la información anterior, en el meta-análisis realizado por Verkleij-Hagoort, et al. (2007) (10 estudios de casos y controles) se obtuvo para el polimorfismo c.677C>T un OR de 1.2 (0.9-1.5) en las madres y 1.0 (0.9-1.2) en los niños, lo cual no apoya la asociación entre el polimorfismo c.677C>T en la madre o en los casos y un aumento en el riesgo para presentar LPHA.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo no muestran asociación de uno o dos alelos 1298C con la presencia de LPHA como lo descrito en la mayoría de los estudios en la literatura realizados previamente (Tolarova, et al. 1998; Grunert, et al. 2002; Shotelersuk, et al. 2003; van Rooij, et al. 2003; Nurk, et al. 2004; Pezzetti, et al. 2004), en particular el meta-análisis de Verkleij-Hagoort, et al. (2007) en el que se obtuvo para el polimorfismo c.1298A>C un OR de 1.0 (0.7-1.2) en las madres y 0.9 (0.6-1.2) en los niños, por lo que no se observa asociación entre el riesgo para presentar LPHA y el polimorfismo c.1298A>C en estado homocigoto o heterocigoto ni en los niños o en las madres.

LPHA, GENOTIPO EN *MTHFR* Y FACTORES AMBIENTALES

En este estudio se trató de analizar la interacción de ambos polimorfismos en *MTHFR* y tres de los factores ambientales relacionados con LPHA (alcohol, tabaco y ácido fólico).

En las tablas 29, 30, 33, 35, 37, 38, 39, 41 y 43 se muestran los resultados del análisis de interacciones entre los polimorfismos c.677C>T o c.1298A>C en *MTHFR* y factores ambientales como la ingesta de teratógenos (alcohol, tabaco) y el consumo de ácido fólico. En la literatura no se encuentran estudios de asociación que reporten todas las interacciones analizadas en este estudio por lo que los hallazgos no se pueden comparar con otras poblaciones, sin embargo algunos de nuestros hallazgos se discuten más adelante.

Es importante recalcar que en el análisis del efecto de los factores genéticos y ambientales con la presencia de LPHA, así como de la interacción gen-ambiente con LPHA, algunos cálculos no fueron estadísticamente significativos o no se pudieron realizar por falta de individuos (Tablas 34, 36, 40, 42, 44) o por un número bajo de casos y/o controles (Tablas 33, 35, 37, 38, 39, 41, 43). Consideramos que si el número de individuos expuestos a los teratógenos (alcohol, tabaco) en nuestra población hubiera sido mayor, se habrían obtenido resultados con un mayor poder estadístico por lo que se tiene contemplado continuar este trabajo con la finalidad de aumentar el tamaño de muestra (<http://www.statsoft.com/textbook/power-analysis>), para poder establecer si existen interacción gen-ambiente con LPHA.

LPHA, GENOTIPO EN MTHFR Y CONSUMO DE ACIDO FOLICO

El OR obtenido en el análisis de asociación de la presencia de LPHA sin vs con consumo de ácido fólico (al considerar consumo pre, peri y postconcepcional en conjunto) con la presencia de uno o dos alelos 677T fue de 0.32 [(0.19-0.51) $p < 0.0001$] (Tabla 21) y con el alelo 677T en estado homocigoto fue de 0.30 [(0.14-0.64) $p < 0.0017$] (Tabla 22). Estos datos mostraron una disminución del OR comparados con los resultados obtenidos al considerar el alelo 677T en estado heterocigoto [OR 0.46 (0.27-0.77) $p: 0.00293$] y en estado homocigoto [OR 0.39 (0.23-0.68) $p: 0.00076$], sin considerar el consumo de ácido fólico (Tabla 20); esto sugiere una disminución en el riesgo para LPHA si se consume ácido fólico y se tiene uno o dos alelos 677T. van Rooij, et al. (2003) obtuvieron resultados con una tendencia similar al observar una disminución en el OR para LPHA cuando el niño presentó un genotipo con el alelo 677T en estado heterocigoto y hubo consumo de ácido fólico por la madre (OR 1.3, CI 0.5-3.1) que cuando no hubo consumo del suplemento (OR 1.7, CI 0.7-3.9); también se obtuvo una disminución en el OR con el alelo 677T en estado homocigoto en el niño cuando la madre consumió ácido fólico (OR 2.4, CI 0.5-12.3) que cuando no lo ingirió (OR 3.5, CI 0.3-42.4); sin embargo los valores no son estadísticamente significativos como los del presente estudio. Nuestros datos nos indican la necesidad de aumentar el tamaño de muestra para definir si persiste esta observación.

Al realizar el análisis de la presencia de LPHA sin vs con consumo de ácido fólico (al considerar consumo pre, peri y postconcepcional en conjunto) y el genotipo del polimorfismo c.1298A>C se obtuvo un cambio significativo en el OR con la presencia de uno o dos alelos 1298C [OR 0.17 (0.075-0.43) $p < 0.0001$] (Tabla 23) al compararlo con el OR para LPHA con vs sin consumo de ácido fólico sin considerar el genotipo [OR 0.29 (0.19-0.44) $p < 0.0001$] (Tabla 12) y con el efecto de un alelo 1298C (OR 0.66, 0.40-1.01) o dos alelos 1298C (OR 0.62, 0.20-1.92) sin considerar el consumo de ácido fólico (Tabla 18). Esto sugiere un efecto protector del alelo 1298C combinado con el consumo del ácido fólico con la presencia de LPHA.

Lo obtenido en este estudio es contrario a lo observado en el estudio de van Rooij, et al. (2003), donde se reportó un aumento en el OR cuando el niño tuvo genotipo 1298CC y la madre consumió ácido fólico durante el embarazo que cuando no consumió el suplemento [OR 2.7 (0.5-14.3) y OR 1.7 (0.5-5.8) respectivamente]. Por otro lado, el OR sí disminuyó cuando el genotipo del niño fue 1298AC y la madre consumió ácido fólico, que cuando no lo consumió [OR 1.0 (0.4-2.6) y OR 1.8 (0.7-4.5) respectivamente]. Sin embargo, ninguno de los valores es estadísticamente significativos. Es importante mencionar que el trabajo de van Rooij, et al. (2003) es el único estudio que analiza al igual que nosotros la presencia de LPHA sin vs con consumo de ácido fólico y el genotipo del polimorfismo c.1298A>C, aunque la población analizada fue menor en número (92 casos y 110 controles) que la de este estudio.

LPHA, GENOTIPO c.677C>T Y TABAQUISMO

En este estudio al analizar el tabaquismo materno en el primer trimestre del embarazo junto con el genotipo de la variante c.677C>T en *MTHFR* se obtuvo un OR de 0.83 [(0.36-1.94) $p < 0.68$] con uno o dos alelos 677T (Tabla 29) y de 0.57 [(0.16-1.98) $P < 0.39$] con el alelo 677T en estado homocigoto (Tabla 30); en ambos casos el OR fue menor al obtenido tomando en cuenta el tabaquismo sin considerar el genotipo [OR 0.89 (0.43-1.85) $p < 0.76$] (Tabla 14) lo cual sugiere un efecto protector del alelo 677T aún ante la exposición de la madre al teratógeno, aunque los resultados no presentaron diferencia estadísticamente significativa parece que el efecto es mayor al ser homocigoto TT.

Asimismo los OR para LPHA con vs sin antecedente de tabaquismo en la madre y genotipo con uno o dos alelos 677T y sólo el alelo 677T en estado homocigoto [OR 0.83 (0.36-1.94) $p < 0.68$] (Tabla 29) y OR 0.57 (0.16-1.98) $P < 0.39$ (Tabla 30), respectivamente] fueron mayores que los OR para LPHA con genotipo con uno o dos alelos 677T y con el genotipo 677TT sin considerar el antecedente de tabaquismo

materno [OR 0.46 (0.27-0.77) p 0.00293 y OR 0.39 (0.23-0.68) p: 0.00076 (Tabla 20), respectivamente]; estos datos aunque sin diferencia estadísticamente significativa nos sugieren que el tabaquismo tiende a elevar el riesgo para el defecto aún con la presencia de uno o dos alelos 677T.

La interacción del efecto del polimorfismo c.677C>T en *MTHFR* con el tabaquismo materno durante el embarazo intentó ser estudiada por Beaty, et al. (2002) en casos con LPHA en población de Estados Unidos pero debido a que no se encontró asociación entre este polimorfismo y LPHA no se realizó al análisis de interacción con el tabaquismo como se hizo con otros polimorfismos de genes candidatos para LPHA que sí mostraron asociación. No existe más evidencia en la literatura de la interacción polimorfismo c.677C>T en *MTHFR* con el tabaquismo materno que nos permita comparar nuestra población con otras.

LPHA, GENOTIPO c.677C>T, CONSUMO DE ACIDO FOLICO Y TABAQUISMO

Al comparar la presencia de LPHA con vs sin tabaquismo en el primer trimestre del embarazo considerando sólo a las madres que sí tuvieron consumo de ácido fólico y el genotipo con uno o dos alelos 677T se obtuvo un OR de 0.45 [(0.15-1.35) p < 0.18] (Tabla 33), aunque el valor no es estadísticamente significativo es mayor al obtenido tomando en cuenta el genotipo y el consumo de ácido fólico sin la ingesta de tabaco [OR 0.32 (0.19-0.51) p < 0.0001] (Tabla 21); esto apoya el aumento en el riesgo para LPHA que confiere el tabaquismo en el primer trimestre del embarazo. Al comparar las tablas 35 y 21 también se observa la tendencia del tabaquismo materno a aumentar el riesgo para LPHA, aunque algunos valores no son estadísticamente significativos.

Llama la atención que en el análisis de la presencia de LPHA con vs sin consumo de ácido fólico con antecedente de tabaquismo materno y genotipo con uno o dos alelos 677T se calculó un OR de 1.3 [(0.2-8.81) p < 0.75] (Tabla 35), mayor al calculado sin considerar el consumo de ácido fólico OR 0.83 [(0.36-1.94) p < 0.68] (Tabla 29), lo que sugiere un efecto de riesgo del ácido fólico como se observó en el estudio de Jugessur, et al., (2003). En este caso el hecho de que estos resultados sean contradictorios, dado que se esperaba un efecto protector del ácido fólico, puede deberse a que en nuestro estudio tenemos un número pequeño de individuos tanto en el grupo de los casos como de los controles en este análisis; es importante mencionar que se deben realizar más estudios para poder establecer realmente el efecto de la interacción del tabaquismo, el polimorfismo c.677C>T y el consumo de ácido fólico. Desafortunadamente no existe evidencia en la literatura de la interacción entre el genotipo c.677C>T, la ingesta de ácido fólico y el tabaquismo que nos permita comparar nuestra población con otras; sin embargo si es claro el efecto teratogénico

del tabaquismo independientemente del genotipo por lo que debemos seguir fomentando en nuestra población el no exponerse a este teratógeno durante gestación (Shi, Wehby, & Murray, 2008).

LPHA, GENOTIPO c.1298A>C Y TABAQUISMO

El OR para presentar LPHA con vs sin antecedente de tabaquismo materno en el primer trimestre del embarazo y el genotipo con uno o dos alelos 1298C (Tabla 31) desafortunadamente no se pudo calcular por falta de casos con genotipo con uno o dos alelos 1298C cuya madre haya fumado en el primer trimestre del embarazo.

Tampoco fue posible obtener el OR para LPHA con vs sin antecedente de tabaquismo materno y genotipo homocigoto para el alelo 1298C (Tabla 32) por falta de casos y controles para este análisis.

La interacción del tabaquismo materno durante el primer trimestre del embarazo con el polimorfismo c.1298A>C, en estado hetero u homocigoto, no se ha reportado en la literatura por lo que no es posible conocer el comportamiento en otras poblaciones.

LPHA, GENOTIPO c.677C>T E INGESTA DE ALCOHOL

El OR para LPHA con vs sin ingesta de alcohol y el genotipo con uno o dos alelos 677T [OR 0.62 (0.27-1.41) $p < 0.27$] (Tabla 37) fue menor que el OR para LPHA con vs sin ingesta de alcohol en el primer trimestre del embarazo sin considerar el genotipo [OR 0.710 (0.34-1.45) $p 0.36$] (Tabla 16); aunque este resultado no es estadísticamente significativo, apoya la hipótesis del efecto protector del alelo 677T para LPHA. Sin embargo, llama la atención que el OR para LPHA con vs sin ingesta de alcohol en el primer trimestre del embarazo con el alelo 677T en estado homocigoto [OR 0.91 (0.18-4.59) $p < 0.91$] (Tabla 38) fue mayor que con uno o dos alelos 677T (Tabla 37); este hallazgo pudiera explicarse porque los valores no son estadísticamente significativos y es difícil considerar estos resultados reales dado el bajo número de individuos con los que contábamos con las variables analizadas, estos hallazgos nuevamente nos indican la necesidad de aumentar nuestro tamaño de muestra.

El OR obtenido para la presencia de LPHA con vs sin ingesta de alcohol en el primer trimestre del embarazo y el genotipo con uno o dos alelos 677T fue de 0.62 [(0.27-1.41) $p < 0.27$] (Tabla 37), que a pesar de no ser estadísticamente significativo es mayor al obtenido considerando solamente el genotipo de la variante c.677C>T en *MTHFR* [OR 0.46 (0.27-0.77) $p 0.00293$] (Tabla 20), datos que sugieren que el alcohol aumenta el riesgo para LPHA.

LPHA, GENOTIPO c.677C>T, CONSUMO DE ACIDO FOLICO E INGESTA DE ALCOHOL

El OR para LPHA al tomar en cuenta el consumo de ácido fólico, la ingesta de alcohol en el primer trimestre del embarazo y el genotipo con uno o dos alelos 677T [OR 0.45 (0.16-1.23) $p < 0.14$] (Tabla 41) fue menor al obtenido sin considerar el consumo de ácido fólico [OR 0.62 (0.27-1.41) $p < 0.27$] (Tabla 37), y a pesar de que los valores no son estadísticamente significativos se evidencia la tendencia del ácido fólico a disminuir el riesgo para presentar LPHA. Igualmente al comparar la tabla 43 con la 37, aunque los resultados obtenidos no fueron estadísticamente significativos, se observó que el consumo de ácido fólico tiende a disminuir el riesgo para presentar LPHA cuando la madre tiene un genotipo con uno o dos alelos 677T en *MTHFR* a pesar de que ingirió alcohol durante el primer trimestre del embarazo.

En la literatura no se han reportado estudios sobre la interacción entre el genotipo c.677C>T, el consumo de ácido fólico y la ingesta de alcohol durante el primer trimestre del embarazo, por lo que no es posible comparar nuestra población con otras; sin embargo el efecto teratogénico de la ingesta de alcohol durante la gestación (Leite & Koifman, 2009) y el efecto protector del ácido fólico para LPHA (Romitti, et al., 2007) ha sido descrito en la literatura independiente del genotipo del individuo.

LPHA, GENOTIPO c.1298A>C E INGESTA DE ALCOHOL

En el análisis de la presencia de LPHA con vs sin ingesta de alcohol en el primer trimestre del embarazo y el genotipo con uno o dos alelos 1298C (Tabla 39) no se obtuvo un valor estadísticamente significativo [OR 1.28 (0.14-11.46) $p < 0.81$] sin embargo se observa que es mayor que el OR para LPHA considerando sólo el genotipo 1298AC [OR 0.66 (0.40-1.01) $p: 0.11$] (Tabla 20), lo que muestra una tendencia del alcohol a aumentar el riesgo para LPHA.

Es de llamar la atención que el OR para LPHA con vs sin ingesta de alcohol en el primer trimestre del embarazo sin considerar el genotipo de la variante c.1298A>C [OR 0.710 (0.34-1.45) $p 0.36$] (Tabla 16) es menor que al considerar el genotipo con uno o dos alelos 1298C [OR 1.28 (0.14-11.46) $p < 0.81$] (Tabla 39), lo cual sugiere que el alelo 1298C aumenta el riesgo para LPHA al combinarse con el consumo de alcohol al contrario que el alelo 677T. No existe evidencia en la literatura que nos permita comparar este hallazgo con otras poblaciones.

9. **CONCLUSIONES**

- I. La mayoría de los casos fue del género masculino (M/F 2:1) y con respecto a la lateralidad se obtuvo un mayor porcentaje de casos con LPH unilateral izquierdo vs derecho, lo cual se correlaciona con lo observado en la literatura.
- II. Nuestra población de estudio se considera heterogénea a pesar de haber seleccionado únicamente a los casos y controles originarios del Distrito Federal o zona conurbada (Estado de México).
- III. La agregación familiar fue mayor en el grupo de los casos que en el de los controles dado que el LPHA es un defecto congénito de etiología multifactorial.
- IV. Debido al bajo consumo de ácido fólico pre, peri y postconcepcional observado en nuestra población se requiere incidir aún más en las campañas sobre la importancia del consumo periconcepcional de ácido fólico para disminuir el riesgo de ocurrencia y recurrencia de malformaciones congénitas como LPHA.
- V. En nuestra población llama la atención la exposición a teratógenos en las madres como tabaco y alcohol por lo que se debe continuar la difusión de sus efectos y promover el evitar exponerse a ellos por completo durante todo el embarazo pues existe evidencia de que aumentan el riesgo para presentar LPHA.
- VI. Aunque la exposición a agentes teratogénicos farmacológicos durante el primer trimestre del embarazo se reportó en el 30% de las madres de los casos y en el 15% de las madres de los controles, el número de casos y controles identificados con ingesta de medicamentos que se han asociado a LPHA fue muy bajo (una en cada grupo).
- VII. En nuestro estudio no se observó un mayor riesgo para presentar LPHA con antecedente de tabaquismo ni de ingesta de alcohol por la madre durante el primer trimestre del embarazo lo cual puede deberse al tamaño de muestra y/o a la falta de medición detallada y precisa de la exposición a ambos teratógenos, esto último consideramos es una debilidad del presente trabajo.
- VIII. En los resultados obtenidos en nuestra población de estudio se sugiere que el aumento en el riesgo para LPHA por el antecedente de tabaquismo y/o la ingesta de alcohol por la madre durante el primer trimestre del embarazo puede disminuir con el consumo de ácido fólico.
- IX. En el presente trabajo se estudio la asociación con los polimorfismos c.677C>T y c.1298A>C en el gen *MTHFR* y LPHA pero como no contamos con casos con PHS no se llevó a cabo la asociación de éste con estos polimorfismos génicos.

- X. El polimorfismo c.677C>T se encuentra distribuido de manera heterogénea alrededor del mundo con la frecuencia del alelo 677T más alta en México, lo cual se confirmó con la frecuencia obtenida en nuestro grupo control (62%).
- XI. Al ser menor la frecuencia del alelo 677T en los casos (51%) que en los controles (62%) pareciera que en esta población de estudio la presencia del alelo 677T disminuye el riesgo para presentar LPHA, resultado que difiere con lo descrito en la mayoría de los estudios de asociación de LPHA y el polimorfismo c.677C>T, en los cuales no se observa que el alelo 677T aumente o disminuya el riesgo para LPHA.
- XII. La distribución de la variante c.1298A>C en *MTHFR* en la Ciudad de México (14.7%) previamente descrita es muy similar a la obtenida en los controles de esta población de estudio (17%).
- XIII. En este estudio la frecuencia del genotipo 677TT fue mayor en los controles que en los casos (38% vs 30%) lo cual no apoya lo reportado en otras (Tolarova, et al., 1998; Mills, et al., 1999) donde encontraron que el genotipo 677TT en *MTHFR* fue más frecuente en los pacientes con LPHA que en los controles.
- XIV. En este estudio al analizar el efecto del genotipo con la presencia del LPHA, se observó que el tener el alelo 677T en estado homocigoto disminuye más el riesgo para presentar LPHA que en estado heterocigoto.
- XV. Con respecto al efecto de uno o dos alelos 1298C en el riesgo para LPHA, al igual que lo reportado en otras poblaciones, no se observó asociación en este estudio.
- XVI. En la literatura existen múltiples estudios de asociación entre estos dos polimorfismos en *MTHFR* y la presencia de LPHA, unos apoyan los resultados de este estudio pero la mayoría difieren al no observar asociación con LPHA.
- XVII. Dado que el polimorfismo c.677C>T en el gen *MTHFR* se ha sugerido como factor de protección o de riesgo para LPHA y, la evidencia en la literatura es inconsistente aún, existe la necesidad de continuar este estudio para aumentar el tamaño de muestra y definir si nuestras observaciones persisten.
- XVIII. En esta etapa del estudio no se analizó el genotipo de los padres en *MTHFR* dado que no se ha reportado en la literatura asociación de LPHA con los polimorfismos c.677C>T y c.1298A>C en los padres, sin embargo se valorará en un futuro estudiar el genotipo parental como se ha realizado en otros estudios.
- XIX. En la literatura no se encuentran estudios de asociación que reporten todas las interacciones entre los polimorfismos c.677C>T o c.1298A>C en *MTHFR* y

factores ambientales (alcohol, tabaco y ácido fólico) que fueron analizadas en este estudio por lo que la mayoría de nuestros hallazgos no se pudieron comparar con otras poblaciones.

- XX. Consideramos que si el número de individuos expuestos a los teratógenos (alcohol, tabaco) en nuestra población hubiera sido mayor, se habrían obtenido resultados con un mayor poder estadístico por lo que se aumentará el tamaño de muestra para poder establecer si existen interacción gen-ambiente con LPHA en nuestra población.
- XXI. Con base en nuestros resultados se sugiere que el riesgo para LPHA disminuye con el consumo de ácido fólico (análisis realizado en conjunto de consumo pre, peri y postconcepcional) y el genotipo con uno o dos alelos 677T.
- XXII. El resultado del análisis de la presencia de LPHA sin vs con consumo de ácido fólico (al considerar consumo pre, peri y postconcepcional en conjunto) y el genotipo del polimorfismo c.1298A>C sugiere un efecto protector del alelo 1298C combinado con el consumo del ácido fólico en la presencia de LPHA en esta población de estudio, sin embargo difiere a lo observado en el único estudio de la literatura que ha realizado este análisis (van Rooij, et al., 2003).

ANEXO III

ESTUDIO DE ASOCIACION DE LABIO PALADAR HENDIDO CON POLIMORFISMOS DE GENES CANDIDATOS

CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO: Grupo problema

México, D. F., a ___ de _____ de 20__

Por medio de esta carta acepto que yo, _____ estoy de acuerdo en participar en el proyecto "ESTUDIO DE ASOCIACION DE LABIO PALADAR HENDIDO CON POLIMORFISMOS DE GENES CANDIDATOS", que se realiza en el Instituto Nacional de Pediatría. Se me explicó y entendí que para este estudio, se requiere responder un cuestionario, del cual la información será confidencial y una muestra de sangre periférica de 3 ml (una cucharita cafetera), la cual será tomada con todos los requisitos de seguridad: material nuevo y guantes y será practicado por personal con amplia experiencia en la toma de muestra.

Me informaron que de esta muestra se obtendrá el material genético heredado por mis padres (DNA) y que determina mis características físicas y del cual se analizarán regiones que pueden estar implicadas en un mayor riesgo de presentar Labio paladar hendido, ya que este estudio busca establecer la posibilidad de conocer mejor las causas genéticas que contribuyen a nacer con esta enfermedad.

También me dijeron que toda información obtenida del análisis de la muestra para este estudio es absolutamente confidencial y que mi participación es completamente voluntaria, por lo que si no deseo participar mi atención médica no será afectada.

Atentamente,

_____	_____	_____
Paciente	Firma	Fecha
_____	_____	_____
Padre o Tutor	Firma	Fecha
_____	_____	_____
Nombre Testigo	Dirección	Fecha y Firma
Obtuvo el asentimiento: _____	_____	_____
	Nombre	Fecha

Médico responsable: Dra. Ariadna González del Ángel Depto. Genética, Laboratorio de Biología Molecular. Tel. 10840900 ext. 1306.

ANEXO IV

ESTUDIO DE ASOCIACION DE LABIO PALADAR HENDIDO CON POLIMORFISMOS DE GENES CANDIDATOS

CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO: Grupo de Comparación

México, D. F., a ___ de _____ de 20__

Por medio de esta carta acepto que yo, _____ estoy de acuerdo en participar en el proyecto "ESTUDIO DE ASOCIACION DE LABIO PALADAR HENDIDO CON POLIMORFISMOS DE GENES CANDIDATOS", que se realiza en el Instituto Nacional de Pediatría. Se me explicó y entendí que para este estudio, se requiere responder un cuestionario, del cual la información será confidencial y una muestra de mucosa oral, la cual será tomada con todos los requisitos de seguridad: material nuevo y guantes y será practicado por personal con amplia experiencia en la toma de muestra.

Me informaron que de esta muestra se obtendrá el material genético heredado por mis padres (DNA) y que determina mis características físicas y del cual se analizarán regiones que pueden estar implicadas en un mayor riesgo de presentar Labio paladar hendido, ya que este estudio busca establecer la posibilidad de conocer mejor las causas genéticas que contribuyen a nacer con esta enfermedad.

También me dijeron que toda información obtenida del análisis de la muestra para este estudio es absolutamente confidencial y que mi participación es completamente voluntaria, por lo que si no deseo participar mi atención médica no será afectada.

Atentamente,

_____	_____	_____
Paciente	Firma	Fecha

_____	_____	_____
Padre o Tutor	Firma	Fecha

_____	_____	_____
Nombre Testigo	Dirección	Fecha y Firma

Obtuvo el asentimiento: _____

_____	_____
Nombre	Fecha

Médico responsable: Dra. Ariadna González del Ángel Depto. Genética, Laboratorio de Biología Molecular. Tel. 10840900 ext. 1306.

ANEXO V

Cuestionario de exposición a factores ambientales

I. Datos Generales

1. Nombre del niño _____
2. Nombre de la madre _____
3. Sexo 1.M___ 2.F___ 3.1 LH/LPH (I/D)_____ 4. Edad _____ (años)
5. Lugar de origen
Caso índice _____ Madre _____ Padre _____
Abuelo Materno _____ Abuela Materna _____
Abuelo Paterno _____ Abuela Paterna _____
6. ¿Residió el año anterior del nacimiento en el D.F o Edo. Mex? 1. Si 2.No
7. Edad de la madre al nacimiento del caso índice _____
8. Institución tratante _____ 9. No. de expediente _____
10. ¿Trabajó durante su embarazo?
0. No 1.Sí ¿En qué trabajó? _____

II. Antecedentes familiares

11. ¿Alguno de los padres nació con LPH? 0. No 1. Sí
2. Madre _____ 3. Padre _____
12. ¿En la familia existe el antecedente de LPH? 0. No 1. Sí
- Parentesco _____

III. Ingesta de ácido fólico

13. ¿Consumió un suplemento vitamínico durante los seis meses anteriores al embarazo? Sí Especifique _____ (Nombre o Marca) No Recuerda
 No → (pasar a 18)

14. ¿Durante qué meses ANTES del embarazo consumió el suplemento vitamínico? (encierre en un círculo): 1 2 3 ≥4

15. ¿Con qué frecuencia lo consumía? 1. Diario
 2. Semanalmente
 3. Mensualmente
 4. Menos de una vez al mes

16. ¿Cuál era la dosis de su suplemento? _____ 0.No recuerda

17. ¿Cuánto consumía? 0. No recuerda 1. Tabletas

18. ¿Consumió un suplemento vitamínico durante los primeros tres meses de embarazo?

Sí Especifique _____ (Nombre o Marca) 0. No recuerda

No → (pasar a 23)

19. ¿Durante que meses del embarazo consumió el suplemento vitamínico? (encierre en un círculo) 1 2 3 4 5 6 7 8 9

20. ¿Con qué frecuencia lo consumía? 1. Diario
 2. Semanalmente
 3. Mensualmente
 4. Menos de una vez al mes

21. ¿Cuál era la dosis de su suplemento? _____ 0.No recuerda

22. ¿Cuánto consumía? 0. No recuerda 1. Tabletas

IV. Exposición a teratógenos

23. ¿Consumió medicamentos o drogas durante los primeros tres meses del embarazo?

Sí No

Especifique el medicamento:

Mes 1 ¿Cuál? _____ 0. No recuerda

¿Cuál era la dosis del medicamento? _____ 0. No recuerda

Mes 2 ¿Cuál? _____ 0. No recuerda

¿Cuál era la dosis del medicamento? _____ 0. No recuerda

Mes 3 ¿Cuál? _____ 0. No recuerda

¿Cuál era la dosis del medicamento? _____ 0. No recuerda

24. ¿Fumó durante los primeros tres meses de embarazo?

Sí

No → (pasar a la 26)

25. ¿Cuántos cigarros fumó en promedio durante estos 3 meses?

Por día _____ Por mes _____

26. ¿Consumió alcohol durante los tres primeros meses de embarazo?

Sí

No → (pasar a la 30)

27. ¿Qué tipo de bebida alcohólica ingirió? (Ejemplo: Cerveza, vino, tequila, otro?)

28.- ¿Con qué frecuencia consumió alcohol durante ese periodo?

29. ¿Qué cantidad ingirió por ocasión? (Ejemplo: botellas, copas, otro?)

30. ¿Considera que exista algo relevante sobre su embarazo, usted o su familia que desee comentar?

ANEXO VI

PAWE version 1.2, February 2003

Written by Derek Gordon

Assisted by Michael Nothnagel

CALCULO DE MUESTRA PARA *MTHFR* C.677C>T

MINIMUM SAMPLE SIZE FOR FIXED POWER

Sig. Level: 0.050000

Power: 0.950000

Noncentrality parameter, Allelic Test: 12.994707

Noncentrality parameter, Genotypic Test: 15.443233

DATA WITHOUT ERROR

Minimal Sample Size Cases for Allelic Test: 189

Minimal Sample Size Controls for Allelic Test: 379

Minimal Sample Size Cases for Genotypic Test: 226

Minimal Sample Size Controls for Genotypic Test: 453

DATA WITH ERROR

Minimal Sample Size Cases for Allelic Test: 198

Minimal Sample Size Controls for Allelic Test: 397

Minimal Sample Size Cases for Genotypic Test: 237

Minimal Sample Size Controls for Genotypic Test: 475

Percent sample size increase for Allelic Test, Error versus Errorless: 4.78

Percent sample size increase for Genotypic Test, Error versus Errorless: 4.75

CALCULO DE MUESTRA PARA *MTHFR* c.1298A>C

MINIMUM SAMPLE SIZE FOR FIXED POWER

Sig. Level: 0.050000

Power: 0.950000

Noncentrality parameter, Allelic Test: 12.994707

Noncentrality parameter, Genotypic Test: 15.443233

DATA WITHOUT ERROR

Minimal Sample Size Cases for Allelic Test: 107

Minimal Sample Size Controls for Allelic Test: 213

Minimal Sample Size Cases for Genotypic Test: 129

Minimal Sample Size Controls for Genotypic Test: 257

DATA WITH ERROR

Minimal Sample Size Cases for Allelic Test: 111

Minimal Sample Size Controls for Allelic Test: 222

Minimal Sample Size Cases for Genotypic Test: 134

Minimal Sample Size Controls for Genotypic Test: 268

Percent sample size increase for Allelic Test, Error versus Errorless: 4.13

Percent sample size increase for Genotypic Test, Error versus Errorless: 4.07

11. BIBLIOGRAFIA

1. Ali, A., Singh, S., & Raman, R. (2009). MTHFR 677TT alone and IRF6 820GG together with MTHFR 677CT, but not MTHFR A1298C, are risks for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in an Indian population. *Genet Test Mol Biomarkers*, 13 (3), 355-60.
2. Andaloro, V., Monaghan, D., & Rosenquist, T. (1998). Dextromethorphan and other N-methyl-D-aspartate receptor antagonists are teratogenic in the avian embryo model. *Pediatr Res* (43), 1-7.
3. Badovinac, R., Werler, M., Williams, P., & Kelsey, K. H. (2007). Folic Acid-Containing Supplement Consumption during Pregnancy and Risk for Oral Clefts: A Meta-Analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 79, 8-15.
4. Beaty, T., Hetmanski, J., Zeiger, J., YT, F., Liang, K., VanderKolk, C., y otros. (2002). Testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design. *Genetic Epidemiology*, 22, 1-11.
5. Blanco-Dávila, F. (2003). Incidence of cleft lip and palate in the northeast of Mexico: a 10-year study. *J Craniofac Surg*, 14 (4), 533-7.
6. Blanton, S., Kolle, B., Hecht, J., Mulliken, J., & Martin, E. (2000). No evidence supporting MTHFR as a risk factor in the development of familial NSCLP. *AM J Med Genet*, 92 (5), 370-1.
7. Botto, L., & Yang, Q. (2000). 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, 151 (9), 862-77.
8. Boyles, A., Wilcox, A., Taylor, J., Meyer, K., Fredriksen, A., Ueland, P., y otros. (2008). Folate and one-carbon metabolism gene polymorphisms and their associations with oral facial clefts. *Am J Med Genet A*, 146 (4), 440-449.
9. Brandalize, A., Bandinelli, E., Borba, J., Félix, T., Roisenberg, I., & 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.
10. Briggs, R. (1976). Vitamin supplementation as a possible factor in the incidence of cleft lip/palate deformities in humans. *Clin Plast Surg*, 3, 647-52.
11. Cartwright, M., & Smith, S. (1995). Stage-dependent effects of ethanol on cranial neural crest cell development: partial basis for the phenotypic variations observed in fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res*, 19, 1454-62.
12. Castilla, E., Lopez-Camelo, J., & Campaña, H. (1999). Altitude as a risk factor for congenital anomalies. *Am J Med Genet*, 86 (1), 9-14.
13. Chen, S., & Sulik, K. (1996). Free radicals and ethanol-induced cytotoxicity in neural crest cells. *Alcohol Clin Exp Res*, 20, 1071-6.
14. Chen, S., Yang, B., Jacobson, K., & Sulik, K. (1996). The membrane disordering effect of ethanol on neural crest cells in vitro and the protective role of GM1 ganglioside. *Alcohol*, 13, 589-95.
15. Chevrier, C., Perret, C., Bahuaui, M., Zhu, H., Nelva, A., Herman, C., y otros. (2007). Fetal and maternal MTHFR C677T genotype, maternal folate intake and the risk of nonsyndromic oral clefts. *Am J Med Genet A*, 143A, 248-257.
16. Cobourne, M. (2004). The complex genetics of cleft lip and palate. *Eur J Orthod*, 26 (1), 7-16.
17. Croen, L., Shaw, G., Wasserman, C., & Tolarová, M. (1998). Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California, 1983-1992. *Am J Med Genet*, 79 (1), 42-7.
18. Czeizel, A. (1993). Prevention of congenital abnormalities by periconceptional multivitamin supplementation. *BMJ*, 306, 1645-8.
19. Dávalos-Rodríguez, I., Ramírez-Lizardo, E., Mena, J., Ledezma-Rodríguez, V., Omayra-Dávalos, N., González-Mercado, M., y otros. (2009). Variante C677T del gen metileno-tetrahidrofolato reductasa en niños mexicanos con labio/paladar hendido no sindrómico. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 47 (5), 549-552.
20. Dean, L., Moore, S., Osborne, A., Howe, J., & Turnpenny, P. (1999). Fetal anticonvulsivant syndrome and mutation in the maternal MTHFR gene. *Clin Genet*, 56, 216-220.

21. den Dunnen, J., & Antonarakis, S. (2000). Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* , 15, 7-12.
22. DeRoo, L., Wilcox, A., Drevon, C., & Lie, R. (2008). First-trimester maternal alcohol consumption and the risk of infant oral clefts in Norway: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol* , 158, 638-646.
23. Endriga, M., & Kapp-Simon, K. (1999). Psychological issues in craniofacial care: state of the art. *Cleft Palate Craniofac J* , 36 (1), 3-11.
24. Exalto, N., Cohen-Overbeek, T., van Adrichem, L., Oudesluijs, G., Hoogeboom, A., & Wildschut, H. (2009). Prenatally detected orofacial cleft. *Ned Tijdschr Geneesk* , 153, B316.
25. Farrall, M., & Holder, S. (1992). Familial recurrence-pattern analysis of cleft lip with or without cleft palate. *Am J Hum Genet* , 50, 270-277.
26. Firth, H., Hust, J., & Hall, J. (2005). *Oxford Desk Reference: Clinical Genetics*. Oxford University Press.
27. Fraser, F. (1970). The genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Hum Genet* , 22 (3), 336-352.
28. Friso, S., Choi, S., Girelli, D., Mason, J., Dolnikowski, G., Bagley, P., y otros. (2002). A common mutation in the 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *PNAS* , 99 (8), 5606-5611.
29. Frosst, P., Blom, H., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C., Matthews, R., y otros. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* , 10, 111-113.
30. Gaspar, D., Matioli, S., Pavanello, R., Araújo, B., Alonso, N., Wyszynski, D., y otros. (2004). Maternal MTHFR interacts with the offspring's BCL3 genotypes, but not with TGFA, in increasing risk to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Hum Genet* , 12, 521-526.
31. Gaughan, D., Barboux, S., Kluijtmans, L., & Whitehead, A. (2000). The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene* , 31, 279-89.
32. Gladstone, J., Nulman, I., & Koren, G. (1996). Reproductive risks of binge drinking during pregnancy. *Reprod Toxicol* , 10, 3-13.
33. Goldstein, L., Dewhirst, M., Repacholi, M., & Kheifets, L. (2003). Summary, conclusions and recommendations: adverse temperature levels in the human body. *Int J Hyperthermia* , 19, 373-384.
34. Gordon, D., Finch, S., Nothnagel, M., & Ott, J. (2002). Power and sample size calculations for case-control genetic association tests when errors are present: application to single nucleotide polymorphisms. *Hum Hered* , 54, 22-33.
35. Gorlin, R., Cohen, M., & Hennekam, R. (2001). *Syndromes of the Head and Neck*. USA: Oxford University Press.
36. Goyette, P., Pai, A., Milos, R., Frosst, P., Tran, P., Chen, Z., y otros. (1998). Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* , 9, 652-656.
37. Grunert, R., Braune, A., Schnackenberg, E. S., & Krause, H. (2002). Genetic differences in enzymes of folic acid metabolism in patients with lip-jaw-palate clefts and their relatives. *Mund Kiefer Gesichtschir* , 6 (3), 131-3.
38. Guéant-Rodriguez, R., Guéant, J., Debard, R., Thirion, S., Hong, L., Bronowicki, J., y otros. (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 (3), 701-7.
39. Guttormsen, A., Ueland, P., Nesthus, I., Nygard, O., Schneede, J., Vollset, S., y otros. (1996). Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (equal to or greater than 40 micromole/liter): the Hordaland homocysteine study. 98, 2174-2183.
40. Hashmi, S., Gallaway, M., Waller, D., Langlois, P., & Hecht, J. (2010). Maternal Fever During Early Pregnancy and the Risk of Oral Clefts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* , 88, 186-194.
41. Hernández-Díaz, S., Werler, M., & Walker, A. (2000). Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med* , 343, 1608-14.

42. Holmes, L., Baldwin, E., Smith, C., Habecker, E., Glassman, L., Wong, S., y otros. (2008). Increase frequency of isolated cleft palate in infants exposed to lamotrigine during pregnancy. *Neurology* , 70, 2152-2158.
43. Itikala, P., Watkins, M., Mulinare, J., Moore, C., & Liu, Y. (2001). Maternal multivitamin use and orofacial clefts in offspring. *Teratology* , 63 (2), 79-86.
44. Jagomagi, T., Nikopensius, T., Krjutskov, K., Tammekivi, V., Viltrop, T., Saag, M., y otros. (2010). MTHFR and MSX1 contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. *Eur J Oral Sci* , 213-220.
45. Jensen, B., Kreiborg, S., Dahl, E., & Fogh-Andresen, P. (1988). Cleft lip and palate in Denmark, 1976-1981: epidemiology, variability and early somatic development. *Cleft Palate J* , 25 (3), 258-69.
46. Johnson, C., & Little, J. (2008). Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *Int J Epidemiol* , 37, 1041-1058.
47. Jones, M. (2006). Lips. En R. Stevenson, & J. Hall, *Human Malformations and Related Anomalies* (Vol. 2, págs. 391-404). Oxford University Press.
48. Jugessur, A., & Murray, J. (2005). Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev* , 15 (3), 270-278.
49. Jugessur, A., Wilcox, A., Lie, R., Murray, J., Taylor, J., Ulvik, A., y otros. (2003). 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.
50. Keyon, S., Nicolau, A., & Gibbons, W. (1998). The effect of ethanol and its metabolites upon methionine synthase activity in vitro. *Alcohol* , 15, 305-9.
51. Kotch, L., & Sulik, K. (1992). Experimental fetal alcohol syndrome: proposed pathogenic basis for a variety of associated facial and brain anomalies. *Am j Med Genet* , 44, 168-76.
52. Kumar, J., Das, S., Sharma, P., Karthikeyan, G., Ramakrishnan, L., & Sengupta, S. (2005). Homocysteine levels are associated with MTHFR A1298C polymorphism in Indian population. *J Hum Genet* , 50, 655-663.
53. Lammer, E., Shaw, G., Iovannisci, D., Van Waes, J., & Finnell, R. (2004). Maternal smoking and orofacial clefts susceptibility with NAT1 and NAT2 polymorphisms. *Epidemiology* , 15, 150-156.
54. Leite, I., & Koifman, S. (2009). Oral clefts, consanguinity, parental tobacco and alcohol use: case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz Oral Res* , 23 (1), 31-7.
55. Lettieri, J. (1993). Lips and Oral Cavity. En R. Stevenson, J. Hall, & R. Goodman, *Human Malformations and Related Anomalies* (Vol. 2, págs. 367-381). Oxford University Press.
56. Lie, R., Wilcox, A., Taylor, J., Gjessing, H., Saugstad, O., Aabyholm, F., y otros. (2008). Maternal smoking and oral clefts: the role of detoxification pathway genes. *Epidemiology* , 19 (4), 606-615.
57. Little, J., Cardy, A., & Munger, R. (2004). Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Bull World Health Organ* , 82, 213-218.
58. Martinelli, M., Scapoli, L., Pezzetti, F., Carinci, F., Francioso, F., Baciliero, U., y otros. (2001). Linkage analysis of the three candidate regions of chromosome 1 in nonsyndromic familial orofacial cleft. *Ann Hum Genet* , 65, 465-471.
59. McAndrew, P., Brandt, J., Pearl, D., & Prior, T. (1996). The incidence of the gene for thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in African Americans. *Thromb Res* , 83, 195-198.
60. Mills, J., Kirke, P., Molloy, A., Burke, H., Conley, M., Lee, Y., y otros. (1999). Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. *Am J Med Genet* , 86, 71-74.
61. Mills, J., Molloy, A., Parle-McDermott, A., Troendle, J., Brody, L., Conley, M., y otros. (2008). Folate-related gene polymorphisms as a risk factors for cleft lip and cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* , 82 (9), 636-643.
62. Mitchell, L., & Christensen, K. (1996). Analysis of the recurrence patterns for nonsyndromic cleft lip with or without palate in the families of 3,073 Danish probands. *Am J Med Genet* , 61 (4), 371-6.
63. Mitchell, L., & Risch, N. (1992). Mode of inheritance of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a reanalysis. *Am J Hum Genet* , 51 (2), 323-332.

64. Mossey, P., Little, J., Munger, R., Dixon, M., & Shaw, W. (2009). Cleft lip and palate. *Lancet*, 374, 1773-85.
65. Mossey, P., davies, J., & Little, J. (2007). Prevention of orofacial clefts: does pregnancy planning have a role? *Cleft Plate Craniofac J*, 44, 244-50.
66. Mote, V., & Anderson, R. (1965). An investigation of the effect of misclassification on the properties of chi-2-tests in the analysis of categorical data. *Biometrika*, 52, 95-109.
67. Motowska, A., Hozyasz, K., Wojcicki, P., Biedziak, B., Paradowska, P., & Jagodzinski, P. (2010). Association between genetic variants of reported candidate genes or regions and risk of cleft lip with or without palate in the Polish population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 88, 538-545.
68. Nurk, E., Tell, G., Refsum, H., Ueland, P., & Vollset, S. (2004). Associations between maternal metylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and adverse outcomes of pregnancy: The Hordaland homocysteine study. *Am J Med*, 117, 26-31.
69. Pérez-Molina, J., Alfaro-Alfaro, N., Angulo-Castellanos, E., & Nario-Castellanos, J. (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*, 50 (2), 110-3.
70. Pezzetti, F., Martinelli, M., Scapoli, L., Carinci, F., Palmieri, A., Marchesini, J., y otros. (2004). Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat*, 24, 104-105.
71. Pradat, P., Robert-Gnansia, E., Di Tanna, G., Rosano, A., Lisi, A., Mastroiacovo, P., y otros. (2003). First trimester exposure to corticosteroids and oral clefts. *Birth Defects Research (Part A)*, 67, 968-970.
72. Prescott, N., Winter, R., & Malcolm, S. (2002). Maternal MTHFR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet*, 39, 368-369.
73. Puhó, E., Szunyogh, M., Métneki, J., & Czeizel, A. (2007). Drug treatment during pregnancy and isolated orofacial clefts in Hungary. *Cleft Palate Craniofac J*, 44 (2), 194-202.
74. Romitti, P., Sun, L., Honein, M., Reefhuis, J., Corre, A., Rasmussen, S., y otros. (2007). Maternal periconceptional alcohol consumption and risk of orofacial clefts. *Am J Epidemiol*, 166 (7), 775-785.
75. Rosenquist, T., Ratashak, S., & Selhub, J. (1996). Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 15227-32.
76. Rosenquist, T., Schneider, A., & Monogham, D. (1999). N-methyl-D-aspartate receptor agonists modulate homocysteine-induced developmental abnormalities. *FASEB J*, 13, 1523-31.
77. Shaw, G., Lammer, E. W., & OMalley, C. T. (1995). Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *Lancet*, 345, 393-396.
78. Shaw, G., Rozen, R., Finnell, R., Todoroff, K., & Lammer, E. (1998). Infant C677T Mutation in MTHFR, Maternal Periconcepcional Vitamin Use, and Cleft Lip. *80*, 196-198.
79. Shi, M., Christensen, K., Wienberg, C., Romitti, P., Bathum, L., Lozada, A., y otros. (2007). Orofacial cleft risk is increased with maternal smoking and specific detoxification-gene variants. *Am J Hum Genet*, 80, 76-90.
80. Shi, M., Wehby, G., & Murray, J. (2008). Review on genetic variants and maternal smoking in the etiology of oral clefts and other birth defects. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 84 (1), 16-29.
81. Shotelersuk, V., Ittiwut, C., Siriwan, P., & Angspatt, A. (2003). Maternal 677CT/1298AC genotype of the MTHFR gene as a risk factor for cleft lip. *J Med Genet*, 40 (e64), 1-4.
82. Sibani, S., Leclerc, D., Weisberg, I., O'Ferrall, E., Watkins, D., Artigas, C., y otros. (2003). Characterization of mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency reveals an FAD-responsive mutation. *Hum Mutat*, 21 (5), 509-20.
83. Sprintz, R. (2001). The genetics and epigenetics of oro-facial clefts. *Current Opinion in Pediatrics*, 13, 556-560.
84. SSA. (2002). *NOM-034-SSA2-2002 para la Prevención y Control de los Defectos al Nacimiento*. Norma Oficial Mexicana.
85. SSA. (2003). *Bases técnicas para la suplementación con vitaminas y minerales en la infancia y adolescencia*. Programa de acción: infancia y adolescencia

86. SSA. (2007-2012). *Por un México sano: construyendo alianzas para una mejor salud*. Programa Nacional de Salud, México.
87. Stainer, P., & Moore, G. (2004). Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Human Mol Genet* , 13 (1), R73-R81.
88. Stat Soft, I. (2010). *Stat Soft*. Obtenido de www.statsoft.com/textbook/
89. Thompson. (2004). Genetics of Disorders with Complex Inheritance. En R. Nussbaum, R. McInnes, & H. Willard, *Genetics in Medicine* (Vol. 1, págs. 289-310). USA: Saunders.
90. Tolarova, M., & Harris, J. (1995). Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology* , 51, 71-8.
91. Tolarova, M., van Rooij, I., Pastor, M., van der Put, N., Goldberg, A., Hol, F., y otros. (1998). A common mutation in the MTHFR gene is a risk factor for nonsyndromic cleft and palate anomalies . *Am J Hum Genet* , 63, A27.
92. Tonetti, C., Saudubray, J., Echenne, B., Landrieu, P., Giraudier, S., & Zittoun, J. (2003). Relations between molecular and biological abnormalities in 11 families from siblings affected with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Eur J Pediatr* , 162 ((7-8)), 466-75.
93. Vallino, L., Zucker, R., & Napoli, J. (2008). A study of speech, language, hearing, and dentition in children with cleft lip only. *Cleft Palate Craniofac J* , 45 (5), 485-494.
94. van der Put, N., Gabreels, F., Stevens, E., Smeitink, J., Trijbels, F., Eskes, T., y otros. (1998). A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* , 62, 000-000.
95. van Rooij, I., Vermeij-Keers, C., Kluijtmans, L., Ocké, M., Zielhuis, G., Goorhuis-Brouwer, S., y otros. (2003). 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* , 157, 583-591.
96. Vanderas, A. (1987). Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. 24 (3), 216-25.
97. Verkleij-Hagoort, A., Blik, 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 Part A* , 143A, 952-960.
98. Wilcox, A., Lie, R., Solvoll, K., Taylor, J., McConnaughey, D., Abyholm, F., y otros. (2007). Folic acid supplements ans risk of facial clefts: national population based case-control study. *BMJ* , 1-6.
99. Wilken, B., Bamforth, F., Li, Z., Zhu, H., Ritvanen, A., Redlund, M., y otros. (2003). Geographical and ethnic variation of the 677C-T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J Med Genet* , 40, 619-625.
100. Wilson, D. (2007). Pre-conceptional vitamin 2007: the use of folic acid multivitamin supplemet tube defects and other congenital anomalies. *J Obstet Gynaecol Can* , 29 (12), 1003-13.
101. Wyszynski, D., & Dielh, S. (2000). Infant C677T mutation in MTHFR, maternal periconceptional vitamin use, and risk of nonsyndromic cleft lip. *Am J Med Genet* , 92, 79-80.
102. Zhu, H., Kartiko, S., & Finnell, R. (2009). Importance of gene-environment interactions in the etiology of selected birth defects. *Clin Genet* , 75, 409-423.
103. Zhu, J., Ren, A., Hao, L., Pei, L., Liu, J., Zhu, H., y otros. (2006). Variable contribution of the MTHFR C677T polymorphism to non-syndromic cleft lip and palate risk in China. *Am J Med Genet* , 14A, 551-557.