



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LABIO PALADAR HENDIDO AISLADO CON
POLIMORFISMOS DE GENES CANDIDATOS EN PACIENTES MEXICANOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JOSÉ ANTONIO VELÁZQUEZ ARAGÓN

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ARIADNA ESTELA GONZÁLEZ DEL ÁNGEL
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

COMITÉ TUTOR: DR. CARLOS SABAS CRUZ FUENTES
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA

DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de marzo de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **VELÁZQUEZ ARAGÓN JOSÉ ANTONIO** con número de cuenta **508019696** con la tesis titulada **"ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LABIO PALADAR HENDIDO AISLADO CON POLIMORFISMO DE GENES CANDIDATOS EN PACIENTES MEXICANOS"** realizada bajo la dirección de la **DRA. ARIADNA ESTELA GONZÁLEZ DEL ÁNGEL**:

Presidente: **DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA**
Vocal: **DRA. MARTHA ESTELA PÉREZ RODRÍGUEZ**
Secretario: **DR. MIGUEL ÁNGEL ALCANTARA ORTIGOZA**
Suplente: **DR. SAMUEL CANIZALEZ QUINTERO**
Suplente: **DR. CARLOS SABAS CRUZ FUENTES**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de mayo de 2013

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradecimientos

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por las oportunidades y la formación académica adquirida en ella.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo obtenido a través de la beca número 161000 y el apoyo FOSSIS S0008-2009-01, 113126.

A mi tutora, la Dra. Ariadna Estela González del Ángel por el tiempo, el apoyo y la guía recibida para la realización de este proyecto.

A mi comité tutor, Dr. Rafael Camacho Carranza y Dr. Carlos Sábas Cruz Fuentes, por los comentarios y observaciones oportunas a este trabajo.

Al Instituto Nacional de Pediatría por los recursos asignados para la realización de este trabajo el cual se encuentra registrado con el número de proyecto INP 21/2008.

Agradecimientos Personales

A Ariadna González del Ángel, por todo el apoyo académico y personal que he recibido. Gracias por la confianza, los consejos y la amistad que he recibido. Por ser una gran tutora, pero sobre todo una gran persona.

A Miguel Ángel Alcántara por su incomparable apoyo a este proyecto, sus propuestas y comentarios que mejoraron la calidad de este trabajo, por su personalidad que hace el trabajo más disfrutable y por el ánimo infundido en el aspecto académico y personal.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, por su apoyo y su participación en este proyecto.

A los médicos residentes de Genética del INP que participaron en este trabajo durante su rotación, gracias por su apoyo y su amistad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de realizar estudios de de posgrado, por acogerme como parte de su comunidad y hacerme sentir orgulloso de pertenecer a ella.

Dedicatoria

A Nadia, María José y Bruno, gracias por llenarme de felicidad.

A mis padres Eloína y Claudio, espero que se sientan orgullosos.

A mis hermanos Luis, Gaby, Claudia, Patricia, Francisco y Nelly.

A todos mis sobrinos.

"...and I lift my glass to the awful truth
which you can't reveal to the ears of youth
except to say it isn't worth a dime...."
L. Cohen. *Closing time*

"...levanto mi vaso por la terrible verdad
que no se puede revelar a los oídos de la juventud,
excepto que esto no vale un carajo..."
L. Cohen. *Closing time*

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	4
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN.....	8
ASPECTOS CLÍNICOS DEL LPHA	10
Diagnóstico.....	10
Pronóstico, tratamiento y prevención.....	10
DISTRIBUCIÓN Y ETIOLOGÍA DEL LPHA	12
Distribución.....	12
Etiología	12
FACTORES AMBIENTALES INVOLUCRADOS EN LA ETIOLOGÍA DEL LPHA..	13
FACTORES GENÉTICOS INVOLUCRADOS EN LA ETIOLOGÍA DEL LPHA.	15
Factores de señalización extracelular.....	22
Factores de Transcripción.....	27
Adhesión celular.....	29
Enzimas del metabolismo de los folatos.....	30
Región cromosómica 8q24.....	35
JUSTIFICACIÓN.....	44
OBJETIVOS.....	46
GENERAL:	46
PARTICULARES:	46
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
DISEÑO DEL ESTUDIO Y DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA.....	47
ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE LA MUESTRA	48
SELECCIÓN DE GENES CANDIDATOS Y VARIANTES GENÉTICAS	49
GENOTIPIFICACIÓN.....	49
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50
RESULTADOS	52
ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL.....	53
ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DE MARCADORES INDIVIDUALES Y DE HAPLOTIPOS.....	53
ANÁLISIS DE INTERACCIÓN GEN-AMBIENTE Y GEN-GEN.....	58
DISCUSION.....	60

Características de la muestra.....	60
Consumo de ácido fólico y LPHA.....	61
Análisis de factores ambientales y LPHA.....	62
Análisis de asociación de marcadores individuales y de haplotipos.....	63
Análisis de interacción gen-ambiente y gen-gen.....	67
Calculo del tamaño de muestra y poder estadístico.....	68
CONCLUSIONES.....	71
ANEXOS.....	73
Anexo I.....	73
Anexo II.....	76
Anexo III.....	77
Anexo IV.....	78
Anexo V.....	79
Anexo VI.....	80
Anexo VII.....	82
Anexo VIII.....	84
Anexo IX.....	85
Anexo X Artículo publicado producto de la investigación.....	86
BIBLIOGRAFÍA.....	90

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características epidemiológicas del LPH.....	9
Tabla 2. Genes candidatos en la etiología de LPHA. (Modificado de Jugessur, 2009; Murray, 2002 y Lidral, 2005).....	17
Tabla 3. Estudios previos con asociación positiva de las variantes genéticas incluidas en este estudio con LPHA.....	34
Tabla 4. Estudios de Asociación de LPHA y la región cromosómica 8q24.	37
Tabla 5. Estudios de análisis de interacción gen-gen y gen-ambiente y LPHA.	43
Tabla 6. Datos clínicos y demográficos de los casos y controles. *AF Ácido Fólico.	52
Tabla 7. Odds Ratio de presentar LPHA con Consumo vs No Consumo de ácido fólico. *no se cuenta con datos de tres casos.....	53
Tabla 8. Variantes analizadas en el estudio, frecuencias genotípicas y prueba de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg por la prueba exacta de Fisher.....	54
Tabla 9. Análisis de asociación por la prueba de tendencia de Armitage-Cochran de marcadores independientes.	56
Tabla 10. Análisis de asociación de haplotipos en los genes <i>IRF6</i> , <i>MSX1</i> y en 8q24.	57
Tabla 11. Resultados significativos de interacción por regresión logística.	58
Tabla 12. Resultados significativos por análisis de MDR de los modelos de interacción gen-ambiente y gen-gen.....	59

RESUMEN

El labio paladar hendido aislado (LPHA) tiene una incidencia en México de 1.1 afectados en 1000 nacimientos. Variantes en los genes *TGFA*, *MSX1*, *PVRL1*, *MTHFR*, *IRF6*, *TGFB3* y la región cromosómica 8q24 (sin genes reconocidos) han sido asociadas a LPHA, sin embargo, los resultados de las asociaciones no son consistentes en todas las poblaciones, probablemente por diferencias en el origen étnico de las poblaciones analizadas. En México existen sólo dos estudios para la identificación de factores genéticos y LPHA, un estudio fue realizado en Jalisco y otro en Chiapas. El objetivo de este estudio es generar más información con respecto a los factores genéticos y ambientales asociados a LPHA en población mestiza Mexicana.

Se incluyeron en este estudio 132 casos con LPHA captados a través del servicio de Genética del Instituto Nacional de Pediatría y 370 controles sanos seleccionados en la Unidad de Apoyo a la Investigación del mismo Instituto. Los casos y los controles eran originarios de la ciudad de México y área conurbada, a los cuales se les preguntó antecedentes heredofamiliares de LPHA, consumo de ácido fólico durante el embarazo y exposición a compuestos teratógenos. Se genotipificaron 19 polimorfismos en los genes mencionados y en la región cromosómica 8q24 en casos y controles, se obtuvieron las frecuencias alélicas y se determinó la asociación por la prueba de tendencia de Armitage. También se conformaron haplotipos en los genes candidatos mencionados. Se estudiaron posibles interacciones gen-gen y gen-ambiente por regresión logística binaria y posterior análisis por reducción de la dimensionalidad multifactorial o MDR por sus siglas en Inglés. Finalmente, para descartar estratificación en la muestra que pudiera causar resultados espurios se realizó un análisis de la estructura genética poblacional de la muestra.

Se incluyeron 370 controles (51% varones y 49% mujeres) y 132 (68% varones y 32% mujeres) casos. La edad promedio de los controles fue 1.27 años y de los casos fue 5.5 años. El 16% de los casos tuvieron antecedente familiar de LPHA, mientras que el 1% de los controles lo presentaron. La ingesta periconcepcional de ácido fólico (AF) fue de 1.5% en casos y 13% en controles. El consumo de AF mostró un $OR=0.29$ $p<0.0001$ para LPHA. Sólo dos de los 19 polimorfismos tuvieron una asociación significativa con un efecto protector a LPHA: rs1801133(C/T) en *MTHFR* (alelo T, $OR=0.64$, $p=0.022$) y rs2235371 (G/A) en *IRF6* (Alelo A, $OR=0.60$, $p=0.043$). El haplotipo "G-G" de las variantes rs2235371

(G/A) y rs2235375 (C/G) en el gen *IRF6* mostró asociación con mayor riesgo a LPHA ($p=0.02$). El análisis de interacción entre variables reveló dos resultados positivos que confieren mayor riesgo a LPHA: a) el antecedente de consumo de ácido fólico y el polimorfismo de nucleótido único (SNP) rs17241253 en 8q24 ($p<0.0001$) y b) entre rs2235371 de *IRF6* y la presencia de alguna de las variantes rs17241253 y rs7843646 en 8q24 ($p=0.0006$). El análisis de ascendencia no mostró estratificación en la población estudiada ($\alpha=3.31$).

Dado que el consumo materno de AF fue bajo en nuestra población y disminuyó el riesgo para LPHA, se debe enfatizar su importancia en edad reproductiva. El alelo T de *MTHFR* rs1801133 no ha mostrado asociación con LPHA en la mayoría de los estudios, sólo para riesgo elevado en población china (Zhu, 2006 y 2010). Contrariamente, en nuestra población el alelo T disminuye el riesgo para LPHA, hallazgo previamente reportado sin significancia estadística (Chevrier, 2007). Por otro lado, el alelo menor de *IRF6* rs2235371 se asoció con menor riesgo para LPHA; se postula que este SNP está en desequilibrio de ligamiento con una variante funcional en la región enhancer del gen. Variantes en la región 8q24 se han asociado con LPHA en población caucásica y maya mexicana, lo que difiere de lo observado en nuestra población y en hispanos de Texas, ya que nosotros observamos asociación de variantes de esta región con LPHA sólo en interacción con variantes en *IRF6* y con consumo de ácido fólico y no en asociación directa. La falta de estratificación entre casos y controles disminuye la posibilidad de que las asociaciones encontradas sean espurias, aún cuando el tamaño de muestra sea menor a otros estudios publicados. La identificación de interacciones genéticas y ambientales identificadas en este trabajos son novedosas, al ser el primer reporte que identifica interacción entre variantes en la región 8q24 y consumo de ácido fólico y el segundo reporte de interacción entre 8q24 y el gen *IRF6*, así como otras similares reportadas en la literatura apoyan la teoría propuesta de la etiología multifactorial del LPHA.

ABSTRACT

Non-syndromic cleft lip with/without cleft palate (NS CL/P) is a common birth defect. Its incidence in Mexico is 1.1/1000 live births. NS CL/P etiology is complex, and variants in multiple genes as *TGFA*, *MSX1*, *PVRL1*, *MTHFR*, *IRF6*, *TGFB3* and chromosomal region 8q24 (without known genes) have been associated to this defect. Nevertheless contradictory results have been observed, probably due to differences in ethnicity of analyzed populations. In Mexico only two previous studies to identify genetic factors of NS CL/P have been reported with populations of Chiapas and Jalisco. The aim of this study is to obtain more information of genetic and environmental factors associated with the NS CL/P in Mexican Mestizo population.

In this study were included 132 Mexican Mestizo cases and 370 controls from Mexico City, and cases and controls were attended the National Institute of Pediatrics and mother were asked about history of smoking, alcohol consumption and familiar cleft lip/palate. 19 polymorphisms in mentioned candidate genes were tested for association with NS CL/P with the Armitage's trend test and haplotypes formed tested for their association with NS CL/P. Gene-Gene and Gene-Environment analysis was performed, first by binary logistic regression and later by a Multifactor Dimensionality Reduction analysis (MDR). Finally, a population structure analysis was performed to the sample to discard possible substructure that could lead to spurious associations.

In our sample 51% controls and 68% cases were males. Average age in controls was 1.27 years and 5.5 years in cases. History of familiar cleft lip/palate was 16% in cases and 1% in controls. The folic acid intake was 1.5% in cases and 13% in controls with an OR=0.29 $p < 0.0001$ for NS CL/P. Only two polymorphisms were associated, both with a protective effect to NS CL/P, *MTHFR* rs1801133(C/T) (allele T, OR=0.64, $p=0.022$) and *IRF6* rs2235371 (G/A) (Allele A, OR=0.60, $p=0.043$). Haplotype "G-G" conformed by *IRF6* rs2235371 (G/A) and rs2235375 (C/G) variants, showed an increased risk to NS CL/P ($p=0.02$). Interaction between folic acid intake and 8q24 variant rs17241253 ($p < 0.0001$) and interaction between *IRF6* rs2235371 and 8q24 variants rs17241253 and rs7843646 ($p < 0.0006$) were identified by a MDR analysis. Population structure analysis revealed no stratification within the sample ($\alpha=3.31$)

Maternal folic acid intake was low in our sample and diminished the risk for NS CL/P, indicating that folic acid supplementation of diet of women in reproductive age must be reinforced. *MTHFR* rs1801133, in the vast majority of studies, had no significant association to NS CL/P. There are few reports of association of allele T of single nucleotide polymorphism (SNP) rs1801133 with an increased risk for NS CL/P in Chinese population (Zhu, 2006 and 2010). Only one published paper had reported allele T of rs1801133 with a decreased risk to NS CL/P as was observed in this study. On the other hand *IRF6* gene is the most consistent gene associated to this birth defect across different populations analyzed, as we observed in our study, since a marker and a haplotype located in this gene were associated to NS CL/P. Variants on the 8q24 region had been previously associated with NS CL/P in Caucasian and Mexican Maya populations, but this association has not been observed in Hispanics from Texas and in our study. The lack of any substructure within the sample, reduces the possibility of spurious associations due to stratification, even when the sample size is smaller than other published reports. Gene-gene and gene-environment interaction identified are novel since this is the first report of interaction between 8q24 region and folic acid consumption, and the second report of interaction between 8q24 and *IRF6* gene. This findings as other reports in literature support the complex etiology of NSCL/P.

INTRODUCCIÓN.

El labio paladar hendido (LPH) es un defecto en la región oral resultado de falla de la fusión del proceso medio nasal para establecer la continuidad con el proceso maxilar en la etapa embrionaria temprana (semanas 6-8 de gestación) y que se observa como una fisura en la parte inferior de la nariz hasta la boca, que puede localizarse en un solo lado con respecto del punto medio de la cara (LPH unilateral) o afectar ambos lados (LPH bilateral). Embriológicamente el LPH es un defecto severo en la formación del labio que puede involucrar también al paladar duro por lo que se considera que el labio hendido y el labio paladar hendido son la misma entidad con diferente grado de severidad; mientras que si sólo hay afección del paladar se considera una falla en la fusión palatina independiente de la región del labio. Por lo anterior, el labio paladar hendido se maneja como una entidad con una epidemiología y etiología diferente a cuando sólo se observa afección del paladar hendido solo (PHS) (Stanier, 2004). Los estudios que han distinguido LPH del PHS reportan al LPH con una frecuencia del doble con respecto al PHS (Jensen, 1998).

La prevalencia del LPH varía desde 1/500 a 1/2500 nacimientos, dependiendo del origen geográfico (Vanderas, 1987) o étnico (Croen, 1998) de la población estudiada. Entre el 60% y 80% de los casos de LPHA son varones y el labio hendido bilateral la mitad de frecuente el labio hendido unilateral, mientras que dos tercios de los defectos unilaterales son en el lado izquierdo (0). En México se ha determinado la incidencia de labio paladar hendido entre 1 y 1.1 casos por cada 1000 recién nacidos vivos (Perez-Molina, 1993; Blanco-Dávila, 2003).

El 70% de los casos de labio paladar hendido son aislados (LPHA), es decir, ocurren como una condición única que no está asociada con otra anomalía reconocible, mientras que el 30% de los casos son sindromáticos en los que se presentan anomalías estructurales en otras áreas además de la región orofacial.

Tabla 1. Características epidemiológicas del LPH.

Características	Información disponible
Prevalencia	Variable, por lo general se toma 1 en 1000 RNV.
Variación geográfica	Alta prevalencia en aborígenes australianos, Canadá y en lejano oriente. Baja prevalencia en Europa meridional y África.
Diferencias étnicas	En general poblaciones de origen asiático presentan frecuencias mayores que caucásicos, los cuales a su vez presentan frecuencias mayores que los Africanos.
Diferencias por género	M/F 2:1
Lateralidad	Dos tercios de los defectos unilaterales son en el lado izquierdo.
Tendencias temporales	La frecuencia se mantiene estable en el tiempo.
Edad Materna	No tiene efecto en los casos sindrómicos ni en los casos aislados.
Peso al nacimiento/Edad gestacional	Por debajo de la media en el peso al nacimiento; sin evidencia de mayor frecuencia de prematuridad.
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	Casos familiares 15-25% Recurrencia en hermanos 3-5%

ASPECTOS CLÍNICOS DEL LPHA

La expresividad clínica del defecto en el LPH es muy variable, desde labio hendido unilateral hasta labio bilateral con paladar y alveolo hendido, las variantes que se pueden presentar se muestran en la figura 1.

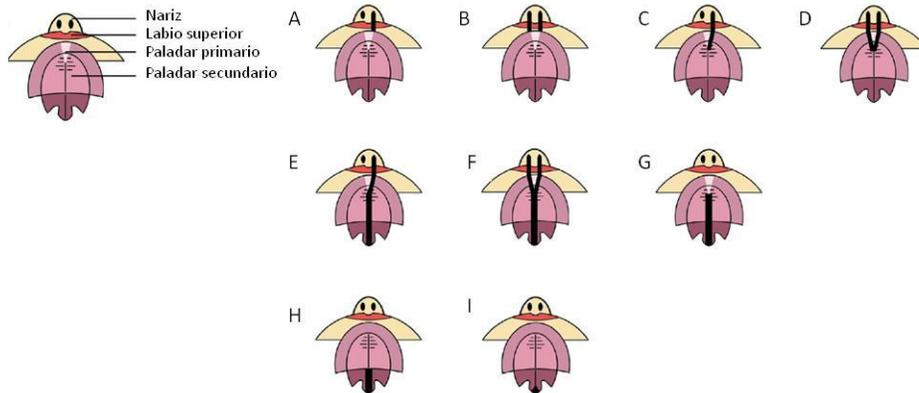


Figura 1. Tipos de defectos orofaciales. A) Labio hendido unilateral; B) Labio hendido bilateral; C) Labio y paladar primario hendido unilateral; D) Labio y paladar primario hendido bilateral; E) Labio y paladar completo hendido unilateral F) Labio y paladar completo hendido bilateral; G) Paladar secundario hendido aislado; H) Paladar suave hendido aislado; I) Hendidura submucosa en el paladar blando. Modificado de Cobourne 2004.

Diagnóstico.

El diagnóstico de LPH se realiza con la exploración física al nacimiento, aunque cada vez es más frecuente la detección prenatal del LPH por el uso de ultrasonografía de segundo o tercer nivel.

Pronóstico, tratamiento y prevención.

En el caso del LPHA los resultados con el tratamiento adecuado pueden ser excelentes. La reconstrucción es lograda por fases según el individuo crece y se desarrolla, lo que demanda un seguimiento longitudinal. Las decisiones de tratamiento deben necesariamente considerar los aspectos estéticos y de lenguaje. Se recomienda que la reparación quirúrgica sea a una edad temprana; sin embargo, se ha referido que también deben considerarse otros factores como la relación entre el área del paladar faltante y los segmentos del paladar presentes y no sólo la edad (Berkowitz, 2005). Se recomienda una evaluación

multidisciplinaria a cada paciente para minimizar el número de cirugías con el fin de evitar afectar el crecimiento del hueso, y también se considera que numerosas intervenciones quirúrgicas tienen un efecto negativo en el crecimiento maxilar (Manna, 2009).

Las complicaciones más frecuentes en pacientes con LPHA, que requieren una detección y manejo oportuno, en las diferentes etapas del desarrollo del paciente son:

- Dificultades de alimentación. El aspecto más inmediato sobre el cuidado del paciente con LPH es la alimentación. La severidad de la malformación correlaciona con la habilidad del paciente para succionar, los pacientes con paladar primario hendido generalmente pueden succionar correctamente, mientras que aquellos con paladar secundario hendido son incapaces de generar la presión negativa suficiente para poder alimentarse, lo que puede llevar a pérdida de peso.
- Infecciones del oído y pérdida auditiva. Frecuentemente se favorecen por la disfunción de la tuba faringotimpánica (Kirschner, 2000).
- Retrasos del habla y del lenguaje. Debido a la fisura en el labio y el paladar, la función muscular puede afectarse, lo que condiciona frecuentemente problemas para la articulación del lenguaje.
- Problemas dentales. Es común que los dientes presenten alteraciones en su posición y por lo que requieren de tratamiento prolongado por ortodoncia.

La mayoría de los pacientes con LPHA asisten a clases regulares y tienen un desarrollo psicosocial normal, a pesar de que se ha identificado una amplia variedad de problemas en los aspectos emocionales y de aprendizaje en esta población (Endrigo, 1999).

Otro aspecto importante en el manejo de estos pacientes es el asesoramiento genético brindado por un Genetista que con base en la historia familiar debe establecer el riesgo de recurrencia en parejas con un hijo afectado, así como en los familiares cercanos o para la descendencia del mismo paciente.

DISTRIBUCIÓN Y ETIOLOGÍA DEL LPHA

Distribución.

La frecuencia del LPHA es desconocida en algunas partes del mundo, mientras que en muchas regiones en donde se cuenta con esta información, las diferencias entre el lugar de estudio (hospitales vs población general), duración del análisis y los criterios de inclusión, no permiten una comparación de los datos. A pesar de lo anterior, la mayoría de los estudios indican que el LPHA presenta una prevalencia de 3.4-22.9 por 10,000 recién nacidos vivos. La incidencia del LPHA es más alta en regiones de Latinoamérica y Asia (China y Japón) y menor en Israel, Sudáfrica y el sur de Europa (Mossey, 2009). Comparaciones entre diferentes grupos étnicos en Texas, muestran que Hispanos nacidos en EUA y no nacidos en EUA, tienen incidencias de LPHA similares al grupo de caucásicos con un de OR 0.97 (IC 95%= 0.77-1.23) para Hispanos no nacidos en EUA y un de OR 0.90 (IC 95%0.72-1.14) para Hispanos nacidos en EUA (Hashmi, 2005). Estos datos pudieran ser indicativos que al menos para Hispanos los factores ambientales no tiene un impacto importante en la incidencia de LPHA, ya que independiente de haber nacido o no dentro de EUA las incidencias son similares con la de los Caucaásicos de EUA. Aunque cabe mencionar que esto no significa que los factores genéticos asociados a LPHA deban ser similares entre Caucaásicos e Hispanos.

El LPHA en poblaciones caucásicas es más frecuente en varones con una razón de 2:1. En este mismo grupo étnico el exceso de varones se hace más patente conforme aumenta la severidad de la malformación. Se ha propuesto que está diferencia entre varones y mujeres puede deberse a diferencias entre los valores del umbral entre los dos sexos; es decir que se requieren más factores que predisponen a esta malformación en mujeres que en varones (Jensen, 1988).

Etiología

En los últimos 30 años se ha considerado al modelo del “umbral multifactorial” 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 varios factores genéticos y ambientales. De acuerdo con este modelo, el fenotipo con la malformación se presenta cuando se excede un umbral de susceptibilidad, por lo que el presentar la malformación se convierte en un evento del “todo o nada” (Fraser, 1970).

La participación de los factores genéticos en LPHA se ha establecido por 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). Un modelo estadístico de los datos de riesgo de recurrencia en familias con LPHA sugiere que están involucrados entre dos y catorce genes (Schliekelman y Slatkin 2002). De acuerdo a resultados recientes de escaneos amplios del genoma se han encontrado asociaciones de LPHA con regiones en los cromosomas 1, 2, 4, 6, 8, 14, 17 y 19, sin embargo los resultados no son consistentes en todas las poblaciones y sugieren que las regiones asociadas varían dependiendo de la población y posiblemente del número de factores involucrados (Mossey, 2009; Dixon, 2011).

FACTORES AMBIENTALES INVOLUCRADOS EN LA ETIOLOGÍA DEL LPHA.

La falta de una completa concordancia entre gemelos monocigotos así como la variación de la incidencia entre grupos étnicos y geográficos resalta la participación de factores ambientales en la etiología de este padecimiento. Dentro de los factores ambientales propuestos se encuentran:

El tabaquismo durante el embarazo causa hipoxia embrionaria y el fumar ha sido asociado con una incidencia aumentada de LPHA. Un estudio de meta-análisis de 24 artículos en donde se evaluó el consumo de tabaco como factor de riesgo para LPHA mostró una asociación pequeña, pero estadísticamente significativa, RR 1.34, IC 95% 1.25-1.44, entre el fumar en el primer trimestre de embarazo y el riesgo incrementado de LPHA (Little, 2004). Por otro lado se ha sugerido que la hipoxia debida a la altitud durante el embarazo pudiera estar asociada con un

aumento en la incidencia de defectos al nacimiento, entre ellos LPHA con un RR 1.57 IC95% 1.27–1.94 (Castilla, 1999).

La ingestión de alcohol por la madre durante el embarazo (frecuentemente asociada al fumar) y el no consumo de multivitamínicos puede resultar en un aumento en el riesgo de LPHA (Romitti, 2007). Además se sabe que el alcohol es causa del síndrome de alcohol fetal, el cual incluye labio o labio paladar hendido entre sus características fenotípicas (Murray, 2002). Un estudio en Escocia encontró asociado el consumo de alcohol durante el embarazo con un riesgo elevado a LPHA con un OR 2.28 y un IC 95% 1.0–25.09 (Lorente, 2000).

Se ha reportado que el consumo durante el primer trimestre de embarazo de agentes anticonvulsivantes como el ácido valproíco, la fenitoína y benzodiazepinas (Wikner, 2007), así como el uso de corticosteroides aumentan el riesgo de labio paladar hendido en el producto (Palmieri, 2008).

Un aspecto muy importante es el estado nutricional de la madre durante el embarazo; en particular el papel de la suplementación periconcepcional con ácido fólico como método para reducir la incidencia de LPHA. Varios estudios de casos y controles han propuesto que el uso materno periconcepcional de multivitamínicos con ácido fólico protegen contra la ocurrencia y recurrencia de LPHA (Briggs, 1976; Tolarova, 1995; Shaw 1995; Itikala 2001). Un meta-análisis en donde se analizaron cinco estudios prospectivos se observó un menor riesgo de tener un hijo con LPHA para las madres que consumieron un suplemento de ácido fólico comparadas con las madres que no lo consumieron (OR 0.51, IC95% 0.32-0.95), mientras que en otro análisis en donde se evaluaron doce estudios de casos y controles el OR global de madres que si consumieron un suplemento de ácido fólico en comparación con las que no lo consumieron (OR 0.77, IC95% 0.65-0.90) (Badovinac, 2007).

A la fecha no se han observado asociaciones consistentes entre la presencia de fisuras orofaciales y el nivel socioeconómico (Clark, 2003), en cierta medida esto puede ser debido a las diferencias en la medición y la clasificación del nivel socioeconómico o a variaciones en los criterios de inclusión de los casos. Otra explicación puede ser que muchas de las poblaciones con muy bajo nivel

económico en el mundo no cuentan con un sistema de vigilancia para los defectos al nacimiento y probablemente la percepción de que la prevalencia del LPHA es mayor en estas poblaciones no está adecuadamente fundamentada (Mossey, 2009).

FACTORES GENÉTICOS INVOLUCRADOS EN LA ETIOLOGÍA DEL LPHA.

La participación de factores genéticos en la etiología del LPHA fue propuesta desde los años 40's por Fogh-Andersen al identificar familias en donde la malformación era recurrente. Por ejemplo, en un estudio se observó que la recurrencia en familiares de primer grado era 32 veces mayor que en la población abierta, lo que sugería una fuerte participación genética (Sivertsen, 2008). En este mismo sentido, en los estudios en gemelos se ha observado que la concordancia entre gemelos monocigotos es de 60%, mientras que la concordancia es de sólo 10% entre gemelos dicigotos (Christensen, 1992).

La búsqueda de los factores de riesgo genéticos y ambientales para el LPHA han sido motivo de diversos estudios en las últimas décadas (Jugessur, 2005; Lidral, 2005). Debido a los grandes avances en el mapeo de loci relacionados al LPHA, la lista de genes ha aumentado a una gran velocidad desde la primera asociación reportada entre el LPHA y variantes del gen del factor transformante y de crecimiento alfa (*TGFA*) en 1989 (Ardinger, 1989). Una variedad de técnicas moleculares se han utilizado para identificar genes y rutas metabólicas críticas en el desarrollo craneofacial. Dentro de estas técnicas se incluyen los modelos animales de hendiduras orofaciales, principalmente ratones (Juriloff, 2008), análisis citogenéticos (Brewer, 1998), descripción de síndromes mendelianos que cursan con LPH (Kondo, 2002; Zucchero, 2004), estudios de expresión en tejido embrionario en humanos y ratones (Brown, 2003), así como escaneos amplios del genoma con microarreglos de alta densidad que han permitido identificar regiones cromosómicas insospechadas asociadas a LPHA como 8q24 (Birnbbaum, 2009-a) y 1p22 y 20q12 (Beaty, 2010). La diversidad y complejidad de los eventos que contribuyen al desarrollo craneofacial en la etapa embrionaria se refleja en la gran cantidad de genes que se conocen o sugieren que están involucrados en la

etiología del LPHA. En la tabla 2 se muestra una lista de genes que se han mencionado en la literatura con una participación en la etiología del LPHA y un resumen las rutas de señalización o el proceso biológico en el que participan sus productos.

Tabla 2. Genes candidatos en la etiología de LPHA. (Modificado de Jugessur, 2009; Murray, 2002 y Lidral, 2005).

Gen	Ubicación	Nombre del gen	Proceso Biológico
<i>ABCA4</i>	1p22	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4	Miembro de la familia del ATP-Binding Cassette (ABC) subclase 1. La proteína codificada se expresa casi exclusivamente en retina y es un transportador con el N-retinilidene-PE como sustrato. Mutaciones en este gen están presentes en enfermedad de Stargardt, que es un tipo de degeneración macular juvenil. Se ha identificado en estudios de GWAS como gen candidato con una fuerte asociación.
<i>BMP4</i>	14q22.2	Bone morphogenetic protein 4	Molécula de señalización del desarrollo esquelético, participa en la ruta de señalización de TGF-beta. Induce la formación de cartílago y hueso. También actúa en la inducción del mesodermo, el desarrollo dental y la reparación de fracturas. Se expresa durante el desarrollo y la adultez.
<i>FGF1</i>	5q31	Fibroblast growth factor 1	Factor de crecimiento. Mediador de la transducción de señales. Participa en la angiogénesis y en diferenciación y proliferación celular. Se expresa en múltiples tejidos durante el desarrollo y la adultez.
<i>FGF10</i>	5p12	Fibroblast growth factor 10	Factor de crecimiento. Participación en la cascada de señalización en la ruta de FGF. Participa en el desarrollo embrionario en la diferenciación y proliferación celular, así como la morfogénesis. Se expresa en diversos tejidos.
<i>FGF12</i>	3q28	Fibroblast growth factor 12	Factor de crecimiento. Participación en la cascada de señalización en la ruta de FGF. Involucrado en el desarrollo y función del sistema nervioso. Expresado en diversos tejidos.
<i>FGF2</i>	4q26-q27	Fibroblast growth factor 2 Growth factor	Factor de crecimiento. Participa en la transducción de señales y en la angiogénesis y el control de ciclo celular. Expresado en diferentes tejidos.

<i>FGF4</i>	11q13.3	Fibroblast growth factor 4	Factor de crecimiento. Participa en la ruta de señalización de FGF.
<i>FGF5</i>	4q21	Fibroblast growth factor 5 Growth factor	Factor de crecimiento regulador del desarrollo embrionario. Participa en la señalización y control de ciclo celular, también participa en la diferenciación y proliferación celular. Se expresa en músculo y otros tejidos.
<i>FGF7</i>	15q15-q21.1	Fibroblast growth factor 7 Growth factor	Factor de crecimiento. Participa en el desarrollo del ectodermo embrionario actuando en el control del ciclo celular. También es considerado un oncogén. Efecto parácrino en la proliferación normal del epitelio.
<i>FGF8</i>	10q24.32	Fibroblast growth factor 8	Factor de crecimiento regulador del desarrollo embrionario. Participa en la diferenciación, migración y proliferación celular. Participa en la transducción de señales en la ruta de FGF. Expresado en diversos tejidos.
<i>FGF9</i>	13q11-q12	Fibroblast growth factor 9	Factor de crecimiento regulador del desarrollo embrionario, proliferación y diferenciación celular. Participa en la transducción de señales en la ruta de FGF.
<i>FGFR1</i>	8p12	Fibroblast growth factor receptor 1	Receptor tirosin cinasa. Primer paso en la cascada de señalización. Participa en la proliferación y diferenciación celular.
<i>FGFR2</i>	10q26.13	Fibroblast growth factor receptor 2	Receptor tirosin cinasa. Cascada de señalización. Participa en la proliferación y diferenciación celular principalmente en la neurogénesis. Expresado en el desarrollo.
<i>FGFR3</i>	4p16.3	Fibroblast growth factor receptor 3	Receptor tirosin cinasa. Requerido para el desarrollo esquelético normal. Cascada de señalización en la ruta de FGF. Participa en la proliferación y diferenciación celular.
<i>FGFR4</i>	5q35.1-qter	Fibroblast growth factor receptor 4	Receptor tirosin cinasa. Participa en la proliferación y diferenciación celular en la angiogénesis. Metabolismo de la glucosa y la vitamina D. Expresado en varios tejidos durante el desarrollo y la adultez.

FOXE1	9q22	Forkhead box E1	Factor de transcripción. Unión a ácidos nucleicos. Regulación de la transcripción. Comunicación celular. Desarrollo del mesodermo.
GLI2	2q14.2	GLI2	Factor de transcripción de dedos de zinc. Regulación de la transcripción. Participa en la ruta de señalización de sonic hedgehog durante la embriogénesis. Expresado en diversos tejidos.
IRF6	1q32.2	Interferon regulatory factor 6	Factor de transcripción. Unión a ácidos nucleicos. Regulación de la transcripción. Participa en la proliferación y diferenciación celular durante el desarrollo craneofacial.
MAFB	20q12	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B	Factor de transcripción del tipo de zipper de leucina. Importante en la regulación de células del linaje de la hematopoyesis. La proteína reprime la transcripción mediada por ETS1 de genes eritroides específicos en células mieloides.
MSX1	4p16.3-p16.1	Msh homeobox 1	Factor de transcripción. Unión a ácidos nucleicos. Regulación de la transcripción en el desarrollo esquelético. Expresión en diversos tejidos.
MSX2	5q34-35	msh homeobox 2	Factor de transcripción. Unión a ácidos nucleicos. Regulación de la transcripción en el desarrollo esquelético. Expresión en diversos tejidos.
PDGFC	4q32	Platelet derived growth factor C	Factor de crecimiento. Papel esencial en el desarrollo embrionario. Necesario para el correcto desarrollo del esqueleto craneofacial y del paladar. Proliferación y diferenciación celular en el desarrollo y la angiogénesis.
PDGFRA	4q12	Platelet-derived growth factor receptor alpha	Receptor de superficie tirosin cinasa. Participa en la respuesta al estrés aumentando la proliferación y diferenciación celular. Es considerado un oncogén. Requerido para el desarrollo normal del esqueleto craneofacial y el cierre cefálico durante el desarrollo embrionario.

<i>PTCH1</i>	9q22.3	Patched homolog 1	Receptor de Sonic hedgehog. Participa en la morfogénesis y se considera un gen tumor supresor. Expresado en el desarrollo y en diversos tejidos.
<i>PVRL1</i>	11q23	Poliovirus receptor-related 1	Proteína de adhesión entre células principalmente en endotelio y epitelio. Expresado en la embriogénesis.
<i>RARA</i>	17q21	Retinoic acid receptor	Regula la transcripción mediada por ligando. Participa en el desarrollo, diferenciación celular, apoptosis y en la transcripción de los genes Clock (control del ciclo circadiano). Es requerido para el crecimiento esquelético. Expresado en la embriogénesis en diversos tejidos.
<i>RUNX2</i>	6p21	Runt-related transcription factor 2	Factor de transcripción. Esencial para la diferenciación de los osteoblastos y la morfogénesis esquelética. Expresado en diversos tejidos.
<i>SMAD1</i>	4q31	SMAD family member 1	Transductor de señales. Participa modulando diferentes rutas de señalización, principalmente la de BMP durante la morfogénesis de hueso.
<i>SUMO1</i>	2q33	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1	Modificación postranscripcional de proteínas. Participa en el transporte nuclear, regulación transcripcional, estabilidad protéica y apoptosis. Regula una red de genes involucrados el desarrollo del paladar.
<i>TBX1</i>	22q11	T-box 1	Factor de transcripción. Participa en el desarrollo embrionario con expresión en varios tejidos.
<i>TBX10</i>	11q13.1	T-box 10	Factor de transcripción. Participa en la diferenciación celular y la organogénesis el el desarrollo embrionario.
<i>TBX22</i>	Xq21.1	T-box 22	Factor de transcripción. Regulador de la transcripción. Participa en la diferenciación celular y es relevante en la génesis del paladar.
<i>TCOF1</i>	5q33.1	Treacher Collins-Franceschetti syndrome 1	Regulación de la transcripción de genes ribosomales. Papel fundamental en el desarrollo embrionario temprano, en especial en el desarrollo craneofacial.

TFAP2A	6p24	Transcription factor AP-2 alpha	Factor de transcripción. En conjunto con los factores AP-2 regula el correcto desarrollo de ojos, cara y extremidades. Expresados en diversos tejidos.
TGFA	2p13	Transforming growth factor alpha.	Factor de crecimiento en la ruta de señalización de factor de crecimiento epidérmico. Expresión durante el desarrollo.
TGFB1	19q13.2	Transforming growth factor beta 1.	Factor de crecimiento. Citocina que regula la proliferación, diferenciación, migración y desarrollo celular. Expresado en la embriogénesis en diferentes tejidos.
TGFB2	1q41	Transforming growth factor beta 2	Factor de crecimiento. Citocina que regula la proliferación, diferenciación, migración y desarrollo celular. Expresado en la embriogénesis en diferentes tejidos.
TGFB3	14q24	Transforming growth factor beta 3	Factor de crecimiento. Proliferación y diferenciación celular en la embriogénesis. Participa en la ruta de señalización de TGFB.
TGFBR1	9q22.33	Transforming growth factor beta receptor I	Transductor de señal. Transduce la señal de TGF-beta de la membrana celular al citoplasma. Expresado durante la embriogénesis.
TGFBR2	3p24.1	Transforming growth factor beta receptor II	Receptor de superficie celular. Receptor de TGF-beta. Transduce la señal de TGF-beta de la membrana celular al citoplasma. Expresado durante la embriogénesis.
TGFBR3	1p33-p32	Transforming growth factor beta receptor III	Receptor de TGF-beta. Participa como co-receptor de TGF-beta con alguno de los otros dos receptores para este ligado.
WNT3A	1q42	Wingless-type MMTV integration site family member 3A	Proteína de señalización. Participa en la formación embrionaria y la diferenciación celular durante la morfogénesis.
WNT9B	17q21	Wingless-type MMTV integration site family member 9B	Proteína de señalización. Participa en la formación embrionaria y la diferenciación celular. Se expresa en pocos tejidos como páncreas, musculo estriado, retina y cerebro.

A continuación se describen los genes candidatos analizados en este trabajo y también se presenta la revisión actualizada de la literatura en la que se reportan estos genes con una probable participación en la etiología del LPHA. Los genes *MTHFR*, *TGFA*, *TGFB3*, *MSX1*, *IRF6* y *PVRL1* fueron seleccionados por ser los genes más intensamente analizados en los estudios de asociación de LPHA y que contienen variantes que han mostrado asociación en cuando menos un reporte, aunque algunas variantes han mostrado asociaciones en varios estudios (Ardinger, 1989; Holder, 1992; Vieira, 2005; Zuccherro, 2004; Scapoli, 2005; Lidral, 1998; Park, 2007; Suzuki, 2004; Ichikawa, 2006; Sözen, 2001; Avila, 2006; Zhu, 2009; Jagomägi, 2010). La region 8q24 fue incluida dado que existen tres reportes de escaneo amplio del genoma (GWAS) independientes que encuentran esta región asociada a LPHA (Birnbbaum, 2009; Grant, 2009; Beaty, 2010).

Factores de señalización extracelular.

En esta superfamilia se encuentran factores de diferenciación que incluyen a los TGFB's, las proteínas morfogénicas de hueso (BMP's) y las activinas. Este grupo de factores de crecimiento regulan diversos aspectos del desarrollo esquelético, como el desarrollo del cartílago y la formación de hueso, el patrón del mesodermo durante el desarrollo embrionario y el desarrollo craneofacial (Wan, 2005).

TGFA.

El gen *TGFA* se localiza en el cromosoma 2 en la región p13, tiene un tamaño de 106 Kb y su estructura está conformada por 8 exones y 7 intrones. El transcrito primario presenta splicing alternativo y se han descrito 8 isoformas siendo la isoforma 1 la que genera la proteína de mayor tamaño y la más abundante en todos los tejidos, conformada por 160 aminoácidos con un peso molecular de 17 KDa (Genecard, 2007). El patrón de expresión de *TGFA* en los tejidos palatinos y en especial en la línea media y mesénquima de las bóvedas palatinas al momento de la fusión apoya el importante papel de *TGFA* en el LPH.

Los ratones knockout *TGFA* no presentan un fenotipo con paladar hendido (Luetteke, 1993), lo que sugiere que *TGFA* pudiera ser un gen modificador en la etiología de LPHA. Lo anterior ha sido basado en reportes asociación de

polimorfismos en *TGFA* con LPHA tanto en estudios de desequilibrio de transmisión (TDT del inglés Transmission Disequilibrium Test), como en estudios de casos y controles (Ardinger, 1989; Chenevix-Trench 1991; Holder, 1992; Stoll, 1992; Prescott, 2000; Juggesur, 2003; Morkuniene 2007). Los primeros polimorfismos que fueron reportados en el gen *TGFA* fueron aquellos que pueden ser detectados por enzimas de restricción y estos polimorfismos fueron los primeros en ser analizados en estudios de asociación con LPHA. Los primeros polimorfismos con asociación positiva a LPHA fueron g.101537_101540delTAAT (también descrito como TaqI), Rsa I y rs11466297 (también conocido como Bam HI). El polimorfismo g.101537_101540delTAAT se reportó asociado a LPHA en poblaciones de Asia, Europa, África, EU y Sudamérica con valores de OR desde 1.7 hasta 20 (Vieira, 2006), sin embargo recientemente en Brasil no se encontró asociación de este polimorfismo con LPHA ($p=0.335$) (Souza, 2012). Diversos estudios han establecido asociaciones entre el polimorfismo RsaI y LPHA en diferentes poblaciones entre las que se encuentran Inglaterra (IC 95% 16.6 – 17.4, Holder, 1992), Francia (IC 95% 7.6 – 14.4, Chenevix-Trench, 1992) y Iowa EU (IC 95% 10.7 – 11.2, Ardinger 1989). Finalmente el polimorfismo Bam HI se ha reportado asociado a LPHA en Chile con OR de 4.9 (IC95% 4.2 - 5.8) (Jara, 1995), en población de Francia y Iowa EUA también se encontraron asociaciones estadísticas con valores de p de 0.053, 0.0052 respectivamente, sin embargo en australianos no se encontró asociación ($p=0.053$) (Stoll, 1992; Ardinger 1989; Chenevix-Trench, 1992).

También se han analizado otros marcadores en el gen *TGFA*. Se realizó un estudio de análisis de microsatélites ubicados en todo el genoma y se encontró la región 2p13 (ubicación de *TGFA*) asociada a LPHA con un valor de $p=0.05$ (Prescott, 2000). En Irlanda se reportó asociado el SNP rs2166975 en *TGFA* sólo a paladar hendido y no a LPHA (Carter, 2010) mientras que otro estudio de TDT con muestras de EUA, Tawan y Korea encuentran que los SNP's rs3771494 y rs426081 ubicados *TGFA*, están asociados con LPHA con valores de $p=0.004$ y $p=0.030$ respectivamente (Sull, 2009).

En este estudio se incluyeron los polimorfismos g.101537_101540delTAAT (Taq I), RsaI y BamHI de *TGFA* los cuales fueron los primeros descritos como asociados a LPHA. La variante g.101537_101540delTAAT es una delección de cuatro pares de bases en el intrón cinco, 1,602 bases antes del sitio aceptor de splicing del exón 6 y genera un sitio de restricción para la enzima *TaqI*. A la fecha, se desconoce el efecto funcional de este polimorfismo sobre *TGFA*. La frecuencia del polimorfismo g.101537_101540delTAAT en población caucásica es de 7% (Basart, 1994). El polimorfismo RsaI se ubica en el intrón cinco, 177 bases río abajo del sitio aceptor de splicing del exón 6, este polimorfismo es causado por la transversión G>C y la transición A>G separadas por dos pares de bases, que generan un sitio adicional de restricción para la enzima *RsaI*, la frecuencia alélica de este polimorfismo en población europea es de 10% (Vieira, 2006).

El polimorfismo Bam HI (rs11466297) se ubica en la región 3' no traducida del gen *TGFA* en la base c.5560 y es una transversión C>A que genera un sitio de restricción para la enzima *Bam HI*, su frecuencia alélica en chilenos es de 5% (Jara, 1995).

TGFB3

A pesar de que otros miembros de la familia de *TGFB* se expresan temporal y espacialmente al momento de la fusión palatina sólo el ratón knockout *TGFB3* presenta defectos en la fusión palatina (Nawshad, 2004). El gen *TGFB3* está formado por 23Kb las cuales se distribuyen en 7 exones y 6 intrones, su producto es una proteína conformada por 412 residuos de aminoácidos, la cual tiene un peso molecular de 47 KDa. *TGFB3* es una proteína de secreción la cual forma un homodímero, que se expresa principalmente en fibroblastos, plaquetas, monocitos, condrocitos y osteoblastos. *TGFB3* actúa como molécula señal para proliferación celular, señalización célula-célula y desarrollo embrionario, en especial en la morfogénesis craneofacial (Vieira, 2003).

Después del gen *TGFA*, el gen *TGFB3* fue de los primeros en ser considerados como candidatos debido a estudios de expresión, el primer reporte de asociación de *TGFB3* y LPHA se originó en población de EUA en un estudio de TDT en donde se observó una sobretransmisión del alelo 6 del repetido CA D14S61 con

un valor de $p=0.01$ (Maestri, 1997), posteriormente se reportó en una población de Iowa EUA y Filipinas en donde se observó una sobretransmisión del haplotipo 2-2 formado entre los marcadores 5'UTR.1 y X5.1 ubicados en *TGFB3* ($p=0.03$) (Lidral, 1998). En una población de Noruega se reportó también una asociación casi estadística que presentaron como evidencia de asociación de un repetido CA intrónico en el gen *TGFB3* y LPHA (OR 1.7 CI95% 0.9-3.0) (Jugessur, 2003). El SNP rs3917168, analizado en el presente estudio, es una transversión A>T ubicada 5321 bases río abajo del sitio donador de splicing del intrón 1, no se considera que altere la función del gen y no se conoce que este en DL con otros SNP's, sin embargo en un estudio de asociación en Japón con 128 casos y 192 controles esta variante mostró la mayor asociación a LPHA (OR=2.34 IC95%=1.40-3.93, $p=0.0016$), aunque este es el único estudio donde se ha reportado (Ichikawa, 2006).

MSX1

El gen *MSX1* abarca 4.2 Kb y está formado por dos exones, el primero de 697bp y el segundo de 1236bp separados por un intrón de 2.3 Kb. El transcrito es de 1933 bp y codifica para una proteína de 297 aminoácidos con un peso molecular de 43 KDa (Padanilam, 1992).

MSX1 pertenece a la familia de genes homeobox de segmento muscular y su producto actúa como represor transcripcional durante la embriogénesis por medio de interacciones con el complejo de transcripción y otras homeoproteínas. Se sabe que *MSX1* participa en el desarrollo craneofacial, en especial en la odontogénesis y en la inhibición del crecimiento de tumores. Las interacciones entre BMP's y *MSX1* son importantes en el desarrollo orofacial, como lo demostró un estudio en donde se requiere *MSX1* para la expresión de BMP4 y BMP2 en el mesénquima palatino (Zhang, 2002). En un estudio con una serie de 917 pacientes con un defecto orofacial (LPHA o paladar hendido solo), de diferentes orígenes étnicos, a los cuales se les secuenció el gen *MSX1* completo, se observó que el 2% de los casos de LPHA tenían una mutación en este gen (Jezewski, 2003). Finalmente mutaciones en este gen son responsables de hipodoncia con herencia autosómica dominante, así como del síndrome de Witkop (Stanier, 2004).

Se han realizado varios estudios de asociación de *MSX1* con LPHA con resultados variables, probablemente debido a las diferencias étnicas entre las poblaciones de estudio y la variación en el tamaño de muestra, (Vieira, 2005; Park, 2007; Vieira, 2003; Lidral, 1998; Fallin, 2003; Lidral, 1997; Romitti, 1999; Scapolli, 2005; Beaty, 2002; Marazita 2004; Juggesur, 2003; Mitchell, 2001). Las variantes que han mostrado asociaciones positivas con LPHA en por lo menos un estudio son p.P147Q, 1170G>A, X1.3 y el repetido intrónico de CA (Vieira, 2005; Park, 2007; Vieira, 2003; Juggesur, 2003; Lidral, 1998; Lidral, 1997; Scapolli, 2005).

El polimorfismo rs104893854 (p.P147Q) es causado por un transversión C>A en el nucleótido 440 del DNA complementario, etiológicamente se considera que esta variante afecta el aminoácido fenilalanina en una región de la proteína altamente conservada entre mamíferos y que se cree participa en la unión a otras proteínas. Este cambio se encontró presente en el 3% de los casos aunque no mostró asociación con LPHA esto se debe probablemente al reducido tamaño de muestra (150 casos y 100 controles). En una población de EUA y Filipinas se encontró esta variante en el 0.15% de los casos de LPHA (Tongkobpetch, 2006; Vieira, 2005).

La variante rs34165410 conocida como (X1.3) es una transición C>T en el nucleótido 768, este cambio es sinónimo en la proteína ya que se conserva el aminoácido glicina en el residuo 116 y se considera que no tiene un efecto deletéreo sobre la función del gen. Sin embargo, en dos estudios se ha asociado a LPHA ($p=0.013$ y $p=0.005$) (Lidral, 1998; Fallin, 2003). En otro estudio realizado en Europa del Este (Latvia) observan una tendencia de asociación de esta variante que no es estadísticamente significativa, aunque los autores consideran que esto es debido a tamaño de muestra pequeño (53 casos) (Lace, 2006).

El repetido CA en *MSX1* se ubica en la región intrónica del gen y existen cinco alelos con una longitud entre 12 y 16 repetidos CA, no se conoce que tenga efecto sobre la función del gen, pero es uno de los polimorfismos más estudiados de *MSX1* y el que más consistentemente se ha encontrado asociado a LPHA, con asociación significativa en poblaciones como la chilena ($p=0.001$), en Maryland EU ($p=0.03$) y Noruega (OR= 9.7) (Vieira 2003; Beaty, 2002, Juggesur, 2003).

El SNP rs12532 (1170 G>A) se ubica en el exón 2 del gen en la región 3'UTR, cerca del repetido CA aunque no se ha establecido si se encuentran estos dos polimorfismos en desequilibrio de ligamiento (DL). Se desconoce el efecto funcional de este polimorfismo pero al analizarse en coreanos, se observó una asociación positiva (OR= 4.1 IC95%= 1-16.8) (Park, 2007). Así mismo, el análisis en 150 tríos de origen chileno encuentran asociado este polimorfismo por un análisis TDT ($p=0.016$) (Suazo, 2010).

Factores de Transcripción

IRF6

El factor regulador del Interferón 6 (*IRF6*) está entre los genes más ampliamente analizados y que de manera más consistente han mostrado asociación a LPHA (Jugessur, 2008; Rahimov, 2008). Mutaciones en este gen se sabe que causan dos enfermedades alélicas con herencia autosómica dominante que cursan con LPH: el síndrome de van der Woude (VWS) y Pterigium poplíteo (PPS) (Kondo, 2002). VWS es uno de los mejores modelos de LPHA ya que aproximadamente el 15% de los pacientes afectados con este síndrome es indistinguible de los casos que cursan con LPHA. Esta observación llevo a la hipótesis de que variantes en *IRF6* también estaban involucradas en la etiología del LPHA, lo cual fue confirmado posteriormente (Zucchero, 2004 y Jugessur, 2008).

IRF6 se ubica en 1q32.3-q41, tiene una longitud de 20443 bp con una estructura de 9 exones y 8 intrones (Genecard, 2007), el gen codifica para una proteína de 467 aminoácidos con un peso molecular de 53 KDa. *IRF6* pertenece a una familia de 9 factores de transcripción que comparten un dominio de unión a DNA del tipo hélice y un dominio de unión a proteínas menos conservado (Kondo, 2002). Se expresa importantemente en el borde del ectodermo de las bóvedas palatinas antes y durante la formación del paladar secundario (Ben, 2005; Washbourne, 2006). Los miembros de la familia de IRF se sabe que regulan una variedad de mecanismos de defensa del hospedero ya que ratones deficientes en *Irf* 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 y 9 presentan una respuesta inmune deficiente (Ingraham, 2006) sin mostrar ninguna anomalía estructural, sin embargo, ratones deficientes en *Irf6*

presentan alteraciones en la piel, extremidades y desarrollo craneofacial (Kondo, 2002).

El SNP rs2235371 ubicado en *IRF6* es un cambio de sentido erróneo (c.820G>A, p.V274I). Este polimorfismo causa la sustitución de una isoleucina por una valina, en un dominio de unión a proteína conocido como SMIR por lo que este cambio pudiera influir en la capacidad de unión de *IRF6* a su ligando (Scrichomthong, 2005). Por otro lado, también se ha observado que este polimorfismo se encuentra en DL con la variante rs642961, la cual es un SNP que causa una disrupción del sitio de unión al factor de transcripción AP-2 α , lo que se ha relacionado con una disminución en la transcripción de *IRF6* (Rahimov, 2008).

Ratones con células nulas de AP-2 α presentan LPH y alteraciones en la región maxilar y mandibular, por un desarrollo anormal de las prominencias faciales. En el gen *TFAP2A*, que codifica a AP-2 α , se han identificado mutaciones responsables del síndrome denominado branquio-óculo-facial, el cual presenta algunas características similares a las observadas en el síndrome de van der Woude (Milunsky, 2008). El gen *TFAP2A* se localiza en el cromosoma 6p24 y anomalías cromosómicas que involucran esta región, se han asociado a la presencia de fisuras craneofaciales (Lidral, 2005). Los datos anteriores apoyan que *IRF6* y AP-2 α participan en una ruta común en el desarrollo embrionario, por lo que alteraciones en su función pueden contribuir a la patogénesis del LPHA.

Otro SNP que se ha asociado a LPHA es rs2235375, que se encuentra en el intrón seis de *IRF6* a 185 bases río abajo del sitio donador de splicing. Este SNP es una transversión C>G de la cual se desconoce si tiene un efecto en el splicing, aunque esto parece poco probable, dado que no se encuentra en una región enhancer de splicing o cerca del sitio donador o aceptor de splicing (Genecards, 2007). Este polimorfismo ha mostrado asociación con LPHA ($p= 0.002$) (Scapoli, 2005) y se ha analizado principalmente en estudios de desequilibrio de transmisión debido a que es uno de los polimorfismos con mayor índice de heterocigocidad (0.482) dentro del gen *IRF6*. En población del oeste de China este polimorfismo mostró una fuerte asociación con hendiduras orales en un estudio TDT con una

sobretransmisión del alelo G con valor de $p < 0.000$ sin especificar un valor de OR (Huang, 2009).

Adhesión celular

PVRL1

El gen polivirus receptor-related 1 (*PVRL1*) codifica para la nectina-1, una molécula de adhesión célula-célula, la cual en el embrión de ratón se expresa principalmente en el epitelio del borde medio de las bóvedas palatinas (Suzuki, 2000). *PVRL1* se localiza en 11q23.3, mide 90Kb y está conformado por 13 exones y 12 intrones, sufre de splicing alternativo que genera tres isoformas, de las cuales la alfa es la de mayor peso molecular con 57KDa y 457 residuos de aminoácidos en su cadena polipeptídica. Las nectinas, incluyendo a *PVRL1*, regulan la velocidad de la formación de las uniones adherentes epiteliales en cooperación con las cadenas y las subsecuentes uniones fuertes de las células epiteliales (Honda, 2003).

Se ha reportado una mutación sin sentido p.W185X (c.554G>A) en este gen a la cual se le ha asignado el número de referencia rs104894281 en la base de datos de SNP, en donde se considera una variante con efecto clínico, ya que individuos homocigotos para la mutación p.W185X presentan el síndrome de displasia ectodérmica con labio hendido (CLPED1), que cursa con labio paladar hendido y anomalías ectodérmicas como cabello escaso y delgado, dientes cónicos y uñas anormales. El síndrome CLPED1 es relativamente común en la población indígena de la isla Margarita en Venezuela y un estudio en regiones cercanas a esta isla se detectó que esta mutación es un factor de riesgo para el desarrollo de LPHA en individuos heterocigotos con un valor de $p = 0.00039$ (Sözen, 2001).

Los estudios de asociación entre la mutación p.W185X de *PVRL1* en estado heterocigoto con LPHA han mostrado resultados inconsistentes, lo cual puede ser debido a las diferencias étnicas de las poblaciones analizadas, así, aparentemente en Asia no existe asociación con LPHA dado que ésta variante es extremadamente rara en este grupo (Tseng, 2006; Ichikawa, 2006) y en Italia existe una ligera asociación con un OR de 1.9 (Scapoli, 2006), mientras que, como

ya se mencionó, en el norte de Venezuela la asociación es muy fuerte ($p=0.00039$) (Sözen, 2001).

Se ha analizado la asociación de otras variantes del gen *PVRL1* con LPHA (Turhani, 2005; Avila, 2006). Entre ellas destaca el SNP rs7940667 (c.1083G>T) el cual es un cambio de sentido erróneo p.G361V. Esta variante presentó asociación en un estudio de TDT en donde se incluyeron muestras de poblaciones de Brasil y Argentina, en conjunto con Filipinas, Dinamarca y Iowa EU ($P<0.04$) (Avila, 2006). El polimorfismo p.G361V se encuentra en el exón 6 y el cambio de aminoácido se localiza en el dominio transmembranal de la proteína. El aminoácido glicina parece ser el alelo ancestral ya que se observa en la misma posición en las proteínas de chimpancé, perro, rata y ratón. El alelo raro valina se presenta en el 10 y 6% de los casos de LPHA observados en Iowa y Filipinas respectivamente. Al realizar un análisis *in silico* con el programa ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE2/>) se determinó que este cambio de nucleótido causa la pérdida del sitio enhancer de splicing, probablemente generando un splicing aberrante (Avila, 2006).

Enzimas del metabolismo de los folatos.

MTHFR

El ácido fólico ha sido considerado un factor ambiental asociado a LPHA, por ello se ha considerado a los genes relacionados al metabolismo de los folatos como posibles factores genéticos que pueden tener un efecto sobre el riesgo a presentar LPHA (Mills, 2008). El gen *MTHFR* es de los más analizados en este sentido, dado que su producto es una enzima clave dentro de la ruta metabólica de los folatos (van Rooij, 2003).

MTHFR se ubica en el cromosoma 1 en p36.3, tiene un tamaño de 20 Kb y está conformado por 11 exones y 10 intrones, *MTHFR* codifica para una enzima que en su forma activa es un homodímero en donde cada cadena polipeptídica está conformada por 656 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 74.6 KDa (Genecard, 2007). La enzima codificada es la 5-10 Metilentetrahidrofolato reductasa la cual tiene un papel principal en el metabolismo de los folatos al convertir el 5,10 metilentetrahidrofolato, un donador de carbono en la biosíntesis

de nucleótidos, a 5 metilentetrahidrofolato, un donador de carbono en la remetilación de la homocisteína a metionina (Goyette, 1998).

Dos variantes han sido ampliamente analizadas dentro de este gen y su asociación a LPHA (van Rooij, 2003) las cuales son dos SNP's: rs1801133 y rs1801131. EL SNP rs1801133 es una transición C>T, también nombrado en la literatura como 677 C>T, es un cambio de sentido erróneo que sustituye a un codón de alanina por uno de valina en la posición 222. El SNP rs1801131 (también conocido como 1298 A>C) es una transversión A>C en la posición c.1515, el cual es un cambio de sentido erróneo que causa la sustitución de un glutamato en alanina en el residuo 429 de la proteína.

Se ha descrito que la variante rs1801133 está presente en el 58% de la población de la Ciudad de México mientras que la variante rs1801131 se encuentra hasta en el 14% en esta misma población (Guéant-Rodríguez, 2006), por lo que se considera que ambas tienen una alta prevalencia. En la mayoría de los estudios donde se han analizado estas variantes no se ha encontrado asociación con LPHA (Shaw, 1998; Tolarova, 1998; Martinelli, 2001; Grunert, 2002; van Rooij, 2003; Shotelersuk, 2003; Pezzetti, 2004; Gaspar, 2004; Brandalize, 2007; Ali, 2009; Boyles, 2008, Dávalos-Rodríguez, 2009), lo cual apoya aún más un reciente meta-análisis publicado en 2007 (Verkleij-Hagoort, 2007).

En muy pocos estudios se ha observado asociación significativa con la variante rs1801133, dentro de los cuales se encuentra uno realizado en población de Irlanda (66 casos, 848 controles), en el cual tomaron como el grupo de riesgo los individuos homocigotos para el alelo T. En este trabajo al analizar a los pacientes que sólo tenían labio hendido no observaron asociación (OR=1.65 95%CI=0.81-3.35), pero en pacientes con la presencia de solo paladar hendido sí identificaron una asociación (OR=3.23 95%CI=1.32-7.86) al igual que al combinar los grupos se encontró una asociación positiva significativa (OR 2.06 95%CI 1.16-3.66) (Mills, 1999). Sin embargo, el mismo grupo en un trabajo posterior con un tamaño de muestra mayor (492 casos LPHA, 321 PHS y 1599 controles) no identificaron asociación entre esta variante y LPHA (OR 1.08 IC95% 0.78-1.50) (Mills, 2008). Un grupo en China ha realizado dos estudios de asociación de la variante

rs1801133 con LPH en poblaciones del norte y del sur de China, en el primero al analizar 77 tríos del norte en la que reportan una sobretransmisión del alelo T (OR 2.24 IC 95% 1.08-4.65), mientras que en la población del sur con 93 tríos no se observó esta asociación (Zhu, 2006); en el segundo estudio analizan 188 tríos del norte de China y reportan asociado el alelo T a un mayor riesgo de presentar LPHA, ya sea en estado heterocigoto (OR 3.11 IC95% 1.18-8.23) o en estado homocigoto (OR 3.36 IC95% 1.14-9.93) (Zhu, 2010).

En Francia en un estudio que incluyó 148 casos y 168 controles, al comparar la prevalencia de individuos homocigotos para el alelo C y homocigotos para el alelo T se reporta una asociación casi significativa con LPHA e incluso los autores mencionan un posible efecto protector del alelo T (OR 0.54 IC95% 0.3-1.1) (Chevrier, 2007), dado que se ha postulado que una baja actividad de MTHFR causada por la presencia del alelo T, podría elevar los niveles intracelulares del metabolito 5,10-metilentetrahidrofolato que es necesario para la conversión de desoxi-uracil-monofosfato (dUMP) a desoxi-tirosin-monofosfato (dTMP), lo que resultaría en una menor incorporación incorrecta de uracilo al DNA que condicionaría un efecto protector para presentar LPHA (Ma, 1997), sin embargo, es el único estudio en la literatura que menciona esta asociación de LPH con el alelo T como factor de protección.

Como se mencionó previamente, la asociación de la variante 1801131 (1298A>C) en el gen *MTHFR* y LPHA ha sido analizada en varios estudios, casi siempre en conjunto con la variante rs1801133 (677C>T), sin embargo en la mayoría de ellos no se ha observado asociación estadística, un meta-análisis al analizar 5 estudios no encuentra asociación de esta variante con LPHA OR 0.87 (IC95% 0.61-1.23) (Verkleij-Hagoort, 2007) y otro estudio realizado en Noruega no incluido en este meta-análisis tampoco encuentra asociación entre rs1801131 y LPHA (Jugessur, 2003). Un estudio realizado en población de Estonia al analizar 100 casos de LPHA y 205 controles reporta al SNP rs1801131 asociado a LPHA con un valor de OR de 0.59 (IC95% 0.40-0.86 p= 0.0067) (Jagömagi, 2010), en este estudio los autores reconocen ser el único estudio en donde esta variante se reporta asociada a LPHA a pesar de ser tan ampliamente analizada en la literatura.

En la tabla 3 se resumen los reportes mencionados de asociación de las variantes genéticas analizadas en este estudio el riesgo de presentar LPHA.

Tabla 3. Estudios previos con asociación positiva de las variantes genéticas incluidas en este estudio con LPHA.

Variante	Población	Tamaño de muestra	OR ó valor de p	Referencia
<i>TGFA</i> g.101537_101540 delTAAT (TaqI)	Iowa EUA	80 casos, 98 controles	p= 0.0047	Ardinger, 1989.
	Filadelfia EUA	100 casos 98 controles	p= 0.03	Sassani, 1993.
	Francia	96 casos 100 controles	p= 0.0003	Chenevix-Trench, 1992.
	Inglaterra	57 casos 60 controles	p< 0.001	Holder, 1996.
<i>TGFA</i> rs11466297	Iowa EUA	80 casos 98 controles	p= 0.0052	Ardinger, 1989.
	Chile	80 casos 102 controles	OR 4.9	Jara, 1995.
	Francia	96 casos 100 controles	p= 0.013	Chenevix-Trench, 1992.
<i>TGFA</i> RsaI	Inglaterra	60 casos, 60 controles	p= 0.037	Holder, 1992.
	Francia	96 casos 100 controles	p= 0.022	Chenevix-Trench, 1992.
	Iowa EUA	80 casos 98 controles	p= 0.044	Ardinger, 1989.
<i>TGFB3</i> rs3917168	Japón	112 casos, 192 controles	p= 0.0016	Ichikawa, 2006.
<i>MSX1</i> rs12532	EUA, Corea, Singapur, Taiwan, Chile.	2297 trios 150 trios	OR= 0.26 AA IC95% 0.10-0.99 p= 0.016	Park, 2007. Suazo, 2010.
	Iowa EUA Baltimore EUA	197casos, 159controles	p= 0.013	Lidral, 1998.
		206 trios	p= 0.005	Fallin, 2003.
	<i>MSX1</i> rs104893854	EUA y Filipinas	1,098 casos	0.15% en casos
Vietnam		100 casos	3% en casos	Tongkobetch, 2006.
<i>IRF6</i> rs2235371	Multiétnico	1968 familias	TDT p<10 ⁻⁹	Zucchero, 2003.
	Multiétnico	1716 casos-trios, 2090 controles	p= 1 X10 ⁻¹¹	Rahimov, 2008.
<i>IRF6</i> rs2235375	Italia	219 trios	TDT p= 0.002	Scapoli, 2005.
	China	206 trios	TDT p= 0.000	Huang, 2009.
<i>PVRL1</i> rs7940667	Multiétnico	800 trios	TDT p=0.04	Avila, 2006.

<i>PVRL1</i> rs104894281	Venezuela	243 casos, 145 controles	p= 0.00039	Sözen, 2001.
	Italia	143 casos, 292 controles	OR 1.9	Scapoli, 2006.
<i>MTHFR</i> rs1801133	Norte de China	188 trios	OR 3.36 IC 95% 1.14-9.93	Zhu, 2010.
	Norte de China	93 trios	OR 2.24 IC 95% 1.08-4.65	Zhu, 2006.
<i>MTHFR</i> rs1801131	Estonia	100 casos, 205 controles	p= 0.0067	Jagomägi, 2010

Región cromosómica 8q24

En el año 2009 dos grupos independientes, mediante estudios de escaneo amplio del genoma, con el análisis de aproximadamente 500,000 SNP, encontraron una fuerte asociación entre LPHA y la región cromosómica 8q24, el primer reporte fue realizado por Birnbaum y cols, al analizar 224 casos y 383 controles de origen alemán (Birnbaum, 2009), encontraron una fuerte asociación con una región de 640Kb ubicada en 8q24.21, en la cual no se localizan genes conocidos, estos autores observaron que los SNP's con la asociación más fuerte fueron rs987525 ($p=3.34 \times 10^{-24}$) y rs17241253 ($p=1.11 \times 10^{-23}$). La asociación de LPHA con esta región fue confirmada poco después en un estudio realizado en población de Filadelfia Estados Unidos, con 111 casos y 5951 controles siendo nuevamente el SNP rs987525 el que presentó el valor de asociación más significativo ($p=9.18 \times 10^{-8}$) (Grant, 2009).

Los genes más cercanos a esta región se encuentran a 900 Kb río abajo y 800 Kb río arriba entre los que se encuentran el protooncogen *PVT1* y el gen *GSDMC* miembro de la familia de las gasmerdinas. De acuerdo a su función, ambos genes tienen poca probabilidad de participar en alguna ruta del desarrollo facial. En el estudio realizado por Birnbaum en Alemania se trató de identificar posibles transcritos originados en esta región con dos paneles de expresión, uno de origen fetal y otro adulto; sin embargo, no se encontró ningún transcrito que tuviera su

origen en esta región del genoma. En el mismo estudio se buscaron la presencia de elementos regulatorios en *cis* o en *trans* por medio del análisis de bases de datos de expresión en líneas celulares de linfoblastos sin resultados positivos. Al tratar de identificar una posible interacción entre las variantes en 8q24 y polimorfismos del gen *IRF6*, en específico el SNP rs642961 previamente asociado con LPH, no se encontró evidencia de interacción. Por lo anterior, el mecanismo por el cual esta región de 640 Kb participa o se asocia a la patogénesis del LPHA permanece desconocida (Nikopensius, 2009).

Tabla 4. Estudios de Asociación de LPHA y la región cromosómica 8q24.

Referencia	Población	Tamaño de muestra	Variantes analizadas	Método de análisis	OR ó valor de p.
Birnbaum, 2009.	Alemania	952 controles y 462 casos	rs987525, rs17241253	Escaneo amplio del genoma.	p= 3.34X10 ⁻²⁴ ; p=1.1X10 ⁻²³
Grant, 2009	Filadelfia EUA	5051 controles y 111 casos	rs987525	Escaneo amplio del genoma.	p= 9.18X10 ⁻⁸
Nikopensius, 2009.	Estonia y Lituania	1023 controles y 105 casos en Lituania; 244 controles y 112 casos.	rs987525	Replicación resultados de genes candidatos. Prueba de Armitage.	p= 5.97X10 ⁻⁵ Estonia; p= 1.60X10 ⁻⁵
Beaty, 2010.	Eusopea y asiática	825 tríos Europeos y 1038 Asiáticos.	rs987525	Escaneo amplio del genoma.	p= 5X10 ⁻¹⁶ Europeos; p=0.00893 Asiáticos. No asociado en muestras de Guatemala, Filipinas, China e India.
Rojas-Martínez, 2010	Maya de Chiapas	303 controles y 149 casos	rs987525	Replicación resultados de genes candidatos. Prueba de Armitage.	OR 6.36 (1.69-23.95) CC vs AA
Blanton, 2010	Texas.	37 familias y 91 tríos Hispanos de origen mexicano; 83 familias y 234 tríos Blancos no hispanos.	rs987525, rs17241253	Replicación resultados de genes candidatos. Análisis TDT.	rs982575 (p= 0.000003); rs17241253 (p= 0.001) para el grupo blanco no Hispano. No se encuentra asociación en el grupo de Hispanos.
Mostowska, 2010	Polonia.	175 controles y 175 casos.	rs987525	Replicación resultados de genes candidatos. Análisis TDT.	rs987525 OR 3.79 IC95% 1.9-7.9 p= 0.00072 CC vs AA
Weatherley-White, 2011	Kenia	105 controles y 128 casos.	rs987525	Replicación resultados de genes candidatos. Análisis TDT.	No asociación, rs98525 p= 0.97
Brito, 2012	Brasil	336 controles y 563 casos.	rs987525	Replicación resultados de genes candidatos. Análisis TDT.	CC vs AC p = 0.0016 (OR 1.80 IC95% 1.21-2.69); CC vs AA OR 2.71 IC95% 1.47-4.96)

Xu, 2012	Sur de China	200 controles y 216 casos	rs987525	Replicación resultados de genes candidatos. Análisis TDT.	No asociación de rs98525.
Hikida, 2011	Japón	190 controles y 176 casos	rs987525	Replicación resultados de genes candidatos. Análisis TDT.	No asociación de rs98525 y los otros 12 SNP's analizados en 8q24.

Posterior a estos dos reportes se han publicado trabajos realizados en diferentes poblaciones en donde se ha observado asociación de esta región con LPHA. En el este de Europa se observó asociación del SNP rs987525, ubicado en esta región 8q24, con un valor de $p=5.97 \times 10^{-5}$ en la prueba de Armitage y un OR de 5.56 (IC95% 2.52-12.3) para homocigotos en población de Estonia (105 casos y 1023 controles) y un valor de $p=1.60 \times 10^{-5}$ en la prueba de Armitage y un OR de 11.13 (IC95% 3.0-41.36) para homocigotos en población de Lituania (112 casos y 244) (Nikopensius, 2009). Otro estudio al analizar este mismo SNP en Polonia con 175 casos y 175 controles lo encontraron asociado a LPHA tanto en individuos heterocigotos (OR 1.74 IC95% 1.2-2.5) como para los individuos homocigotos para el alelo menor (A) (OR 3.79 IC95% 1.9-7.9) (Mostowska, 2010). Finalmente destacamos el trabajo realizado en México en población Maya del estado de Chiapas en el que reportan asociación de este SNP rs987525 y LPHA en individuos homocigotos para el alelo A (OR 6.36 IC95% 1.69-23.95) mientras que ésta asociación no fue observada con heterocigotos (Rojas-Martínez, 2010).

En un reporte en donde realizan un escaneo amplio del genoma confirman la asociación de 8q24 con LPHA. La variante rs987525 en 825 tríos de ascendencia Europea mostró asociación ($p=5 \times 10^{-16}$) así como en 1038 tríos de ascendencia Asiática ($p=0.00893$). Sin embargo en este mismo estudio rs987525 no mostró asociación en tríos de Guatemala, Filipinas, China e India (Beaty, 2010). En otro estudio en donde no encontraron asociación de 10 variantes ubicadas en 8q24, incluida rs98725, fue realizado en Texas al analizar 37 familias y 91 tríos Hispanos de origen Mexicano (Blanton, 2010). Estos estudios indican que la asociación de ésta región de 8q24 con LPHA varía de acuerdo al origen étnico de la población analizada, ya que en poblaciones de origen caucásico existe una clara asociación,

mientras que en poblaciones de origen asiático la asociación estadística es menor (Beaty, 2010) y poblaciones hispanas no se observa ésta asociación (Blanton, 2010).

FOXE1, *MAFB*, *ABCA4*, 17q22 y 10q25.3.

Estudios genéticos recientes, principalmente estudios de escaneo amplio del genoma, han identificado nuevas regiones de susceptibilidad asociadas a LPHA. En un estudio realizado en 273 familias afectadas de origen Colombiano, 464 tríos de Iowa EU y 577 familias de Filipinas, en el cual se analizaron 397 SNP's localizados en la región 9q22-q33 y secuenciando los genes candidatos ubicados en esta región, previamente asociada a LPHA en estudio de escaneo amplio del genoma (Marazita, 2004), reportan asociación de SNP's y haplotipos en el gen *FOXE1* con valores de $p=1.45 \times 10^{-8}$. Los resultados fueron replicados en poblaciones europeas de Dinamarca y Noruega. Al analizar juntas todas poblaciones se encontró a los SNP's rs3758249 y rs4460498 con valores de asociación de $p= 5.01 \times 10^{-13}$ y $p= 6.51 \times 10^{-12}$ respectivamente, ambos SNP's se localizan en un bloque de disequilibrio de ligamiento de 70 kb en el que se encuentra *FOXE1* (Moreno, 2009).

En otro estudio de escaneo amplio del genoma realizado en 401 casos y 1323 controles de Europa central y a los cuales se les analizó 500, 000 SNP's reportan dos nuevos loci asociados a LPHA, el primero en 17q22 (rs227731 $p= 1.07 \times 10^{-8}$ y con un riesgo relativo para homocigotos ($RR_{\text{hom}}= 1.84$, IC 95% 1.34-2.53, en esta región se encuentra codificada la proteína Noggin por el gen *NOG*, esta proteína es un antagonista de las proteínas de la familia de TGF β que participan en el desarrollo craneofacial. El segundo locus se ubicó en 10q25.3 (rs7078160 $p= 1.92 \times 10^{-8}$ y $RR_{\text{hom}}= 2.17$, IC 95% 1.32-3.56) y en esta región se localizan dos genes *KIAA1598* y *VAX1*; ratones con mutaciones homocigotas para *vax1* muestran malformaciones craneofaciales incluyendo paladar hendido (Mangold, 2010).

Los genes *MAFB* y *ABCA4* fueron identificados como asociados a LPHA en un estudio de escaneo amplio del genoma en una población de 825 tríos de ascendencia europea y 1038 tríos de ascendencia Asiática en donde el SNP rs13041247 cercano a *MAFB* en 20q12 mostró un OR= 0.704 IC95%= 0.63- 0.77

$p = 2.05 \times 10^{-11}$ y también el SNP rs560426 cercano a *ABCA4* en 1p22 con un OR= 1.43 IC95%= 1.29- 1.58 $p = 5.70 \times 10^{-12}$ (Beatty, 2010). En este mismo trabajo reportan asociación de variantes ubicadas en *IRF6* y 8q24, pero estas regiones ya habían sido reportadas previamente.

INTERACCIÓN GEN-GEN Y GEN AMBIENTE

La interacción (o epistasis) gen-gen y la interacción gen-ambiente son consideradas como una desviación de la linealidad que existe entre un genotipo y un fenotipo. Biológicamente se considera a la epistasis como responsable de las desviaciones de la segregación Mendeliana (Moore, 2006). Se ha propuesto que las interacciones gen-gen y gen-ambiente tienen una participación en la etiología del LPHA, por lo que es importante investigar estas interacciones, ya que el efecto independiente que pueden tener las variantes genéticas con respecto al LPHA puede estar sesgado si la interacción que puede existir entre diferentes factores no es tomada en cuenta (Mossey, 2009). A pesar de lo anterior existen pocos estudios que analicen la interacción gen-gen y gen-ambiente debido probablemente a que las herramientas estadísticas para este tipo de análisis no eran lo suficientemente poderosas. Recientemente se han desarrollado nuevos modelos matemáticos para realizar interacciones que han permitido en los últimos años aumentar el número de estudios en donde las interacciones son analizadas (Moore, 2006). Como ejemplo de lo anterior se puede mencionar el análisis de las variantes rs1801133 (677C>T) y rs1801131 (1298A>C) del gen *MTHFR* en niños con LPHA y sus madres (189 madres de controles y 170 madres de casos) y su interacción con la suplementación periconcepcional con ácido fólico, realizado por van Rooij que al estimar los OR y los intervalos de confianza observó que las madres que no consumieron ácido fólico y que son portadores de al menos un alelo T de la variante rs1801133 5.59 (IC95% 1.1-30.9) al ser comparadas con aquellas madres que no eran portadores del alelo T y que consumieron ácido fólico en los primeros meses de embarazo (van Rooij, 2003)

La interacción gen-ambiente determinada por el cálculo de OR e intervalo de confianza, fue observada entre la variante 5'UTR.1 (del1083_1087AGAGGG) en el gen *TGFB3* y el consumo de tabaco en por lo menos un estudio en el cual la

variante 5'UTR.1 no mostró un efecto independiente asociado a LPHA (OR 1.1 IC95% 0.6-2.1), al igual que el consumo sólo de tabaco en los dos primeros meses de embarazo (OR 1.3 IC95% 0.7-2.3 para un consumo de más de 10 cigarros al día). Sin embargo, niños homocigotos para la delección del hexanucléotido AGAGGG y cuyas madres consumieron más de 10 cigarros al día en los 2 primeros meses de embarazo presentaron un OR para LPHA de 2.8 (IC95% 1.1-4.7) al ser comparados contra niños homocigotos para el alelo sin delección y cuyas madres no fumaron en los 2 primeros meses de gestación (Romitti, 1999).

Más recientemente se ha descrito interacción entre el SNP rs17015218 del gen *IRF6* y la suplementación con multivitamínicos durante el embarazo por medio de un análisis de regresión logística condicional en una muestra de 326 tríos de origen Chino. El SNP rs17015218 no mostró asociación de manera independiente a LPHA ($p= 0.74$) y no reportan si el consumo de multivitamínicos de manera independiente se asocio a LPHA; sin embargo, en este estudio se reportó que el genotipo AG para la variante rs17015218 en combinación con el consumo de multivitamínicos reduce el riesgo a LPHA (OR 0.13 IC95% 0.02-0.99) (Wu, 2010). También se ha descrito interacción gen-gen entre el SNP rs642961 ubicado en el gen *IRF6* con cada uno de tres SNP's (rs987525, rs17241253 y rs1530300) ubicados en la región en 8q24 con valores de p de 0.0038, 0.0072 y 0.004 respectivamente, estas interacciones se observaron al analizar 317 familias no Hispánicas de Texas por el método de ecuaciones de estimación generalizadas (Blanton, 2010).

Recientemente se ha descrito interacción entre las variantes en los genes de la familia *FGF* (factor de crecimiento de fibroblastos) en una muestra de 297 tríos de cuatro poblaciones diferentes. En específico la variante rs2043278 en *FGF18* y la variante rs12870202 en *FGF9* mostraron interacción al ser analizadas por una prueba de razón de verosimilitud con un valor de $p=0.0001$ (Wang, 2011). Finalmente también se ha reportado la interacción gen-gen con respecto a la presencia de LPHA para variantes en genes relacionados al metabolismo del ácido fólico al analizar 184 madres controles y 186 madres de casos. En dicho estudio se observó la interacción entre tres variantes: *MTHFR* rs2274976,

MTHFD1 rs2236225 y *SCL19A1* rs1051266 (OR 5.36 IC95% 1.03-27.83) por MDR (Bufalino, 2010). En la tabla 5 se resumen las principales características de estudios que han analizado la interacción gen-ambiente y gen-gen con respecto a LPHA.

Tabla 5. Estudios de análisis de interacción gen-gen y gen-ambiente y LPHA.

Referencia	Población	Tamaño de muestra	variables con interacción	Método de análisis	OR ó valor de p
Romitti, 1999	Iowa EUA.	407 controles 378 casos	Variante 5' UTR.1 de TGFB3 y consumo de tabaco en los primeros dos meses de embarazo.	Estimación de OR e Intervalo de confianza por tablas de contingencia.	2.3 (IC95% 1.1-4.7)
Van Rooij, 2003	Holanda	189 controles, 170 casos	Consumo de ácido fólico y Genotipo rs1801133 (677C>T) de <i>MTHFR</i> en madres	Estimación de OR e Intervalo de confianza por tablas de contingencia.	5.59 (IC95% 1.1-30.9)
Wu, 2010	China	326 tríos	rs17015218 en IRF6 y consumo de multivitamínicos.	Regresión logística condicional	0.13 (IC95% 0.02-0.99)
Blanton, 2010	Texas EUA	317 familias no Hispánicas y 128 familias Hispánicas	rs987525, rs17241253, rs1530300 en 8q24 y rs642961 en IRF6 Interacción sólo observada en familias Hispánicas	Ecuaciones de estimación generalizadas	rs642961-rs987525 p=0.0038. rs642961-rs17241253 p=0.0072. rs642961-rs1530300 p=0.004
Bufalino, 2010	Brasil	184 madres de controles y 186 madres de casos	rs2274076 de <i>MTHFR</i> , rs2236225 <i>MTHFD1</i> y rs1051266 <i>SLC19A1</i>	Reducción de la dimensionalidad multifactorial (MDR)	Interacción entre las tres variantes OR 5.36 (IC95% 1.03-27.83) p=0.03
Wang, 2011	Maryland EUA; Taiwan; Singapur y Corea	297 tríos	rs2043278 en <i>FGF18</i> y rs12870202 en <i>FGF9</i>	Prueba de razón de verosimilitud	p= 0.0001

JUSTIFICACIÓN

El labio paladar hendido tiene un fuerte impacto en la calidad de vida del paciente que lo padece. El tratamiento de estos pacientes es multidisciplinario y de largo plazo. Con estos antecedentes y dada su alta prevalencia se considera un problema de salud pública; por ello, el LPHA y otras malformaciones congénitas se encuentran dentro de las líneas prioritarias de investigación de la Secretaría de Salud de México.

El LPHA tiene una etiología compleja por lo que es necesario identificar tanto los factores genéticos como ambientales que la componen, así como los mecanismos que lo originan. El estudio del componente genético en la etiología del LPHA ha sido analizado y reportado en la literatura científica desde hace tiempo, en estos reportes se ha demostrado la asociación de ciertas variantes de algunos genes y regiones cromosómicas con un mayor riesgo de presentar esta malformación; sin embargo, en la mayoría de estos análisis se han obtenido resultados inconsistentes, debido probablemente a la variación en el origen étnico de las poblaciones estudiadas y que pueden condicionar variaciones en las frecuencias alélicas de las variantes que se analizan.

En población Mexicana sólo existen dos reportes del análisis de variantes genéticas y su asociación a LPHA. Dado que se cuenta con poca información en nuestra población, consideramos que es importante realizar más estudios que permitan conocer los componentes genéticos que participan en la etiología de esta malformación. Los resultados obtenidos en este trabajo permitirían conocer mejor el papel de los genes candidatos estudiados en la etiología de este padecimiento en población mestiza mexicana. Así mismo creemos que estos resultados pueden servir como un punto de referencia para estudios similares en poblaciones con un origen étnico similar al de la población mexicana.

Estudios previos en otras poblaciones han buscado interacciones entre diferentes factores genéticos y ambientales que afecten el riesgo a presentar LPHA, sin embargo los estudios realizados en México no han buscado estas interacciones,

por lo cual en este estudio realizamos el análisis de interacción de todas las variantes genéticas y ambientales analizadas.

OBJETIVOS

GENERAL:

Identificar asociaciones entre la presencia de labio paladar hendido aislado y las variantes polimórficas de los genes estudiados en población mexicana.

PARTICULARES:

- 1.- Establecer la frecuencias alélicas y genotípicas para cada una de las variantes analizadas tanto en el grupo de casos como el de controles.
- 2.- Analizar cada uno de los marcadores genéticos para identificar asociaciones significativas con LPHA.
- 3.- Conformar haplotipos entre los marcadores genéticos y realizar análisis de haplotipos de asociación a LPHA.
- 4.- Analizar posibles interacciones Gen-Gen y Gen-Ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS.

DISEÑO DEL ESTUDIO Y DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA.

Es un estudio de asociación, de casos y controles, en el que se buscaron posibles asociaciones entre LPHA y 19 variantes genéticas localizadas en seis genes candidatos: *MTHFR* (rs1801133, rs1801131), *TGFA* (rs11466297, RsaI, g.101537_101540delTAAT), *TGFB3* (rs11466419), *MSX1* (rs104893854, rs12532, rs34165410), *PVRL1* (rs7940667, rs104894281), *IRF6* (rs2235371, rs2235375) y la región cromosómica 8q24 (rs987525, rs17241253, rs10956463, rs759944, rs16903635, rs7843646) en una población mestiza Mexicana de la Ciudad de México y su área conurbada. Se capturaron 132 pacientes diagnosticados con LPHA y 370 controles sanos; todos los individuos incluidos nacieron en la Ciudad de México y sus padres residieron en dicha ciudad por lo menos un año previo al nacimiento de los participantes. Los padres y los abuelos de todos los participantes eran mexicanos. Los pacientes con LPHA se incluyeron durante su seguimiento médico en los servicios de genética, cirugía o estomatología del Instituto Nacional de Pediatría y contaron con una evaluación integral por un genetista clínico (Dra. Ariadna González del Ángel o por la Dra. Bernardette Estandía Ortega), con lo cual se excluyeron aquellos casos con cualquier dato sugerente de una forma sindrómica de LPH. El grupo control se conformó por niños que se encontraban en seguimiento de protocolos de seguridad por la aplicación de vacunas en el mismo Instituto, quienes fueron considerados como sanos de acuerdo a la evaluación de un pediatra. Se aplicó un cuestionario a las madres de los casos y controles para conocer antecedentes sobre la historia familiar, exposición de la madre a teratógenos durante el embarazo y consumo de ácido fólico en el periodo periconcepcional (Anexo I). Se obtuvo DNA de los individuos por el método de precipitación salina (Gentra Systems, Minneapolis, USA) o por el método de adsorción en sílica (QIAamp DNA blood mini kit, QIAGEN, Germantown, MD, USA) a partir de sangre periférica (casos) o mucosa oral (controles). Se contó con la aprobación para la realización del estudio por parte de los comités de Ética e Investigación del Instituto. Todos los padres de los

casos y controles firmaron una carta de consentimiento informado para su inclusión en el estudio (Anexos II, III, IV y V).

El tamaño de muestra fue calculado a partir del reporte de asociación positiva a LPHA para la variante con menor frecuencia alélica en el programa en línea Power for Association With Error (PAWE) (<http://linkage.rockefeller.edu/pawe/>). En este caso fue la variante rs34165410 del gen MSX1 con una frecuencia alélica para el alelo menor de 0.016 para casos y 0.055 para controles según lo reportado en una población de Iowa (Lidral, 1998). El poder estadístico ingresado al programa 0.90 bajo un modelo de error de Gordon-Heat-Liu (no se asume un sesgo en la genotipificación) y un nivel de significancia mínimo de 0.05. El cálculo de del poder estadístico para las variantes se realizó también con el programa PAWE a partir de las frecuencias alélicas obtenidas.

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE LA MUESTRA

Dado que la población mestizo Mexicana es genéticamente heterogénea realizamos un análisis de la estructura genética poblacional para disminuir el riesgo de asociaciones espurias debido a estratificación dentro de la muestra. Un panel de 10 marcadores informativos de ascendencia (AIM's) (rs223830, rs203096, rs722098, rs17203, rs3340, rs2862, rs4884, rs1800498, rs2695, rs723822) fue genotipificado; este panel ha sido previamente utilizado en estudios de casos y controles en México (Jiménez-Morales, 2009; Villalobos-Comparán, 2008; Martínez-Marignac, 2007). Los 10 AIM's utilizados distinguen principalmente entre ascendencia Europea y Amerindia ($\delta > 0.44$). La genotipificación fue realizada utilizando un ensayo KASPar system. Se utilizó el programa STRUCTURE para identificar estratificación dentro de las muestras infiriendo el valor de α . Valores de $\alpha > 1$ implican que la mayoría de los individuos son mestizos (Pritchard, 2000). Los parámetros y los resultados detallados de este análisis se presentan en el Anexo VII.

SELECCIÓN DE GENES CANDIDATOS Y VARIANTES GENÉTICAS

Las variantes en los genes *MTHFR*, *TGFA*, *TGFB3*, *MSX1*, *IRF6* y *PVRL1* fueron seleccionadas bajo el criterio de que cada una de ellas tuviera por lo menos un reporte positivo de asociación a LPHA en la literatura (Ardinger, 1989; Holder, 1992; Vieira, 2005; Zuccherro, 2004; Scapoli, 2005; Lidral, 1998; Park, 2007; Suzuki, 2004; Ichikawa, 2006; Sözen, 2001; Avila, 2006; Zhu, 2009; Jagomägi, 2010). En la región 8q24, libre de genes, se analizaron seis SNP's; dos de estos: rs987525 y rs17241253, fueron los que presentaron los valores de asociación estadística mayor en los dos primeros reportes de asociación de esta región (Birnbaum, 2009; Grant, 2009). Los otros cuatro SNP's fueron seleccionados con base en las frecuencias alélicas reportadas en México con una frecuencia del alelo menor (FAM) mayor a 0.1 y por su localización, para abarcar al menos 337 Kb de la región de 640 Kb.

GENOTIPIFICACIÓN

Las variantes rs1801133, rs1801131 en *MTHFR*, g.101507_101540delTAAT, RsaI, rs11466297 en *TGFA* y rs2235371 en *IRF6* fueron genotipificadas por PCR-restricción como se ha descrito en la literatura (van der Put, 1998; Hwang, 1995; Srichomthong, 2005). La variante rs104893854 en *MSX1* fue analizada por un método de mutagénesis dirigida y restricción previamente reportado (Tongkobpetch, 2006). Para la detección de la variante rs104894281 (p.W185X) en el gen *PVRL1* estandarizamos un método de PCR-restricción, para ello se diseñaron primers para amplificar la región que flanquea la variante, utilizando la secuencia de referencia NG_013083.1 (Primer Forward: 5' CCTTTTGGCCGGTGCATCTT3' Reverse: 5'AAGGAGAGGAGGAGGGAGGA3'), el producto de PCR de 441 pb fue restringido con la endonucleasa *AvrII*; en presencia del alelo A de la variante (c.554G>A) se generan dos fragmentos de restricción, uno de 252bp y otro de 189bp de longitud, los cuales fueron analizados en geles de agarosa al 2%.

Las variantes rs12532 en el gen *MSX1*, rs2235375 en el gen *IRF6*, rs7940667 en *PVRL1*, rs3917168 en *TGFB3* y rs987525, rs17241253, rs10956463, rs759944,

rs16903635, rs7843646 en 8q24 fueron genotipificadas por el método de discriminación alélica en tiempo real con ensayos TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA.). Todas las sondas utilizadas existían comercialmente en el catálogo de ensayos prediseñados y evaluados por el proveedor.

El SNP rs3416410 en *MSX1* fue genotipificado por medio de un ensayo KASPar System por la empresa KBiosciences (Hertfordshire, UK, <http://www.kbioscience.co.uk/>). Para evaluar la confiabilidad de la genotipificación por esta técnica se seleccionó el 10% de las muestras al azar y fueron analizadas por duplicado, y se encontró un cien por ciento de concordancia entre las muestras.

Para confirmar nuestros resultados de genotipificación las variantes analizadas por PCR-restricción fueron corroboradas por secuenciación en un grupo de muestras seleccionadas al azar mientras que las variantes analizadas por discriminación alélica por PCR tiempo real fueron estudiadas por duplicado. Los primers utilizados para las reacciones de PCR, las condiciones de restricción y los programas de termociclado se presentan en el anexo VIII

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) fue analizado para todas las variantes por el método exacto de Fisher. Para la detección de asociación entre los marcadores genéticos y LPHA se utilizó una prueba de tendencia de Armitage-Cochran de dos colas y los valores de significancia y OR para todas las variantes se calcularon con el programa en línea DeFinetti (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>), se aplicó la corrección de Bonferroni a los valores estadísticamente significativos.

El análisis de haplotipos se realizó en aquellas variantes ubicadas en el mismo gen y que además se encontraran en desequilibrio de ligamiento (DL), considerando que existe DL cuando los valores de D' son mayores a 60 ($D' > 60$), utilizando el programa Haploview (Barret, 2005). Los haplotipos con valores de asociación de $p < 0.05$ se sometieron a una prueba de permutación de 100,000 repeticiones en el mismo programa. Se consideró una asociación positiva a LPHA

si un haplotipo mostraba un valor de significancia <0.05 después del análisis de permutación.

La interacción gen-gen y gen-ambiente se analizó en primera instancia por una regresión logística binaria en la cual se parearon todas las variantes genéticas versus todas las variantes genéticas (interacción gen-gen) y todas las variantes genéticas versus factores ambientales (no consumo de ácido fólico materno, consumo materno de tabaco y alcohol) (interacción gen-ambiente) bajo modelos dominantes y recesivos con el paquete estadístico SPSS (Version 17.0, Chicago IL, USA). Las variantes con posibles interacciones ($p < 0.05$) en el análisis por regresión logística se utilizaron para generar modelos de dos o tres atributos para ser analizados por método MDR por sus siglas en inglés, versión 2.0 β 8.4 disponible en <http://www.epistasis.org/>. Los mejores modelos finales se obtuvieron a partir de los valores de "Testing Accuracy" (TA) para cada modelo. Se utilizó una validación cruzada "Cross Validation" (CV) de 10; la significancia estadística de los modelos de MDR obtenidos se calculó con el módulo de permutación en el programa MDR después de 10,000 repeticiones.

RESULTADOS

Los datos generales de la muestra con respecto a la edad promedio, género, consumo de ácido fólico y lateralidad del defecto se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Datos clínicos y demográficos de los casos y controles. *AF Ácido Fólico.		
	Controles n=370	Casos n=132
Edad promedio (años)	1.27	5.5
Género	51% Varones	68% Varones
	49% Mujeres	32% Mujeres
Consumo Periconcepcional de AF*	13%	1.5%
Consumo Preconcepcional de AF	1%	0%
Consumo Postconcepcional de AF	59.3%	45.8%
Consumo de AF	73.3%	47.3%
Antecedente de LPHA en la Familia (Primer y segundo grado)	1%	16%
Lateralidad del defecto		44% Izquierdo
		24% Derecho
		31% Bilateral

El antecedente de consumo periconcepcional de ácido fólico (tres meses antes y tres meses después de la concepción) fue muy bajo en nuestra muestra (13% controles, 1.5% casos), por lo que establecimos como una sola variable el antecedente de ingesta de ácido fólico agrupando a las madres que consumieron dicho suplemento ya fuera de manera periconcepcional, preconcepcional (tres meses antes de la concepción) o postconcepcional (tres meses después de la concepción). Se determinó el OR o riesgo de tener un hijo con LPHA en aquellas madres que consumieron ácido fólico con respecto a las que no lo consumieron con la prueba de Ji cuadrada, el cual fue de 0.29 lo que indica que las madres que consumieron ácido fólico tiene un riesgo menor de tener un hijo con LPHA con respecto a las que no lo consumieron, los datos se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Odds Ratio de presentar LPHA con Consumo vs No Consumo de ácido fólico. *no se cuenta con datos de tres casos.

	Consumo	No consumo
Casos	61	68*
Controles	279	91
	OR 0.29 IC95% [0.19-0.44] p<0.0001	

Dentro del cuestionario aplicado a las madres también se preguntó sobre el antecedente de consumo de medicamentos, alcohol o tabaco durante los tres meses posteriores a la concepción. En cuanto a consumo de medicamentos, el 30% de las madres de los casos y 15% de las madres de los controles tuvieron el antecedente positivo; en ambos grupos sólo 2% consumió más de un medicamento, sin embargo, dentro de los medicamentos utilizados, sólo se identificó uno (Amoxicilina) que se ha relacionado en la literatura con la presencia de LPHA, el cual fue referido por una madre en cada grupo. El consumo de tabaco se observó en el 8.3% en las madres de casos y en el 7.5% de controles; sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas al analizarlas por una prueba de Ji cuadrada (OR 0.89, IC95% 0.43-1.85). Con respecto al alcohol, 9% de las madres de casos y el 6.7% de controles refirieron consumirlo, sin ser una diferencia estadísticamente significativa (OR 0.71 IC95% 0.34-1.45).

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL

El análisis de estratificación en la muestra por medio del programa STRUCTURE calculó un valor de $\alpha = 3.31$, lo que indica que no existe subestructura poblacional dentro o entre los grupos (ver anexo VII).

ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DE MARCADORES INDIVIDUALES Y DE HAPLOTIPOS

Con relación a los resultados de las variables genéticas, no se identificó la presencia del alelo menor para las variantes rs104893854 en *MSX1*, rs104894281 en *PVRL1* y rs3917168 en *TGFB3* en nuestra muestra, por lo que no se incluyeron en el análisis estadístico. Las otras variantes analizadas se encontraron en EHW excepto rs11466297 en el gen *TGFA*, ya que esta variante estuvo fuera de EHW

tanto en casos como en controles, debido a ello ésta variante fue descartada del estudio (Tabla 8).

Tabla 8. Variantes analizadas en el estudio, frecuencias genotípicas y prueba de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg por la prueba exacta de Fisher.

Variante	Alelos	Genotipo controles	Prueba de desviación del equilibrio de HW Controles	Genotipo casos	Prueba de desviación del equilibrio de HW Casos
<i>MTHFR</i> rs1801133	C/T	55/172/143	p=0.8254	38/55/39	p=0.0567
<i>MTHFR</i> rs1801131	A/C	260/94/16	p=0.0636	103/25/4	p=0.1180
<i>IRF6</i> rs2235371	G/A	163/162/45	p=0.6436	75/50/7	p=0.8164
<i>IRF6</i> rs2235375	C/G	141/165/64	p=0.1932	36/71/25	p=0.3845
<i>TGFA</i> RsaI	CG/TT	313/52/5	p=0.1602	113/19/0	p=1.00
<i>TGFA</i> g.101537_101540 delTAAT (TaqI)	TAAT/ delTAAT	365/5/0	p=1.000	129/3/0	p=1.00
<i>TGFA</i> rs11466297	C/A	308/45/17	p=9.77X10⁻⁹	102/21/9	p=0.0002
<i>TGFB3</i> rs11466419	T/G	370/0/0	p=1.00	132/0/0	p=1.00
<i>MSX1</i> rs104893854	C/A	95/0/0	p=1.00	90/0/0	p=1.00
<i>MSX1</i> rs34165410	C/T	274/28/0	p=1.00	116/9/1	p=0.2037
<i>MSX1</i> rs12532	G/A	66/166/138	p=0.1957	15/60/57	p=1.00
<i>PVRL1</i> rs104894281	G/A	95/0/0	p=1.00	90/0/0	p=1.00
<i>PVRL1</i> rs7940667	C/A	358/12/0	p=1.00	126/6/0	p=1.00
8q24 rs987525	C/A	267/91/12	p=0.2333	89/42/1	p=0.1234
8q24 rs17241253	T/C	330/40/0	p=0.6132	112/19/1	p=0.57829
8q24 rs10956463	A/C	221/124/25	p=0.1936	69/53/10	p=1.00
8q24 rs759944	A/G	115/169/86	p=0.1177	45/59/28	p=0.29247
8q24 rs16903635	T/G	259/96/15	p=0.1382	90/41/1	p=0.1954
8q24 rs7843646	T/G	152/166/52	p=0.5747	50/65/17	p=0.7100

Se realizó la prueba de tendencia de Armitage-Cochran para cada una de las variantes para identificar asociación con LPHA. Se encontró una asociación significativa después de la corrección de Bonferroni para dos variantes: rs1801133 (677C>T) en el gen *MTHFR* con un OR 0.64 y con un valor corregido de $p=0.022$ para el alelo T de la variante, dado que el alelo T se presentó en una mayor proporción en los controles (0.62) que en los casos (0.50); la segunda variante fue rs2235371 (p.V274I) en el gen *IRF6* con un OR=0.60 y valor corregido de $p=0.043$ para el alelo A, ya que se observó una mayor proporción del alelo A (que codifica para isoleucina) en controles (0.34) que en casos (0.24). El resto de las variantes no mostró valores significativos de asociación. La tabla 9 muestra los resultados de asociación obtenidos para cada uno de los marcadores.

El análisis de haplotipos se realizó en variantes ubicadas en los genes *IRF6*, *MSX1* y en la región 8q24, dado que fueron los únicos que mostraron variantes en DL. El haplotipo "G-G" formado por los SNP's rs2235371 y rs2235375 ubicados en *IRF6* mostraron asociación a un mayor riesgo de LPHA después del análisis de permutación ($p=0.02$). Los haplotipos formados en *MSX1* y en 8q24 no mostraron asociación a un mayor riesgo de LPHA. La tabla 10 muestra los resultados completos del análisis de los haplotipos formados.

Tabla 9. Análisis de asociación por la prueba de tendencia de Armitage-Cochran de marcadores independientes.

Variante	Alelos	Genotipo controles	*FAM controles	Genotipo casos	*FAM casos	Odds ratio, significancia
<i>MTHFR</i> rs1801133	C/T	55/172/143	0.62 (T)	38/55/39	0.50 (T)	OR 0.64 **p=0.022
<i>MTHFR</i> rs1801131	A/C	260/94/16	0.17 (C)	103/25/4	0.12 (C)	OR 0.73 p=0.10
<i>IRF6</i> rs2235371	G/A	163/162/45	0.34 (A)	75/50/7	0.24 (A)	OR 0.60 **p=0.043
<i>IRF6</i> rs2235375	C/G	141/165/64	0.40 (G)	36/71/25	0.46 (G)	OR 1.26 p=0.08
<i>TGFA</i> RsaI	CG/TT	313/52/5	0.08 (TT)	113/19/0	0.07 (TT)	OR 0.91 p=0.55
<i>TGFA</i> g.101537_101540 delTAAT (TaqI)	TAAT/delTAAT	365/5/0	0.01 (delTAAT)	129/3/0	0.01 (delTAAT)	OR 1.7 p=0.46
<i>TGFB3</i> rs11466419	T/G	370/0/0	0.00 (G)	132/0/0	0.00 (G)	ND
<i>MSX1</i> rs104893854	C/A	95/0/0	0.00 (A)	90/0/0	0.00 (A)	ND
<i>MSX1</i> rs34165410	C/T	274/28/0	0.04 (T)	116/9/1	0.04 (T)	OR 1.22 p=0.86
<i>MSX1</i> rs12532	G/A	66/166/138	0.40 (A)	15/60/57	0.34 (A)	OR 1.31 p=0.08
<i>PVRL1</i> rs104894281	G/A	95/0/0	0.00 (A)	90/0/0	0.00 (A)	ND
<i>PVRL1</i> rs7940667	C/A	358/12/0	0.02 (A)	126/6/0	0.02 (A)	OR 0.65 p=0.48
8q24 rs987525	C/A	267/91/12	0.16 (A)	89/42/1	0.17 (A)	OR 1.07 p=0.67
8q24 rs17241253	T/C	330/40/0	0.05 (C)	112/19/1	0.08 (C)	OR 0.63 p=0.13
8q24 rs10956463	A/C	221/124/25	0.24 (C)	69/53/10	0.28 (C)	OR 1.20 p=0.19
8q24 rs759944	A/G	115/169/86	0.46 (G)	45/59/28	0.44 (G)	OR 1.10 p=0.49
8q24 rs16903635	T/G	259/96/15	0.17 (G)	90/41/1	0.16 (G)	OR 1.26 p=0.08
8q24 rs7843646	T/G	152/166/52	0.36 (G)	50/65/17	0.38 (G)	OR 0.98 p=0.77

*Frecuencia del alelo menor. ** Después de corrección de Bonferroni.

Tabla 10. Análisis de asociación de haplotipos en los genes *IRF6*, *MSX1* y en 8q24.

Locus	SNP's	* D'	Alelos	Haplotipo	Valor de P
<i>IRF6</i>	rs2235371 (p.V274I), rs2235375	0.70	G/A, C/G	G-C	0.999
				G-G	0.020
				A-C	0.162
				A-G	0.069
8q24	rs759944, rs16903635	0.64	A/G, T/G	A-T	1.00
				A-G	0.987
				G-T	0.999
				G-G	1.00
8q24	rs17241253, rs987525	0.89	T/C, C/A	T-C	0.917
				T-A	1.00
				C-A	0.999
8q24	rs7843646, rs10956463	0.65	T/G, A/C	T-A	0.999
				T-C	0.996
				G-A	0.923
				G-C	0.871
8q24	rs16903635, rs17241253	0.86	T/G, T/C	T-T	0.999
				G-T	0.991
				G-C	0.999
<i>MSX1</i>	rs34165410, rs12532	0.84	C/T, G/A	C-G	0.653
				C-A	0.572
				T-A	0.992

*Se utilizó el estadístico D' para determinar el DL entre dos o más variantes. Valores de D' > 0.60 entre dos variantes fueron considerados que se encontraban en DL.

ANÁLISIS DE INTERACCIÓN GEN-AMBIENTE Y GEN-GEN

El análisis de regresión logística entre el no consumo de ácido fólico materno y las variantes genéticas mostraron interacción significativa entre el SNP rs17241253 localizado en 8q24 en un modelo recesivo.

La interacción entre las variantes genéticas y el consumo de alcohol y tabaco también fueron analizadas, sin embargo ninguna fue estadísticamente significativa, esto probablemente se debió a la baja proporción de madres con antecedente de consumo de estas sustancias en el embarazo.

En el análisis de interacción variante vs. variante se observaron 3 interacciones ya que dos SNP's localizados en 8q24 (rs17241253, rs16903635) mostraron, cada uno de ellos, interacción significativa con el SNP rs2235375 ubicado en *IRF6*, ambos en un modelo recesivo mientras que los SNP's rs17241253 y rs784364, localizados en 8q24, mostraron interacción significativa en un modelo recesivo. Todos los resultados significativos en el análisis de regresión logística se muestran en la tabla 11.

Atributos	Modelo	OR	IC95%	Significancia
Folcon* vs. rs17241253	Recesivo	4.503	1.34 -15.15	0.015
rs2235375 vs. rs17241253	Recesivo	4.502	1.13-17.86	0.032
rs2235375 vs. rs16903635	Recesivo	4.157	1.32-13.14	0.015
rs17241253 vs. rs7843646	Recesivo	3.540	1.06-11.80	0.039

***Folcon= Consumo de ácido fólico.**

Basados en los resultados obtenidos en el análisis de regresión logística se realizó un análisis por MDR con modelos de dos o tres atributos con los SNP's ubicados en el gen *IRF6*, la región cromosómica 8q24 y el consumo o no consumo de ácido fólico materno como factor ambiental. Los mejores modelos se obtuvieron basados en los valores de "Testing Accuracy" (TA), se encontró interacción significativa en dos modelos: el primero entre el SNP rs17241253 en 8q24 y la variable de consumo de ácido fólico materno con valor de OR 4.12 $p < 0.0001$ tomando al grupo de bajo riesgo como referencia, ya que este grupo incluye a los individuos que bajo el mejor modelo de interacción, obtenido por el programa, tienen la combinación de genotipos o de exposición a factores ambientales que más disminuyen el riesgo a presentar LPHA. El segundo modelo identificó interacción positiva entre los SNP's rs2235371 en *IRF6*, con rs784364 y rs17241253 en 8q24 con un valor de OR 3.01 y $p < 0.0006$ tomando el grupo de bajo riesgo como de referencia. Los resultados del análisis de interacción por MDR se presentan en la tabla 12.

Tabla 12. Resultados significativos por análisis de MDR de los modelos de interacción gen-ambiente y gen-gen.

Atributos	Precisión de la prueba (TA)	Consistencia CV	OR	Significancia*
Folcon y rs17241253	0.6590	10/10	4.12	$p < 0.0001$
rs2235371, rs17241253 y rs7843646	0.6136	10/10	3.01	$p < 0.0006$

*La significancia de los modelos se calculó a partir del análisis de permutación con 10,000 repeticiones.

DISCUSION

CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA.

El labio paladar hendido aislado es un problema de salud pública en México y el mundo, ya que requiere un tratamiento integral que demanda una atención multidisciplinaria a lo largo de la vida del paciente, lo que representa un importante gasto de recursos económicos y humanos. En México se ha establecido una incidencia del LPHA de 1/1000 recién nacidos vivos y que de acuerdo a la tasa de nacimientos en el año 2012 reportada por el Inegi representa unos 2068 casos nuevos al año. Por esta alta incidencia es importante identificar los factores de riesgo genéticos y ambientales que predisponen a padecer a esta malformación en la población Mexicana.

En este estudio de asociación, de casos y controles, todos los pacientes con LPHA fueron examinados por un Genetista clínico para descartar a individuos con formas sindrómicas mientras que los controles fueron considerados sanos posterior a una evaluación por un Pediatra; lo anterior, lo consideramos una fortaleza, dado que en este tipo de estudios es de vital importancia realizar un examen clínico cuidadoso ya que la incorrecta clasificación de los casos o controles pueden condicionar un sesgo con resultados falsos de asociación; por ejemplo, se ha reportado que la inclusión incorrecta de pacientes con síndrome de Van der Woude en el grupo de casos con LPHA puede llevar a una asociación falsa con el gen *IRF6* ya que mutaciones en este gen son causales del síndrome mencionado (Jehee, 2009).

La mayoría de los casos analizados (68%) fue del género masculino, con una relación 2:1 con respecto a mujeres, esto concuerda con lo que se ha reportado en la literatura (Mossey, 2009). Esta diferencia en la incidencia del LPHA entre sexos no ha podido ser explicada, pero se ha postulado que el defecto puede causar una mortalidad fetal mayor en el sexo en el que se observa con menor frecuencia (Christensen, 1992).

En nuestra muestra, la edad promedio de los casos fue mayor a la de los controles (5.5 años vs 1.27 años), esta diferencia es estadísticamente significativa

($p < 0.0001$) y se debe a que el grupo de casos fue captado durante su tratamiento y seguimiento dentro de diferentes servicios del hospital, mientras que los controles fueron incluidos en el periodo de seguimiento de seguridad posterior a la aplicación de vacunas, lo cual se realiza a edades tempranas. Desconocemos el impacto de esta diferencia de edad entre los grupos en nuestros resultados, el mayor efecto de la diferencia de edad en este tipo de estudios es que existan cambios en el medio ambiente en el que se encuentran los casos y los controles. En nuestro estudio la diferencia promedio entre los grupos es de poco más de 4 años, esto podría ser un periodo de tiempo pequeño para que existan cambios significativos en las condiciones ambientales de la Ciudad de México (Velázquez-Aragón, 2012). Otros estudios no toman en cuenta la diferencia de edad entre casos y controles como una fuente de sesgo (Rojas-Martínez, 2010) y otros estudios, incluso comparan casos y controles de diferentes poblaciones con diferencias de años en su recolección (Moreno, 2009)

CONSUMO DE ÁCIDO FÓLICO Y LPHA.

.A pesar de que en México en los últimos años se ha implementado una vigorosa campaña para la prevención de malformaciones congénitas, como los defectos del cierre del tubo neural, invitando a las mujeres en edad reproductiva a consumir un suplemento de ácido fólico de manera periconcepcional. En nuestro estudio un porcentaje bajo (47.3%) de madres de niños con LPHA consumió un suplemento de ácido fólico en el periodo preconcepcional, periconcepcional o postconcepcional, sin embargo este porcentaje es menor (1.5%) si sólo consideramos aquellas que lo hicieron en el periodo periconcepcional, que es el recomendado para realizar el consumo de dicho suplemento de manera preventiva (Velázquez-Aragón, 2012). Este fenómeno ya había sido previamente observado en otro reporte en la ciudad de México, en donde en un grupo de 200 mujeres embarazadas sólo el 1.7% consumió la cantidad internacionalmente recomendada de ácido fólico (400 μg) durante el periodo periconcepcional (Canún-Serrano, 2009). Lo anterior, podría sugerir que en nuestra población el consumo recomendado de ácido fólico periconcepcional no se lleva a cabo adecuadamente,

sin embargo, se debe resaltar que el no tener este antecedente de consumo de un suplemento de ácido fólico en las madres no es necesariamente un indicador de una deficiencia de folatos, dado que este nutriente lo pueden obtener de la dieta. El mecanismo por el cual se ha propuesto que una deficiencia de folato puede influir en la etiología de las malformaciones congénitas como el LPHA, no se ha establecido claramente, pero existen algunas hipótesis: la primera menciona que cuando la concentración de 5-metiltetrahidrofolato es baja, como consecuencia la remetilación de la homocisteína a metionina también estará disminuida y los grupos metilo necesarios para la metilación del DNA serán escasos dado que la homocisteína, después de su conversión a S-adenosilmetionina, es el donador de grupos metilo más importante en el organismo; así, la hipometilación del DNA podría llevar a un cambio en la transcripción de genes involucrados en la formación del labio y el paladar. Por otro lado, el aumento de la homocisteína en plasma y líquido amniótico se considera teratogénico, ya que puede dar lugar a disrupción del desarrollo normal del paladar en el feto al favorecer la apoptosis inducida por estrés oxidativo (Van Rooij, 2003; Rosenquist, 1996; Andoloro, 1998; Rosenquist, 1999).

Existe evidencia en la literatura de que la suplementación con ácido fólico periconcepcional puede prevenir el LPHA, uno de estos estudios es un meta-análisis publicado en 2007 (en donde se incluyen cinco estudios prospectivos y doce estudios de casos y controles) el cual mostró un riesgo relativo de 0.77 (IC95% 0.65-0.90) para LPHA ante el consumo positivo de ácido fólico (Badovinac, 2007). A pesar de que el porcentaje de madres que consumieron un suplemento con ácido fólico fue bajo en nuestro estudio, nuestros hallazgos también apoyan la hipótesis de un efecto protector al consumir ácido fólico en el periodo pre, peri o postconcepcional con relación al riesgo de presentar LPHA (OR 0.29, IC 95% 0.19-0.44).

ANÁLISIS DE FACTORES AMBIENTALES Y LPHA.

En los pocos estudios el consumo de alcohol y de tabaco por las madres durante el embarazo se ha reportado como factor que aumenta el riesgo de tener hijos con

LPHA (Little, 2004; Leite, 2009), en este trabajo no se evidenció dicha asociación debido a la baja proporción de madres que tuvieron antecedentes positivos de consumo de estos teratógenos, ya que sólo 11 madres de 132 casos y 28 madres de 370 controles refieren haber fumado durante el embarazo y con respecto al consumo de alcohol materno este fue positivo para 12 de los 132 casos y para 25 de los 370 controles. Con respecto a la exposición a agentes teratogénicos farmacológicos se observó que el 30% de las madres de los casos y 15% de las de los controles consumieron medicamentos durante los primeros meses de embarazo. De los medicamentos referidos no se identificó ninguno relacionado con la presencia de LPHA, con excepción de la amoxicilina en una madre en cada uno de los grupos; la ingesta de este antibiótico se ha asociado previamente a la presencia de LPHA en el estudio realizado por Puhó y colaboradores (2007) con un OR de 15.9 con IC95% 4.9-5.12, sin embargo en el presente trabajo dado el bajo número de madres con exposición a este teratógeno no se pueden hacer conclusiones al respecto.

ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DE MARCADORES INDIVIDUALES Y DE HAPLOTIPOS.

Con relación al análisis de variantes génicas; el SNP rs11466297 en *TGFA* fue la única que estuvo fuera de EHW; la causa más común descrita por la cual una variante se encuentra fuera de EHW es una incorrecta genotipificación (Xu, 2002), sin embargo, en nuestro estudio descartamos esta posibilidad, ya que se corroboró el genotipo definido al analizar a un número de muestras por otra metodología (secuenciación) sin encontrar discrepancias. Adicionalmente se genotipificaron para esta variante 92 muestras (consideradas como controles para otros estudios) encontrando frecuencias alélicas y genotípicas similares. De acuerdo a lo anterior, las posibles explicaciones para no observar este polimorfismo en EHW en nuestra población pueden ser: que sea una variante de reciente incorporación en la población causada por un flujo génico por migración o que por azar estemos observando esta variable fuera de EHW (Xu, 2002), en cualquier caso esta variante fue descartada del análisis.

En nuestro trabajo, el SNP rs1801133 en *MTHFR* mostró asociación con LPHA (OR 0.64); sin embargo, en la literatura, la mayoría de los estudios en donde se ha analizado este polimorfismo no ha mostrado asociación con LPHA (Shaw, 1998; Pezzetti, 2004; Gaspar, 2004), incluso en el estudio realizado en población del estado de Jalisco (Dávalos-Rodríguez, 2009), aunque cabe mencionar que en este último estudio el tamaño de la muestra fue pequeño (60 casos y 70 controles), lo que disminuye el poder estadístico para detectar asociación.

Entre los pocos estudios que asocian esta variante con LPHA se encuentra el realizado en población China, en donde la presencia de homocigocidad para el alelo T mostró un mayor riesgo a LPHA con un OR de 6.31 (IC95% 1.35-29.48) en 65 tríos del norte de China (Zhu, 2006); sin embargo, el mismo estudio no encontró asociación en 74 tríos del sur de dicho país. El mismo autor realizó un estudio posterior con un tamaño de muestra mayor (188 tríos) en el cual confirmó los hallazgos previamente descritos de asociación observados en el norte de China (OR 3.36 IC95% 1.14-9.93) (Zhu, 2010). Otro reporte que asocia el alelo T del SNP rs1801133 fue desarrollado en una población de la India en donde analizaron 318 casos y 214 controles y encuentran que la heterocigocidad para el alelo T confiere un riesgo elevado para LPHA (OR 1.89 IC95% 1.22-2.92); para la homocigocidad para el alelo T reportan un valor de OR mayor (4.3), pero sin llegar a ser estadísticamente significativo (IC95% 0.94-19.66), esta discrepancia los autores la atribuyen al hecho de que en su muestra existen menos individuos homocigotos T que individuos heterocigotos, lo que disminuye el poder estadístico, pero si la muestra fuera mayor, probablemente se observaría asociación estadística al comparar homocigotos (Ali, 2009).

A diferencia de lo observado en los estudios de Zhu, donde la presencia del alelo T en el gen *MTHFR* aumenta el riesgo a presentar LPHA, nosotros observamos que este alelo disminuye el riesgo; al respecto sólo hay un estudio previo, realizado en Francia, que apoya nuestras observaciones ya que también encuentran una tendencia de que el alelo T disminuye el riesgo a LPHA cuando comparan individuos CC vs TT (OR=0.54 CI 0.3-1.1) en 148 casos y 168 controles (Chevrier, 2007), sin ser datos estadísticamente significativos. Los autores

retoman una posible explicación a este fenómeno de protección a LPHA ante la presencia del alelo T, propuesta originalmente en 1997 en la que se plantea que la inhibición de la actividad de MTHFR (ante la presencia del alelo T) puede elevar los niveles de 5,10-metilentetrahidofolato, el cual es requerido para la conversión de dUMP a dTMP, lo anterior podría ser protector a LPHA al disminuir la incorrecta incorporación de uracilo durante la síntesis de DNA (Ma, 1997); otra posibilidad mencionada en el mismo trabajo de Chevrier es que este SNP sea un marcador sin efecto sobre la función de la proteína, pero que se encuentra en desequilibrio de ligamiento con otra variante funcional responsable de conferir el riesgo a presentar LPHA. Debido a que la mayoría de los estudios no encuentran asociación de rs1801133 en *MTHFR* con LPHA y a que sólo hay un estudio previamente descrito en la literatura que observó un efecto protector, como en el presente trabajo, consideramos necesario aumentar el tamaño de nuestra muestra para confirmar nuestro hallazgo, aún cuando con la muestra que analizamos en este trabajo el poder estadístico es de 0.86.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio para la variante rs2235371 en *IRF6* (mayor proporción del alelo A en nuestro grupo de controles), muestran evidencia de asociación entre la variante rs2235371 en *IRF6* y LPHA, al igual que en otros estudios, por ejemplo, este polimorfismo ha sido asociado a LPHA (OR 1.9 para el alelo G, $p < 10^{-9}$) en una cohorte multiétnica (Zuccherro, 2004) y esta asociación ha sido replicada consistentemente en diferentes estudios con valores de significancia entre 0.013 y 9×10^{-6} (Marazita, 2009; Rahimov, 2008; Park, 2007; Huang, 2009; Jugessur, 2008; Birnbaum, 2009) y un valor de OR de 1.63 (Mostowska, 2010). Sólo un estudio en Brasil no encontró asociación de LPHA con rs2235371, sin embargo, los autores proponen que este resultado se puede deber a la baja frecuencia del alelo menor (A) (alrededor de 5%) en su muestra tanto en casos ($n=228$) como en controles ($n=126$) (Paranaiba, 2010). La posible explicación funcional a esta asociación, es que *IRF6* es un factor transcripcional el cual se expresa de manera importante en el ectodermo en las bóvedas palatinas antes y durante la formación del paladar secundario (Jugessur, 2009). Se ha propuesto que el alelo G de rs2235371 se encuentra en fuerte DL con el alelo A

del SNP rs642961 ubicado en la región enhancer de *IRF6*, este último alelo afecta un sitio de unión a AP-2 α , lo que origina una menor transcripción de *IRF6* (Rahimov, 2008), recientemente un estudio en población china demostró asociación entre los SNP's rs3798691, rs1675414, rs303050 ubicados en el gen *TFAP2A* que codifica para AP-2 α (Shi, 2011) y recientemente se identificó a AP-2 α como co-regulador de un grupo de genes asociados a labio paladar hendido como *IRF6*, *TGFB3*, *TGFA*, *PVRL1*, *FGRF2*, *BMP7* y *TGFB1* (McDade, 2012) y la asociación de la variante rs2235371 con LPHA. En el presente trabajo no se analizó la variante rs642961, pero sería conveniente incluirla en futuros estudios ya que un reporte de Europa central mostró un efecto independiente de las variantes rs2235371 y rs642961 (Birnbbaum, 2009).

En nuestro estudio el haplotipo "G-G" formado por rs2235371 y rs2235375 en *IRF6* asoció a un mayor riesgo a presentar LPHA ($p=0.02$), este mismo hallazgo fue descrito en una población del Oeste de China (Huang, 2009). Dado que la presencia de estas dos variables no se ha demostrado que tengan un efecto funcional sobre el gen *IRF6*, una posible explicación de la asociación de este haplotipo con LPHA es que estas variables probablemente están en DL con otra u otras variables con efecto funcional sobre la expresión del gen por ejemplo SNP rs642961, la cual como ya se mencionó, afecta un sitio de unión del factor de transcripción AP-2 α (Rahimov, 2008). En nuestro estudio no se realizó el análisis de la variante rs642961 ya que las variantes a genotipificar en este estudio fueron elegidas antes de la publicación del estudio de Rahimov y a pesar de que posteriormente se incluyeron otras variantes en nuestro estudio, rs642961 no fue contemplada dentro de estas. En el estudio en el realizado por Huang en China tampoco se analizó la variante rs642961, por lo que se requieren más estudios para entender la participación del haplotipo "G-G" en el desarrollo de LPHA.

A diferencia de lo observado en población caucásica, no encontramos asociación significativa entre la región 8q24 y LPHA en el análisis de marcadores individuales ni en el de haplotipos; resultados similares se han observado en Hispanos de ascendencia Mexicana en Texas en 37 familias con más de un afectado y 91 tríos (Blanton, 2010). En un estudio previo en México un SNP en esta región (rs987525)

mostró asociación a LPHA en una población de ascendencia Maya, en donde se analizaron 149 casos y 303 controles; sin embargo, esta asociación sólo se observó en individuos homocigotos para el alelo menor (OR 6.36 IC95% 1.69-23.95 $p= 0.0071$)(Rojas-Martínez, 2010). En dicho estudio los casos fueron evaluados por un genetista para descartar formas síndrómicas de LPHA al igual que en nuestro trabajo, pero no se realizó un análisis de la estructura poblacional para descartar estratificación. Este SNP rs987525 no mostró asociación en nuestro estudio, ya fuera en individuos heterocigotos u homocigotos para el alelo menor. Esta diferencia entre nuestro estudio y el realizado por Rojas-Martínez, no es llamativa dado que muy probablemente étnicamente las dos poblaciones son diferentes y se conoce que la asociación de los polimorfismos de 8q24 a LPHA depende del origen étnico, evidencia importante de lo anterior, es aportada por un estudio de escaneo amplio del genoma (GWAS) con una cohorte grande de familias con LPHA (825 de origen europeo y 1038 de origen asiático) en el que encontraron una fuerte asociación en tríos de ascendencia Europea ($p=5 \times 10^{-16}$) y una asociación menos significativa en tríos de ascendencia asiática ($p=0.00893$); pero no identificaron asociación en tríos originarios de Guatemala, Filipinas, India y China (Beaty, 2010).

ANÁLISIS DE INTERACCIÓN GEN-AMBIENTE Y GEN-GEN

El análisis de interacción génica y ambiental reveló en nuestra muestra interacción entre el antecedente de consumo de ácido fólico materno que interactúa con la variante rs17241253 localizada en 8q24, sin embargo, este es el primer reporte en el que se busca esta interacción, por lo que no podemos comparar nuestros hallazgos con lo observado en otras poblaciones.

Otros estudios que han realizado análisis de interacción génica ambiental han mostrado resultados interesantes por ejemplo, en un estudio en 326 tríos de China al analizar 22 SNP's localizados en *IRF6* y el consumo de vitamínicos durante el embarazo reportó interacción entre el antecedente de consumo de multivitamínicos y las variantes rs2076153 (OR 1.28, IC95% 1.01–1.63 para el no consumo de multivitamínicos y el genotipo AG) y rs17015218 (OR 0.13, IC95%

0.02–0.99 para el si consumo de multivitamínicos y el genotipo AG) en *IRF6* por un método de regresión logística (Wu, 2010). Otro estudio realizado en Brasil con 106 madres de casos con LPHA y 184 controles, utilizaron el método de regresión logística para identificar interacción entre el no consumo de multivitamínicos y el genotipo G/A en el SNP rs2274976 ubicado en el gen *MTHFR* lo que incrementó el OR hasta 8.34 (IC95% 3.75-18.55, $p=0.000001$) (Bufalino, 2010). En nuestro estudio no se analizaron ninguna de las variantes reportadas en estos dos trabajos por lo que sería conveniente considerarlas en análisis futuros.

Con relación a interacciones gen-gen observamos interacción entre las variantes rs7843646 y rs17241253 localizadas en 8q24 y el SNP rs2235371 en *IRF6* (OR 3.01, $p<0.0006$). En el primer reporte que mostró asociación de la región 8q24 con LPHA se buscó una posible interacción entre esta región e *IRF6* por medio de un modelo de regresión logística, sin tener un resultado positivo entre los SNP's rs642961 (*IRF6*) y rs987525 (8q24) en 224 casos y 383 controles (Birnbbaum, 2009). Mientras que en un estudio en Texas, se identificó interacción entre el SNP de *IRF6* rs642961 y tres SNP's de 8q24 (rs1530300, $p=0.004$; rs17241253, $p=0.0072$ y rs987525; $p=0.0038$) sólo en población blanca no hispana con un método de ecuaciones generalizadas de estimación (Blanton, 2010). Nosotros encontramos interacción entre *IRF6* y 8q24, aunque no con los mismos SNP's descritos previamente. Estos resultados apoyan la interacción de la región 8q24 y el gen *IRF6* para conferir un riesgo mayor a LPHA, aunque se desconoce el mecanismo molecular exacto que lo condiciona.

CALCULO DEL TAMAÑO DE NUESTRA Y PODER ESTADÍSTICO

El cálculo de muestra realizado para este estudio basado en las frecuencias alélicas menores reportadas en la literatura para las variantes analizadas dio un resultado de 208 casos y 417 controles (anexo VI), la cual no pudo ser alcanzada ya que en este estudio se realizó en 132 casos y 370 controles lo que representa respectivamente el 63.5% y 88.7% del cálculo inicial. El tamaño de muestra menor obtenido tiene como principal efecto disminuir el poder estadístico en los análisis de asociación. Sin embargo las variantes que alcanzaron un valor de asociación

significativo tienen un poder estadístico mayor a 0.80 y aquellas que no mostraron asociación tuvieron un poder estadístico muy bajo (0.05-0.43), el cual no se incrementaría de manera importante aún alcanzando el tamaño de muestra calculado originalmente.

La población Mexicana mestiza es genéticamente heterogénea, compuesta principalmente de ascendencia Amerindia y Europea (Martínez-Marignac, 2007), por lo que existía la posibilidad de tener estratificación en la población analizada y condicionar asociaciones espurias (Xu, 2009). Por lo anterior, se realizó un análisis de la estructura poblacional con un panel de 10 AIM's que se han utilizado con el mismo fin en poblaciones mestizas Mexicanas, sin encontrar subestructura genética en nuestra muestra. Lo anterior, le da fortaleza a nuestros resultados, ya que en otros estudios de asociación con LPHA en donde se conoce que la población es genéticamente heterogénea, como mestizos Brasileños (Bufalino, 2010) o Hispanos de ascendencia Mexicana en Texas (Blanton, 2010), así como en los dos únicos estudios previamente mencionados de asociación con LPHA en población Mexicana, no se realizó este análisis de la estructura poblacional. En la literatura, algunos autores sugieren analizar una mayor cantidad de AIM's para tener un mejor conocimiento de la estructura poblacional, sin embargo, el panel de 10 AIM's que seleccionamos contiene los marcadores que mejor distinguen la ascendencia Europea de la Amerindia en población Mexicana (Martnez-Marignac, 2007).

A diferencia de los dos únicos estudios realizados previamente en nuestro país de asociación de variables génicas con LPHA, en este trabajo se analizaron un mayor número de variantes genéticas, se investigó el antecedente de exposición a factores ambientales como el consumo de ácido fólico, tabaco y alcohol durante el embarazo mediante un cuestionario y se realizó un análisis de la estructura poblacional, con el cual se reduce el riesgo de tener resultados falsos por efecto de estratificación en la muestra, que es la principal fuente de sesgo en este tipo de estudios. En este trabajo confirmamos que el consumo de ácido fólico durante el embarazo disminuye el riesgo a presentar LPHA así como reportamos la asociación de dos variantes genéticas que confieren un menor riesgo a presentar

LPHA. Este reporte es el primero en México en el cual se analizan interacciones gen-gen y gen-ambiente con respecto al riesgo de presentar LPHA y describimos por primera vez en la literatura la interacción entre el consumo de ácido fólico y la región cromosómica 8q24, de la cual actualmente se desconoce su mecanismo de participación en la etiología del LPHA; las interacciones gen-gen identificadas en este trabajo apoyan una etiología multifactorial en la que participan diversos factores para la presencia del LPHA (Velázquez-Aragón, 2012). En un futuro esperamos ampliar el tamaño de muestra para corroborar los resultados de este trabajo así como para evaluar la asociación de regiones recientemente reportadas a LPHA mediante otras estrategias moleculares como escaneo amplio del genoma con el fin de contar con mayor información sobre los factores que subyacen en la etiología del LPHA en la población Mestiza Mexicana.

CONCLUSIONES

- En nuestro estudio, a pesar de que el antecedente de consumo de ácido fólico fue bajo entre las madres de los casos y controles, nuestros resultados concuerdan con reportes previos que indican que el consumo de ácido fólico periconcepcional disminuye el riesgo a presentar LPHA (OR 0.29, $p < 0.0001$).
- El alelo T de la variante rs1801133 (677C>T) del gen *MTHFR* fue más frecuente en casos que en controles, lo que confiere un riesgo disminuido a presentar LPHA (OR 0.64, $p = 0.022$), este hallazgo sólo se ha descrito en un estudio previo, por lo que debe corroborarse al aumentar el tamaño de la muestra.
- El alelo A de la variante rs2235371 (A/G) del gen *IRF6* mostró un riesgo disminuido a presentar LPHA, esta asociación fue estadísticamente significativa (OR 0.60, $p = 0.043$) acorde a lo previamente descrito en la literatura.
- El análisis de haplotipos reveló que el haplotipo con los alelos "G-G" formado por las variantes rs2235371 y rs2235375 en el gen *IRF6* mostró una asociación positiva con un mayor riesgo a presentar LPHA ($p = 0.02$), acorde a lo observado en la literatura.
- El análisis de interacción gen-ambiente reveló interacción entre la variante rs17241253 en la región 8q24 y el consumo de ácido fólico. Esta interacción no ha sido previamente analizada por lo que es la primera vez que se describe en la literatura.
- El análisis de interacción gen-gen identificó interacción entre las variantes rs17241253 y rs7843646 en 8q24 y la variante rs2235371 de *IRF6*, resultados que apoyan la interacción entre estos loci para la presencia de LPHA, ya que interacciones entre variantes localizadas en *IRF6* y 8q24 ya habían sido previamente descritas.
- Las interacciones identificadas en este trabajo apoyan la etiología multifactorial en la que participan diversos factores ambientales y genéticos en la etiología del LPHA.

- El análisis de la estructura poblacional no mostró subestructura dentro de la muestra analizada, lo que disminuye la posibilidad de asociaciones espurias por estratificación dentro de la muestra.

ANEXOS

ANEXO I

Cuestionario de exposición a factores ambientales

I. Datos Generales. 1. Nombre del Niño: _____

2. Nombre de la madre: _____

3. Sexo: 1.M 2.F

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:? 1. Si 2. No

7. Edad de la madre al nacimiento del caso índice: _____

8. Institución tratante: _____ 9. No. De expediente _____

10. ¿Trabajo 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 que 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. ¿Cuanto 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

Si 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 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 29)

27. ¿Qué tipo de bebida alcohólica ingirió? (Ejem. Cerveza, vino, tequila, otros?)

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

29. ¿Qué cantidad ingirió por ocasión? (Ejem. botellas, copa, otra?)

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

ANEXO II

Estudio De Asociación De Labio Paladar Hendido Con Polimorfismos De Genes Candidatos

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO Grupo Problema

México, D. F., a ___ de _____ de 20__

Por medio de la presente hago constar que estoy de acuerdo en que mi hijo(a) _____ participe en el proyecto “ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LABIO PALADAR HENDIDO CON POLIMORFISMOS DE GENES CANDIDATOS”, que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría. Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere responder un cuestionario, del cual la información será confidencial y una muestra de sangre periférica de 3mL, tomada por personal calificado con todos los requisitos de seguridad: equipo nuevo y guantes.

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

Así mismo, se me ha indicado que toda información derivada del análisis de la muestra para este estudio es absolutamente confidencial y que nuestra participación es completamente voluntaria, por lo que si no deseamos participar, ello no repercutirá en la atención de mi hijo (a).

Atentamente,

_____	_____	_____
Padre, Madre o tutor	Firma	Fecha

_____	_____	_____
Nombre Testigo	Dirección	Fecha y Firma

_____	_____	_____
Nombre Testigo	Dirección	Fecha y Firma

Obtuvo el consentimiento: _____

Nombre	Fecha
--------	-------

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

ANEXO III

Estudio De Asociación De Labio Paladar Hendido Con Polimorfismos De Genes Candidatos

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO Grupo de comparación

México, D. F., a ___ de _____ de 20__

Por medio de la presente hago constar que estoy de acuerdo en que mi hijo(a) _____ participe en el proyecto “ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LABIO PALADAR HENDIDO CON POLIMORFISMOS DE GENES CANDIDATOS”, que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría. Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere responder un cuestionario, del cual la información será confidencial y una muestra de raspado de mucosa oral, tomada por personal calificado con todos los requisitos de seguridad: equipo nuevo y guantes.

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

Así mismo, se me ha indicado que toda información derivada del análisis de la muestra para este estudio es absolutamente confidencial y que nuestra participación es completamente voluntaria, por lo que si no deseamos participar, ello no repercutirá en la atención de mi hijo (a).

Atentamente,

_____	_____	_____
Padre, Madre o tutor	Firma	Fecha

_____	_____	_____
Nombre Testigo	Dirección	Fecha y Firma

_____	_____	_____
Nombre Testigo	Dirección	Fecha y Firma

Obtuvo el consentimiento: _____

_____	_____
Nombre	Fecha

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

ANEXO IV

Estudio De Asociación 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 ASOCIACIÓN 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 consentimiento: _____

Nombre _____ Fecha Médico _____
responsable: Dra. Ariadna González del Ángel Depto. Genética, laboratorio de
Biología Molecular. Tel. 10840900 ext. 1306.

ANEXO V

Estudio De Asociación 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 ASOCIACIÓN 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 consentimiento: _____

Nombre	Fecha
--------	-------

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

ANEXO VI

Cálculo de muestra a partir de las frecuencias alélicas más bajas reportadas para rs34165410 reportadas en Lidral 1998 con el Programa Power for Association With Error versión 1.2.

El cálculo del tamaño de muestra se realizó asignando un valor de alfa para detectar asociaciones de 0.05. El poder estadístico que fue ingresado al programa fue 0.90. El modelo de error utilizado fue el de Gordon-Heat-Liu (no asume un sesgo en la genotipificación). Se ingresó una frecuencia alélica para el alelo menor de 0.016 para los casos y de 0.055 para los controles. Los resultados se presentan en el siguiente cuadro.

```
PAWE version 1.2, February 2003
Written by Derek Gordon
Assisted by Michael Nothnagel

MINIMUM SAMPLE SIZE FOR FIXED POWER

Sig. Level: 0.050000
Power: 0.900000

Noncentrality parameter, Allelic Test: 10.507417
Noncentrality parameter, Genotypic Test: 12.653934

DATA WITHOUT ERROR
Minimal Sample Size Cases for Allelic Test: 208
Minimal Sample Size Controls for Allelic Test: 417
Minimal Sample Size Cases for Genotypic Test: 251
Minimal Sample Size Controls for Genotypic Test: 502

DATA WITH ERROR
Minimal Sample Size Cases for Allelic Test: 262
Minimal Sample Size Controls for Allelic Test: 524
Minimal Sample Size Cases for Genotypic Test: 316
Minimal Sample Size Controls for Genotypic Test: 631

Percent sample size increase for Allelic Test, Error versus Errorless:
25.62
Percent sample size increase for Genotypic Test, Error versus Errorless:
25.76

PARAMETERS USED TO COMPUTE NONCENTRALITY PARAMETER

DATA WITHOUT ERRORS
Genotype frequencies: 11 12 22
Cases: 0.000 0.031 0.968
Controls: 0.003 0.104 0.893

Allele frequencies: 1 2
Cases: 0.016 0.984
Controls: 0.055 0.945

Matrix of Penetrances
```

True Genotype			Observed Genotype
11	12	22	
0.980	0.010	0.000	11
0.020	0.980	0.020	12
0.000	0.010	0.980	22

Gordon Heath Liu Ott (2001) error model chosen
epsilon1 set at: 0.010000
epsilon2 set at: 0.010000

DATA WITH ERRORS

Genotype frequencies:	11	12	22
Cases:	0.001	0.050	0.949
Controls:	0.004	0.120	0.876
Allele frequencies:	1	2	
Cases:	0.026	0.974	
Controls:	0.064	0.936	

Please cite the following two references when reporting results using PAWE:

Gordon D., Finch S.J., Nothnagel M., and Ott J. (2002) Power and sample size calculations for case-control genetic association tests when errors present: application to single nucleotide polymorphisms. *Human Heredity* 54:22-33

Gordon D., Levenstien M.A., Finch S.J., and Ott J. (2003) Errors and linkage disequilibrium interact multiplicatively when computing sample sizes for genetic case-control association studies. *Pacific Symposium on Biocomputing*:490-501

Citations for error models:

Gordon D., Heath S.C., Liu X., and Ott J. (2001) A transmission disequilibrium that allows for genotyping errors in the analysis of single-nucleotide polymorphism data. *American Journal of Human Genetics* 69:371-380

Douglas J.A., Skol A.D., and Boehnke M. (2002) Probability of detection of genotyping errors and mutations as inheritance inconsistencies in nuclear-family data. *American Journal of Human Genetics* 70:487-495

Sobel E., Papp J.C., and Lange K. (2002) Detection and integration of genotyping errors in statistical genetics. *American Journal of Human Genetics* 70:496-508

Mote V.L., and Anderson R.L. (1965) An investigation of the effect of misclassification on the properties of chisquare-tests in the analysis of categorical data. *Biometrika* 52:95-109

ANEXO VII

Parámetros utilizados y resultados del análisis de la estructura poblacional de la muestra con el programa STRUCTURE.

Parámetros:

Running Length

Length of Burnin Period: 100000

Number of MCMC Reps after Burnin: 100000

Ancestry Model Info

Use Admixture Model

* Infer Alpha

* Initial Value of ALPHA (Dirichlet Parameter for Degree of Admixture): 1.0

* Use Same Alpha for all Populations

* Use a Uniform Prior for Alpha

** Maximum Value for Alpha: 10.0

** SD of Proposal for Updating Alpha: 0.025

Frequency Model Info

Infer Lambda (Allele Frequencies Parameter)

* Use a Uniform Lambda for All Population

* Initial Value of Lambda: 1.0

Resultados:

Overall proportion of membership of the sample in each of the 2 clusters

Inferred Clusters

1 2

0.501 0.499

Allele-freq. divergence among pops (Net nucleotide distance),
computed using point estimates of P.

	1	2
1	-	0.0169
2	0.0169	-

Average distances (expected heterozygosity) between individuals in same cluster:
cluster 1 : 0.3938
cluster 2 : 0.4637

Estimated Ln Prob of Data = -5626.3
Mean value of ln likelihood = -5385.1
Variance of ln likelihood = 482.4
Mean value of alpha = 3.31

Mean value of lambda = 1.4526

Ancestry Barplot



Individuals

- Proportion of ancestry for population 1 (Europea)
- Proportion of ancestry for population 2 (Amerindia)

ANEXO VIII

Primers y condiciones de termociclado y restricción de las variantes analizadas por PCR-Restricción.

Variante	Primers 5'3'		Alineación	Tamaño de producto	Enzima de restricción	Productos esperados
	Forward	Reverse				
<i>MSX1</i> rs104893854	CCGAGAGGACCCCGTGGATGC	AGAGCCCCCGTTCTCTC TGGAACCTTCTCCTGGGTG	58°C	231pb	<i>Ddel</i>	194pb y 37pb
<i>TGFA</i> g.101537_101 540 delTAAT (<i>TaqI</i>)	TCACTTCCCCTTTTTCATCGTT	CGAGGAGGCTCTGAGGTG	7 ciclos 57°C 7 ciclos 56°C 21 ciclos 55°C	175pb	<i>Taq I</i>	123pb y 52pb
<i>TGFA BamHI</i>	TGCCTTCCAAGTCAGTCCTT	TAAATGGGGGCTTTTCATTG	55°C	402pb	<i>BamHI</i>	248pb y 154pb
<i>TGFA RsaI</i>	AGCCACCCCTTACAGGATCT	TCTGGGCTCTCAGACCACT	56°C	355pb	<i>RsaI</i>	197pb y 158pb
<i>IRF6</i> rs2235371	AGTGGCCTTCTGAATGCTG	CTTGACCTCCTCCAGACTAA	60°C	647pb	<i>DpnII</i>	235pb, 177pb, 87pb, 80pb, 35pb, 33pb.
<i>PVRL1</i> rs104894281	CCTTTTGGCCGGTGCATCTT	AAGGAGAGGAGGAGGGAGGA	62°C	441pb	<i>AvrII</i>	252pb y 189pb

Todas las reacciones de PCR se realizaron a 35 ciclos con un tiempo de alineación 40 segundos, una temperatura de desnaturalización de 94°C por un minuto y una temperatura de extensión de 72°C por un minuto.

Las reacciones de restricción se llevaron a cabo con 5UI de la enzima correspondiente por cada reacción bajo las condiciones establecidas por el fabricante y con una duración de 24 horas.

Los productos de restricción fueron resueltos en geles de agarosa al 2%.

Principio del análisis por reducción de la dimensionalidad multifactorial.

El MDR funciona a partir de atributos (o variables) los cuales pueden ser factores genéticos (un genotipo en específico para cada individuo) o factores ambientales (consumo de ácido fólico, consumo de tabaco o alcohol) a partir de los cuales genera modelos de predicción, es decir el clasificar a partir de las combinaciones de atributos de un individuo como caso o como control. Los mejores modelos finales se obtienen a partir de los valores de "Testing Accuracy" (TA) para cada modelo. El TA es una función del porcentaje de verdaderos positivos (VP), verdaderos negativos (VN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN) y se define como $(VP+VN)/(VP+VN+FP+FN)$. El MDR realiza de manera predeterminada una validación cruzada o "Cross Validation" (CV) de 10. Esto significa que los datos se dividen en 10 partes y el proceso de generación del modelo se repite diez veces para cada una de las partes de los datos y los diez valores de TA se promedian para estimar la habilidad predictiva del modelo. La consistencia de la CV es una estadística que registra el número de veces que MDR encuentra el mismo modelo como el mejor, de acuerdo al número de partes en los que divide los datos. Una consistencia CV de 9 o 10 se espera para un buen modelo con una CV de 10 (Moore, 2006). Para identificar la epistasis es necesario medir la entropía. La ganancia de información (GI) es un concepto que refleja la relación entre un atributo (variante genética o factor ambiental) y el estatus de una enfermedad (caso o control). En las gráficas de entropía si se observa una GI positiva, esto es evidencia de una relación sinérgica o epistasis. Una GI negativa indica redundancia o correlación, lo que puede ser explicado por DL (Cuartas, 2011). La aplicación computacional del MDR puede calcular un valor de Odds Ratio tomando como referencia a los individuos con la combinación de atributos que en el modelo generado sean considerados como de bajo riesgo para presentar el fenotipo.

RESEARCH LETTER

AMERICAN JOURNAL OF
medical genetics PART
AAssociation of Interactions Among the *IRF6* Gene, the 8q24 Region, and Maternal Folic Acid Intake With Non-Syndromic Cleft Lip/Palate in Mexican MestizosJosé A. Velázquez-Aragón,¹ Miguel A. Alcántara-Ortigoza,¹ Bernardette Estandia-Ortega,¹ Miriam E. Reyna-Fabián,¹ Carlos Cruz-Fuentes,² Sandra Villagómez,³ and Ariadna González-del Angel^{1*}¹Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, Avenida Insurgentes Sur 3700-C, Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán, Distrito Federal, Mexico²Departamento de Genética, Subdirección de Investigaciones Clínicas, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, Calzada México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, Distrito Federal, Mexico³Unidad de Apoyo a la Investigación Clínica, Subdirección de Investigación Médica, Instituto Nacional de Pediatría, Avenida Insurgentes Sur 3700-C, Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán, Distrito Federal, Mexico

Manuscript Received: 12 March 2012; Manuscript Accepted: 5 August 2012

TO THE EDITOR:

Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (NS CL/P) is a common craniofacial birth defect, affecting approximately 1 of 1,000 live births worldwide. Among the genes associated with this condition are *IRF6*, *MSX1*, *TGFA*, *TGFB3*, and *PVRL1*, although only the association of *IRF6* has been consistently reported [Dixon et al., 2011]. Recently, a strong genetic association was reported of a 640-kb region of 8q24 to NS CL/P [Birnbaum et al., 2009]. To date, there has been little information about the environmental and genetic factors associated with NS CL/P in Mexican Mestizo populations. Accordingly, we performed a case control study analyzing the association of 17 variants of five candidate genes (*IRF6*, *MSX1*, *TGFA*, *TGFB3*, and *PVRL1*) and the chromosome 8q24 region, with NS CL/P, using both single variant and haplotype association analyses. We also analyzed the effects of interactions among all genetic variants and maternal folic acid intake on the risk of NS CL/P.

We included 132 children with NS CL/P and 370 unaffected controls in a Mestizo population from Mexico City examined at the National Institute of Pediatrics (INP). Patients were evaluated by a medical geneticist (BEA, AGA) to exclude those with clinical data suggesting a syndromic form of CL/P. Control samples were obtained from children in a follow up of vaccine protocols and described as healthy by a pediatrician (SV). The mother of each child completed a brief medical form that included questions on family history and folic acid supplementation during pregnancy (Table I). The study was approved by the Research and Ethics Committee of the INP, and parents provided written informed consent.

Gene polymorphisms analyzed were rs11466297, RsaI, g.101537-101540delTAAT (*TGFA*), rs3917168 (*TGFB3*), rs104893854, rs12532, rs34165410 (*MSX1*), rs7940667, rs104894281 (*PVRL1*),

How to Cite this Article:

Velázquez-Aragón JA, Alcántara-Ortigoza MA, Estandia-Ortega B, Reyna-Fabian ME, Cruz-Fuentes C, Villagómez S, González-del Angel A. 2012. Association of interactions among the *IRF6* gene, the 8q24 region and maternal folic acid intake with non-syndromic cleft lip/palate in Mexican Mestizos.

Am J Med Genet Part A 158A:3207–3210.

rs2235371 and rs2235375 (*IRF6*), all of which were selected on the basis of previously reported associations with NS CL/P. Of the six SNPs on chromosome 8q24, rs987525 and rs17241253 showed the highest associations with NS CL/P in a German population; the others were selected based on their reported minor allele frequency (MAF) >0.1 for the Mexican population and by their locations, which covered at least 337 kb of the 640 kb region (Table II). A stratification analysis was performed to avoid spurious associations. A panel of ten ancestry informative markers (AIMs; rs223830, rs203096, rs722098, rs17203, rs3340, rs2862, rs4884, rs1800498, rs2695, and rs723822) was genotyped in 127 cases and 314 controls.

*Correspondence to:

Ariadna González-del Angel, Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, Avenida Insurgentes Sur 3700-C, Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán, Ciudad de México, C.P. 04530, Distrito Federal, México. E-mail: agonzalezdelangel@yahoo.com.mx

Article first published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 20 November 2012

DOI 10.1002/ajmg.a.35641

TABLE I. Clinical Data of Cases and Controls

	Controls n = 370	Cases n = 132
Mean age (years)	1.27	5.5
Gender	51% male 49% female	68% male 32% female
Periconceptional folic acid intake ^a	13%	1.5%
Preconceptional folic acid intake ^b	1%	0%
Postconceptional folic acid intake ^c	59.3%	45.8%
Overall maternal folic acid consumption	73.3%	47.3%
Familial history of NS CL/P (first and second degree)	1%	16%
Defect laterality		44% left defect 24% right defect 31% bilateral defect

^aMaternal continuous ingestion of the supplement, starting 3 months before and extending after conception.
^bMaternal continuous ingestion of the supplement, starting 3 months before conception and stopped when pregnancy was declared.
^cMaternal ingestion of the supplement when pregnancy was declared within the first 3 months after conception.

These markers primarily distinguish Amerindian from European ancestry ($\delta > 0.44$) in Mexican populations. STRUCTURE software was used to test stratification within samples. An admixture model was used with the following parameters: a 1,000,000 burn-in period, 1,000,000 repetitions, and $K = 2$. Values of $\alpha > 1$ indicate that most individuals are admixed.

Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was tested using Fisher's exact test for all markers and AIMS. Two-tailed Armitage trend tests

were performed to determine associations of markers to NS CL/P. Odds ratios (OR) and P -values for all variants were calculated using DeFinetti software (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>), with Bonferroni correction applied to significant P -values. Haplotype analysis was performed for variants located in the same gene and in linkage disequilibrium (LD; $D' > 60$) using Haploview software with a 100,000-fold permutation test and a positive haplotype association of $P < 0.05$.

Gene-environment and gene-gene interactions were analyzed by binary logistic regression with all possible combinations of two variables (folic acid consumption and all genetic variants), both in dominant and recessive models (SPSS Version 17.0, Chicago, IL). Variables with positive interactions ($P < 0.05$) were used to generate models of two or three loci or attributes to be analyzed by the MDR method, version 2.0 β -8.4 (<http://www.epistasis.org/>), using default parameters with a ten-fold cross-validation in an exhaustive search. Final best models were obtained with the highest balanced testing accuracy (TA) and their statistical significance was calculated with a 10,000-fold permutation test.

Minor alleles for the variants rs104893854 in *MSX1*, rs104894281 in *PVRL1*, and rs3917168 in *TGFB3* were absent from all cases and controls and were therefore excluded. Moreover, all variants were in HWE, except for rs1466297 ($P < 0.05$ in cases and controls) in *TGFA*, which was therefore excluded. Stratification analysis resulted in an α -value of 3.31, suggesting no genetic internal structure, which decreases the possibility of spurious association due to stratification of the sample.

Armitage trend tests showed that the only statistically significant result was for the variant rs2235371 (p.Val274Ile) in *IRF6* (OR = 0.60, $P = 0.043$ after Bonferroni correction; Table II), with controls more likely to have the A allele, which encodes isoleucine. Haplotype analysis revealed an association of the "G-G" haplotype formed by variants rs2235371 and rs2235375

TABLE II. Single Genetic Variant Association Analysis

Variant	Reference	Alleles major/minor	Genotype controls ^a n = 370	MAF ^b controls	Genotype cases ^a n = 132	MAF ^b cases	OR, P-Armitage trend test	Post-hoc ^c statistical power
<i>IRF6</i> rs2235371	Zucchero et al. [2004]	G/A	163/162/45	0.34	75/50/7	0.24	OR 0.60, $P = 0.043$	0.85
<i>IRF6</i> rs2235375	Scapoli et al. [2005]	C/G	141/165/64	0.40	36/71/25	0.46	OR 1.26, $P = 0.08$	0.40
<i>TGFA</i> RsaI	Holder et al. [1992]	CG/TT	313/52/5	0.08	113/19/0	0.07	OR 0.91, $P = 0.55$	0.08
<i>TGFA</i> g.101537_101540 delTAAT [TaqI]	Ardinger et al. [1989]	TAAT/delTAAT	365/5/0	0.01	129/3/0	0.01	OR 1.7, $P = 0.46$	0.05
<i>MSX1</i> rs34165410	Lidral et al. [1998]	C/T	274/28/0	0.04	116/9/1	0.04	OR 1.22, $P = 0.86$	0.05
<i>MSX1</i> rs12532	Park et al. [2007]	G/A	66/166/138	0.40	15/60/57	0.34	OR 1.31, $P = 0.08$	0.40
<i>PVRL1</i> rs7940667	Avila et al. [2006]	C/A	358/12/0	0.02	126/6/0	0.02	OR 0.65, $P = 0.48$	0.05
8q24 rs987525	Birbaum et al. [2009]	C/A	267/91/12	0.16	89/42/1	0.17	OR 1.07, $P = 0.67$	0.07
8q24 rs17241253	Birbaum et al. [2009]	T/C	330/40/0	0.05	112/19/1	0.08	OR 0.63, $P = 0.13$	0.43
8q24 rs10956463	Selected by position	A/C	221/124/25	0.24	69/53/10	0.28	OR 1.20, $P = 0.19$	0.25
8q24 rs759944	Selected by position	A/G	115/169/86	0.46	45/59/28	0.44	OR 1.10, $P = 0.49$	0.09
8q24 rs16903635	Selected by position	T/G	259/96/15	0.17	90/41/1	0.16	OR 1.26, $P = 0.78$	0.07
8q24 rs7843646	Selected by position	T/G	152/166/52	0.36	50/65/17	0.38	OR 0.98, $P = 0.77$	0.09

^aHomozygous major allele/heterozygous/homozygous minor allele.
^bMinor allele frequency.
^cFixed significance of 0.05 was assumed for all variants.

in the *IRF6* gene with an increased risk of NS CL/P after permutation analysis ($P=0.02$). For haplotypes formed in *MSX1* and in the 8q24 region, no significant association was observed.

Logistic regression analysis showed a significant interaction between positive maternal folic acid consumption (pre-, peri- and post-conception) and the SNP rs17241253 on chromosome 8q24 under a recessive model. Cases with the CC genotype with mothers who did not take folic acid were at significantly increased risk of NS CL/P [OR = 4.5, 95% confidence interval (CI) = 1.34–15.15, $P=0.015$]. In the variant-versus-variant analysis, the rs2235375 SNP in *IRF6* was found to significantly interact with the 8q24 variants rs17241253 (OR = 4.5, 95% CI = 1.13–17.86, $P=0.032$) and rs16903635 (OR = 4.15, 95% CI = 1.32–12.14, $P=0.015$) using a recessive model. Moreover, the 8q24 SNPs rs17241253 and rs784364, which were not in LD, showed a significant positive interaction under a recessive model (OR = 3.54, 95% CI = 1.06–11.80 $P=0.039$).

On the basis of these results, we performed a MDR analysis with models of two or three attributes on SNPs in *IRF6* and the 8q24 region and folic acid consumption. Significant interactions were observed between folic acid consumption and the 8q24 variant rs17241253 (OR = 4.12, relative to the low-risk group; TA, 0.6590; cross validation consistency, 10/10; $P<0.0001$), and between rs2235371 in *IRF6* and the 8q24 variants rs7843646 and rs17241453 (OR = 3.01; TA, 0.6136; cross validation consistency, 10/10; $P<0.0006$).

Herein, we report on a significant association between the rs2235371 variant in the *IRF6* gene and NS CL/P, a finding that is in agreement with the strong statistical association ($P<10^{-9}$) observed in a multi-ethnic cohort of 1,968 families with NS CL/P [Zucchero et al., 2004]. In addition, the G allele of the rs2235371 variant (p.Val274Ile) has been associated with NS CL/P in a sample of Asian and Caucasian individuals with a P -value of 1×10^{-11} . Moreover, this allele is in strong LD with the A allele of the rs642961. Because the latter seems to disrupt an AP-2 α binding site in the *IRF6* enhancer, gene transcription from this allele may be diminished, providing a putative functional mechanism for the allelic association between rs2235371 and NS CL/P [Rahimov et al., 2008]. Unfortunately, we did not consider this functional variant in our study.

The G-G haplotype of *IRF6* SNPs rs2235371 and rs2235375 was significantly associated with NS CL/P ($P=0.02$), as previously reported in a Western Chinese population [Huang et al., 2009]. These findings indicate that both variants are in the same LD block that may include another functional variant(s) responsible for NS CL/P risk, as described for rs642961. No significant associations were identified between any of the six SNPs in the 8q24 region and NS CL/P. Similar negative results were obtained in a study analyzing ten SNPs in 8q24 (including rs987525 and rs17241253) in 37 multiplex NS CL/P families and 91 parent-child trios of Mexican ancestry in Texas, USA [Blanton et al., 2010]. However, a significant association was found for rs987525 in a Mexican-Mayan population, but only for the homozygous minor allele [Rojas-Martinez et al., 2010]. In our study the recessive model for rs987525 showed a P -value of 0.15. Statistical power obtained for variants in 8q24, as well as for other non-associated variants, was poor (0.05–0.43)

owing to the small sample size, which could explain the lack of association in our study.

This is the third report to explore genetic associations with NS CL/P in Mexican populations. In a Mayan population [Rojas-Martinez et al., 2010], an association was reported between the rs861020 variant in *IRF6* with NS CL/P (OR = 2.39, 95%CI = 1.13–5.06), similar to our finding of an association with rs2235371. However, this study did not perform a population ancestry analysis or analyze gene-gene or gene-environment interactions.

To our knowledge, this is the first report of an interaction of folic acid consumption with an 8q24 variant. Other gene-environment interactions previously reported include maternal multivitamin consumption and the AG genotype of rs17015218 in *IRF6* (not included in our study), which was associated with a reduced risk of NS CL/P (OR = 0.13, 95% CI = 0.02–0.99) [Wu et al., 2010]. We found that the 8q24 SNPs rs17241253 and rs7843646 interacted with the *IRF6* SNP rs2235371. Using a generalized estimating equations method, a previous study identified a similar gene-gene interaction between the 8q24 region and *IRF6* in 317 white non-Hispanic families from Texas, USA [Blanton et al., 2010]. In that study, the interacting markers were the 8q24 variants rs987525, rs17241253, and rs1530300, and the rs642961 variant in the *IRF6* enhancer. Thus, the identification of statistically significant interactions between 8q24 and maternal folic acid intake and between 8q24 and *IRF6* provides further support for the interrelationships of these loci with folate intake, which is related to the multifactorial etiology of NS CL/P.

Recent genetic studies, mainly genome-wide association studies, have identified a number of novel NS CL/P susceptibility factors, such as *FOXE1*, 17q22 and 10q25.3 and two regions, one near *MAFB* (1p22) and the other near *ABCA4* (20q12). Unfortunately, we did not include markers close to these regions. Future studies that include these loci may help to identify as-yet-unknown genetic factors and confirm those previously reported to be associated with NS CL/P in the Mexican Mestizo population.

ACKNOWLEDGMENTS

José Velázquez-Aragón offers thanks to Posgrado en Ciencias Biológicas-UNAM and to the scholarship provided by CONACYT (161000). This work was supported by Research Funding from the INP and by a grant provided by CONACYT (FOSSIS S0008-2009-01, 113126).

REFERENCES

- Ardinger HH, Buettow KH, Bell GI, Bardach J, VanDemark DR, Murray JC. 1989. Association of genetic variation of the transforming growth factor- α gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 45:348–353.
- Avila JR, Jezewski PA, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Christensen K, Daack-Hirsch S, Romitti PA, Murray JC. 2006. PVRL1 variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations. *Am J Med Genet Part A* 140A:2562–2570.
- Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, Steffens M, Rubini M, Baluado C, Ferrian M, Almeida de Assis N, Alblas MA, Barth S, Freudenberg J, Lauster C, Schmidt G, Scheer M, Braumann B, Berge SJ, Reich RH, Schiefke F, Hemprich A, Potzsch S, Steegers-Theunissen

- RP, Potsch B, Moebus S, Horsthemke B, Kramer FJ, Wienker TF, Mossey PA, Propping P, Cichon S, Hoffmann P, Knapp M, Nothen MM, Mangold E. 2009. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet* 41:473–477.
- Blanton SH, Burt A, Stal S, Mulliken JB, Garcia E, Hecht JT. 2010. Family-based study shows heterogeneity of a susceptibility locus on chromosome 8q24 for nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88:256–259.
- Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. 2011. Cleft lip and palate: Understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet* 12:167–178.
- Holder SE, Vintiner GM, Farren B, Malcolm S, Winter RM. 1992. Confirmation of an association between RFLPs at the transforming growth factor- α locus and nonsyndromic cleft lip and palate. *J Med Genet* 29:390–392.
- Huang Y, Wu J, Ma J, Beaty TH, Sull JW, Zhu L, Lu D, Wang Y, Meng T, Shi B. 2009. Association between IRF6 SNPs and oral clefts in West China. *J Dent Res* 88:715–718.
- Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S, Semina EV, Johnson LR, Machida J, Burds A, Parnell TJ, Rubenstein JL, Murray JC. 1998. Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. *Am J Hum Genet* 63:557–568.
- Park J, Park BY, Kim HS, Lee JE, Suh I, Nam CM, Kang DR, Kim S, Yun JE, Go EN, Jee SH, Beaty TH. 2007. MSX1 polymorphism associated with risk of oral cleft in Korea: Evidence from case-parent trio and case-control studies. *Yonsei Med J* 48:101–108.
- Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M, Domann FE, Govil M, Christensen K, Bille C, Melbye M, Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Fitzpatrick DR, Green ED, Mossey PA, Little J, Steegers-Theunissen RP, Pennacchio LA, Schutte BC, Murray JC. 2008. Disruption of an AP-2 α binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet* 40:1341–1347.
- Rojas-Martinez A, Reutter H, Chacon-Camacho O, Leon-Cachon RB, Munoz-Jimenez SG, Nowak S, Becker J, Herberz R, Ludwig KU, Paredes-Zenteno M, Arizpe-Cantu A, Raeder S, Herms S, Ortiz-Lopez R, Knapp M, Hoffmann P, Nothen MM, Mangold E. 2010. Genetic risk factors for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Mesoamerican population: Evidence for IRF6 and variants at 8q24 and 10q25. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88:535–537.
- Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci P, Tognon M, Carinci F. 2005. Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the IRF6 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population. *Am J Hum Genet* 76:180–183.
- Wu T, Liang KY, Hetmanski JB, Ruczinski I, Fallin MD, Ingersoll RG, Wang H, Huang S, Ye X, Wu-Chou YH, Chen PK, Jabs EW, Shi B, Redett R, Scott AF, Beaty TH. 2010. Evidence of gene-environment interaction for the IRF6 gene and maternal multivitamin supplementation in controlling the risk of cleft lip with/without cleft palate. *Hum Genet* 128:401–410.
- Zucchero TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, Caprau D, Christensen K, Suzuki Y, Machida J, Natsume N, Yoshiura K, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Moreno L, Arcos-Burgos M, Lidral AC, Field LL, Liu YE, Ray A, Goldstein TH, Schultz RE, Shi M, Johnson MK, Kondo S, Schutte BC, Marazita ML, Murray JC. 2004. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *N Engl J Med* 351:769–780.

BIBLIOGRAFÍA

- Ali A, Singh SK, 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: 355-60.
- Andoloro VJ, Monaghan DT, Rosenquist TH (1998) Dextromethorphan and other N-methyl-D-aspartate receptor antagonists are teratogenic in the avian embryo model. *Pediatr Res* 43: 1-7.
- Ardingner HH, Buetow KH, Bell GI, Bardach J, VanDemark DR, Murray JC (1989) Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 45: 348-53.
- Avila JR, Jezewski PA, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Christensen K, Daack-Hirsch S, Romitti PA, Murray JC (2006) PVRL1 variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations. *Am J Med Genet A* 140: 2562-70.
- Badovinac RL, Werler MM, Williams PL, Kelsey KT, Hayes C (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.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263-5.
- Basart AM, Qian JF, May E, Murray JC (1994) A PCR method for detecting polymorphism in the TGFA gene. *Hum Mol Genet* 3: 678.
- Beaty TH, Hetmanski JB, Zeiger JS, Fan YT, Liang KY, VanderKolk CA, McIntosh I (2002) Testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design. *Genet Epidemiol* 22: 1-11.
- Beaty TH, Murray JC, Marazita ML, Munger RG, Ruczinski I, Hetmanski JB, Liang KY, Wu T, Murray T, Fallin MD, Redett RA, Raymond G, Schwender H, Jin SC, Cooper ME, Dunwald M, Mansilla MA, Leslie E, Bullard S, Lidral AC, Moreno LM, Menezes R, Vieira AR, Petrin A, Wilcox AJ, Lie RT, Jabs EW, Wu-Chou YH, Chen PK, Wang H, Ye X, Huang S, Yeow V, Chong SS, Jee SH, Shi B, Christensen K, Melbye M, Doheny KF, Pugh EW, Ling H, Castilla EE, Czeizel AE, Ma L, Field LL, Brody L, Pangilinan F, Mills JL, Molloy AM, Kirke PN, Scott JM, Arcos-Burgos M, Scott AF (2010) A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet* 42: 525-9.
- Ben J, Jabs EW, Chong SS (2005) Genomic, cDNA and embryonic expression analysis of zebrafish IRF6, the gene mutated in the human oral clefting disorders Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Gene Expr Patterns* 5: 629-38.

- Berkowitz S, Duncan R, Evans C, Friede H, Kuijpers-Jagtman AM, Prah-Anderson B, Rosenstein S (2005) Timing of cleft palate closure should be based on the ratio of the area of the cleft to that of the palatal segments and not on age alone. *Plast Reconstr Surg* 115: 1483-99
- Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, de Assis NA, Diaz-Lacava A, Barth S, Lauster C, Schmidt G, Scheer M, Saffar M, Martini M, Reich RH, Schiefke F, Hemprich A, Potzsch S, Potzsch B, Wienker TF, Hoffmann P, Knapp M, Kramer FJ, Nothen MM, Mangold E (2009) IRF6 gene variants in Central European patients with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Oral Sci* 117: 766-9.
- Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, Steffens M, Rubini M, Baluardo C, Ferrian M, Almeida de Assis N, Alblas MA, Barth S, Freudenberg J, Lauster C, Schmidt G, Scheer M, Braumann B, Berge SJ, Reich RH, Schiefke F, Hemprich A, Potzsch S, Steegers-Theunissen RP, Potzsch B, Moebus S, Horsthemke B, Kramer FJ, Wienker TF, Mossey PA, Propping P, Cichon S, Hoffmann P, Knapp M, Nothen MM, Mangold E (2009) Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet* 41: 473-7.
- Blanco-Davila F (2003) Incidence of cleft lip and palate in the northeast of Mexico: a 10-year study. *J Craniofac Surg* 14: 533-7.
- Blanton SH, Burt A, Stal S, Mulliken JB, Garcia E, Hecht JT (2010) Family-based study shows heterogeneity of a susceptibility locus on chromosome 8q24 for nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88: 256-9.
- Boyles AL, Wilcox AJ, Taylor JA, Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM, Drevon CA, Vollset SE, Lie RT (2008) Folate and one-carbon metabolism gene polymorphisms and their associations with oral facial clefts. *Am J Med Genet A* 146A: 440-9.
- Brandalize AP, Bandinelli E, Borba JB, Felix TM, Roisenberg I, Schuler-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: 787-91.
- Brewer C, Holloway S, Zawalnyski P, Schinzel A, FitzPatrick D (1998) A chromosomal deletion map of human malformations. *Am J Hum Genet* 63: 1153-9.
- Briggs RM (1976) Vitamin supplementation as a possible factor in the incidence of cleft lip/palate deformities in humans. *Clin Plast Surg* 3: 647-52.
- Brown NL, Knott L, Halligan E, Yarram SJ, Mansell JP, Sandy JR (2003) Microarray analysis of murine palatogenesis: temporal expression of genes during normal palate development. *Dev Growth Differ* 45: 153-65.
- Bufalino A, Ribeiro Paranaíba LM, Nascimento de Aquino S, Martelli-Junior H, Oliveira Swerts MS, Coletta RD (2010) Maternal polymorphisms in folic acid metabolic genes are

associated with nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88: 980-6.

- Canun-Serrano S, Reyes-Pablo AE, Sanchez-Sanchez M, Jaime-Gomez L, Centeno-Morones Fde J, Falcon-Bernal I, Legorreta-Garcia MC, Valdes-Hernandez J (2009) [Periconceptional use of folic acid in health centers from the territorial sanitary jurisdiction of Tlalpan, Mexico City]. *Gac Med Mex* 145: 115-20.
- Carter TC, Molloy AM, Pangilinan F, Troendle JF, Kirke PN, Conley MR, Orr DJ, Earley M, McKiernan E, Lynn EC, Doyle A, Scott JM, Brody LC, Mills JL (2010) Testing reported associations of genetic risk factors for oral clefts in a large Irish study population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88: 84-93.
- Castilla EE, Lopez-Camelo JS, Campana H (1999) Altitude as a risk factor for congenital anomalies. *Am J Med Genet* 86: 9-14.
- Chenevix-Trench G, Jones K, Green AC, Duffy DL, Martin NG (1992) Cleft lip with or without cleft palate: associations with transforming growth factor alpha and retinoic acid receptor loci. *Am J Hum Genet* 51: 1377-85.
- Chevrier C, Perret C, Bahuau M, Zhu H, Nelva A, Herman C, Francannet C, Robert-Gnansia E, Finnell RH, Cordier S (2007) Fetal and maternal MTHFR C677T genotype, maternal folate intake and the risk of nonsyndromic oral clefts. *Am J Med Genet A* 143: 248-57.
- Ching GH, Chung CS (1974) A genetic study of cleft lip and palate in Hawaii. I. Interracial crosses. *Am J Hum Genet* 26: 162-76.
- Christensen K, Holm NV, Olsen J, Kock K, Fogh-Andersen P (1992) Selection bias in genetic-epidemiological studies of cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 51: 654-9.
- Clark JD, Mossey PA, Sharp L, Little J (2003) Socioeconomic status and orofacial clefts in Scotland, 1989 to 1998. *Cleft Palate Craniofac J* 40: 481-5.
- Cobourne MT (2004) The complex genetics of cleft lip and palate. *Eur J Orthod* 26: 7-16.
- Croen LA, Shaw GM, Wasserman CR, Tolarova MM (1998) Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California, 1983-1992. *Am J Med Genet* 79: 42-7.
- Cuartas Arias JM, Palacio Acosta CA, Valencia JG, Montoya GJ, Arango Viana JC, Nieto OC, Florez AF, Camarena Medellin BE, Montoya WR, Lopez Jaramillo CA, Achury JG, Fuentes CC, Berrio GB, Ruiz-Linares A (2011) Exploring epistasis in candidate genes for antisocial personality disorder. *Psychiatr Genet* 21: 115-24.
- Davalos-Rodriguez IP, Ramirez-Lizardo EJ, Mena JP, Ledezma-Rodriguez V, Omayra-Davalos N, Gonzalez-Mercado MG, Duran-Gonzalez J, Moran-Moguel MC, Peralta-Leal V, Salazar-Paramo M, Ledezma-Gomez V (2009) [Non-syndromic cleft lip/cleft palate and C677T methylene-tetrahydrofolate reductase variant in Mexican children]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 47: 549-52.

- Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC (2011) Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet* 12: 167-78.
- Ehlers Bertoja A, Sampaio Alho C, De França E, Menegotto B, Miriam Robinson W (2008) TGFA/TAQ I polymorphism in nonsyndromic cleft lip and palate patients from Rio Grande Do Sul, Brazil. *Cleft Palate Craniofac J*. 5:539-44.
- Endriga MC, Kapp-Simon KA (1999) Psychological issues in craniofacial care: state of the art. *Cleft Palate Craniofac J* 36: 3-11.
- Fallin MD, Hetmanski JB, Park J, Scott AF, Ingersoll R, Fuernkranz HA, McIntosh I, Beaty TH (2003) Family-based analysis of MSX1 haplotypes for association with oral clefts. *Genet Epidemiol* 25: 168-75.
- Fraser FC (1970) The genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Hum Genet* 22: 336-52.
- Gaspar DA, Mاتيoli SR, de Cassia Pavanello R, Araujo BC, Alonso N, Wyszynski D, Passos-Bueno MR (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: 521-6.
- Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R (1998) Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 9: 652-6.
- Grant SF, Wang K, Zhang H, Glaberson W, Annaiah K, Kim CE, Bradfield JP, Glessner JT, Thomas KA, Garris M, Frackelton EC, Otieno FG, Chiavacci RM, Nah HD, Kirschner RE, Hakonarson H (2009) A genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24. *J Pediatr* 155: 909-13.
- Greene RM, Pisano MM (2004) Perspectives on growth factors and orofacial development. *Curr Pharm Des* 10: 2701-17.
- Grunert RR, Braune A, Schnackenberg E, Schloot W, Krause HR (2002) [Genetic differences in enzymes of folic acid metabolism in patients with lip-jaw-palate clefts and their relatives]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 6: 131-3.
- Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP, Namour F, Chabi NW, Sanni A, Anello G, Bosco P, Romano C, Amouzou E, Arrieta HR, Sanchez BE, Romano A, Herbeth B, Guiland JC, Mutchinick OM (2006) Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 83: 701-7.
- Hashmi SS, Waller DK, Langlois P, Canfield M, Hecht JT (2005) Prevalence of nonsyndromic oral clefts in Texas: 1995-1999. *Am J Med Genet A* 134: 368-72.

- Holder SE, Vintiner GM, Farren B, Malcolm S, Winter RM (1992) Confirmation of an association between RFLPs at the transforming growth factor-alpha locus and non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet* 29: 390-2.
- Honda T, Shimizu K, Kawakatsu T, Yasumi M, Shingai T, Fukuhara A, Ozaki-Kuroda K, Irie K, Nakanishi H, Takai Y (2003) Antagonistic and agonistic effects of an extracellular fragment of nectin on formation of E-cadherin-based cell-cell adhesion. *Genes Cells* 8: 51-63.
- Huang Y, Wu J, Ma J, Beaty TH, Sull JW, Zhu L, Lu D, Wang Y, Meng T, Shi B (2009) Association between IRF6 SNPs and oral clefts in West China. *J Dent Res* 88: 715-8.
- Hwang SJ, Beaty TH, Panny SR, Street NA, Joseph JM, Gordon S, McIntosh I, Francomano CA (1995) Association study of transforming growth factor alpha (TGF alpha) TaqI polymorphism and oral clefts: indication of gene-environment interaction in a population-based sample of infants with birth defects. *Am J Epidemiol* 141: 629-36.
- Ichikawa E, Watanabe A, Nakano Y, Akita S, Hirano A, Kinoshita A, Kondo S, Kishino T, Uchiyama T, Niikawa N, Yoshiura K (2006) PAX9 and TGFB3 are linked to susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Japanese: population-based and family-based candidate gene analyses. *J Hum Genet* 51: 38-46.
- Ingraham CR, Kinoshita A, Kondo S, Yang B, Sajan S, Trout KJ, Malik MI, Dunnwald M, Goudy SL, Lovett M, Murray JC, Schutte BC (2006) Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (*Irf6*). *Nat Genet* 38: 1335-40.
- Itikala PR, Watkins ML, Mulinare J, Moore CA, Liu Y (2001) Maternal multivitamin use and orofacial clefts in offspring. *Teratology* 63: 79-86.
- Jagomagi T, Nikopensius T, Krjutskov K, Tammekivi V, Viltrop T, Saag M, Metspalu A (2010) MTHFR and MSX1 contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. *Eur J Oral Sci* 118: 213-20.
- Jara L, Blanco R, Chiffelle I, Palomino H, Carreno H (1995) Evidence for an association between RFLPs at the transforming growth factor alpha (locus) and nonsyndromic cleft lip/palate in a South American population. *Am J Hum Genet* 56: 339-41.
- Jehee FS, Burin BA, Rocha KM, Zechi-Ceide R, Bueno DF, Brito L, Souza J, Leal GF, Richieri-Costa A, Alonso N, Otto PA, Passos-Bueno MR (2009) Novel mutations in IRF6 in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: when should IRF6 mutational screening be done? *Am J Med Genet A* 149A: 1319-22.
- Jensen BL, Kreiborg S, Dahl E, Fogh-Andersen P (1988) Cleft lip and palate in Denmark, 1976-1981: epidemiology, variability, and early somatic development. *Cleft Palate J* 25: 258-69.

- Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE, Daack-Hirsch S, Schultz RE, Weber A, Nepomucena B, Romitti PA, Christensen K, Orioli IM, Castilla EE, Machida J, Natsume N, Murray JC (2003) Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet* 40: 399-407.
- Jimenez-Morales S, Velazquez-Cruz R, Ramirez-Bello J, Bonilla-Gonzalez E, Romero-Hidalgo S, Escamilla-Guerrero G, Cuevas F, Espinosa-Rosales F, Martinez-Aguilar NE, Gomez-Vera J, Baca V, Orozco L (2009) Tumor necrosis factor-alpha is a common genetic risk factor for asthma, juvenile rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus in a Mexican pediatric population. *Hum Immunol* 70: 251-6. doi: S0198-8859(09)00039-1 [pii]
- Jugessur A, Farlie PG, Kilpatrick N (2009) The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Dis* 15: 437-53.
- Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC, Taylor JA, Saugstad OD, Vindenes HA, Abyholm FE (2003) Cleft palate, transforming growth factor alpha gene variants, and maternal exposures: assessing gene-environment interactions in case-parent triads. *Genet Epidemiol* 25: 367-74.
- Jugessur A, Murray JC (2005) Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev* 15: 270-8.
- Jugessur A, Rahimov F, Lie RT, Wilcox AJ, Gjessing HK, Nilsen RM, Nguyen TT, Murray JC (2008) Genetic variants in IRF6 and the risk of facial clefts: single-marker and haplotype-based analyses in a population-based case-control study of facial clefts in Norway. *Genet Epidemiol* 32: 413-24.
- Juriloff DM, Harris MJ (2008) Mouse genetic models of cleft lip with or without cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 82: 63-77.
- Kim MH, Kim HJ, Choi JY, Nahm DS (2003) Transforming growth factor-beta3 gene SfaN1 polymorphism in Korean nonsyndromic cleft lip and palate patients. *J Biochem Mol Biol* 36: 533-7.
- Kirschner RE, LaRossa D (2000) Cleft lip and palate. *Otolaryngol Clin North Am* 33: 1191-215.
- Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, Watanabe Y, Howard E, de Lima RL, Daack-Hirsch S, Sander A, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Lammer EJ, Aylsworth AS, Ardinger HH, Lidral AC, Pober BR, Moreno L, Arcos-Burgos M, Valencia C, Houdayer C, Bahuau M, Moretti-Ferreira D, Richieri-Costa A, Dixon MJ, Murray JC (2002) Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet* 32: 285-9.
- Lace B, Vasiljeva I, Dundure I, Barkane B, Akota I, Krumin A (2006) Mutation analysis of the MSX1 gene exons and intron in patients with nonsyndromic cleft lip and palate. *Stomatologija* 8: 21-4.

- Leck I, Lancashire RJ (1995) Birth prevalence of malformations in members of different ethnic groups and in the offspring of matings between them, in Birmingham, England. *J Epidemiol Community Health* 49: 171-9.
- Leite IC, Koifman S (2009) Oral clefts, consanguinity, parental tobacco and alcohol use: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz Oral Res* 23: 31-7.
- Lidral AC, Moreno LM (2005) Progress toward discerning the genetics of cleft lip. *Curr Opin Pediatr* 17: 731-9.
- Lidral AC, Murray JC, Buetow KH, Basart AM, Schearer H, Shiang R, Naval A, Layda E, Magee K, Magee W (1997) Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate Craniofac J* 34: 1-6.
- Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S, Semina EV, Johnson LR, Machida J, Burds A, Parnell TJ, Rubenstein JL, Murray JC (1998) Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. *Am J Hum Genet* 63: 557-68.
- Little J, Cardy A, Munger RG (2004) Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Bull World Health Organ* 82: 213-8.
- Lorente C, Cordier S, Goujard J, Ayme S, Bianchi F, Calzolari E, De Walle HE, Knill-Jones R (2000) Tobacco and alcohol use during pregnancy and risk of oral clefts. *Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group. Am J Public Health* 90: 415-9.
- Luetteke NC, Qiu TH, Peiffer RL, Oliver P, Smithies O, Lee DC (1993) TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell* 73: 263-78.
- Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, Willett WC, Selhub J, Hennekens CH, Rozen R (1997) Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 57: 1098-102.
- Maestri NE, Beaty TH, Hetmanski J, Smith EA, McIntosh I, Wyszynski DF, Liang KY, Duffy DL, VanderKolk C (1997) Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: including candidate genes and environmental exposures in the models. *Am J Med Genet* 73: 337-44.
- Mangold E, Ludwig KU, Birnbaum S, Baluardo C, Ferrian M, Herms S, Reutter H, de Assis NA, Chawa TA, Mattheisen M, Steffens M, Barth S, Kluck N, Paul A, Becker J, Lauster C, Schmidt G, Braumann B, Scheer M, Reich RH, Hemprich A, Potzsch S, Blaumeiser B, Moebus S, Krawczak M, Schreiber S, Meitinger T, Wichmann HE, Steegers-Theunissen RP, Kramer FJ, Cichon S, Propping P, Wienker TF, Knapp M, Rubini M, Mossey PA, Hoffmann P, Nothen MM (2010) Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet* 42: 24-6.

- Manna F, Pensiero S, Clarich G, Guarneri GF, Parodi PC (2009) Cleft lip and palate: current status from the literature and our experience. *J Craniofac Surg* 20: 1383-7.
- Marazita ML, Lidral AC, Murray JC, Field LL, Maher BS, Goldstein McHenry T, Cooper ME, Govil M, Daack-Hirsch S, Riley B, Jugessur A, Felix T, Morene L, Mansilla MA, Vieira AR, Doheny K, Pugh E, Valencia-Ramirez C, Arcos-Burgos M (2009) Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results. *Hum Hered* 68: 151-70.
- Marazita ML, Murray JC, Lidral AC, Arcos-Burgos M, Cooper ME, Goldstein T, Maher BS, Daack-Hirsch S, Schultz R, Mansilla MA, Field LL, Liu YE, Prescott N, Malcolm S, Winter R, Ray A, Moreno L, Valencia C, Neiswanger K, Wyszynski DF, Bailey-Wilson JE, Albach-Hejazi H, Beaty TH, McIntosh I, Hetmanski JB, Tuncbilek G, Edwards M, Harkin L, Scott R, Roddick LG (2004) Meta-analysis of 13 genome scans reveals multiple cleft lip/palate genes with novel loci on 9q21 and 2q32-35. *Am J Hum Genet* 75: 161-73.
- Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Francioso F, Baciliero U, Padula E, Carinci P, Tognon M (2001) Linkage analysis of three candidate regions of chromosome 1 in nonsyndromic familial orofacial cleft. *Ann Hum Genet* 65: 465-71.
- Martinez-Marignac VL, Valladares A, Cameron E, Chan A, Perera A, Globus-Goldberg R, Wacher N, Kumate J, McKeigue P, O'Donnell D, Shriver MD, Cruz M, Parra EJ (2007) Admixture in Mexico City: implications for admixture mapping of type 2 diabetes genetic risk factors. *Hum Genet* 120: 807-19.
- McDade SS, Henry AE, Pivato GP, Kozarewa I, Mitsopoulos C, Fenwick K, Assiotis I, Hakas J, Zvelebil M, Orr N, Lord CJ, Patel D, Ashworth A, McCance DJ (2012) Genome-wide analysis of p63 binding sites identifies AP-2 factors as co-regulators of epidermal differentiation. *Nucleic Acids Res* 40: 7190-206.
- Mills JL, Kirke PN, Molloy AM, Burke H, Conley MR, Lee YJ, Mayne PD, Weir DG, Scott JM (1999) Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. *Am J Med Genet* 86: 71-4.
- Mills JL, Molloy AM, Parle-McDermott A, Troendle JF, Brody LC, Conley MR, Cox C, Pangilinan F, Orr DJ, Earley M, McKiernan E, Lynn EC, Doyle A, Scott JM, Kirke PN (2008) Folate-related gene polymorphisms as risk factors for cleft lip and cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 82: 636-43.
- Milunsky JM, Maher TA, Zhao G, Roberts AE, Stalker HJ, Zori RT, Burch MN, Clemens M, Mulliken JB, Smith R, Lin AE (2008) TFAP2A mutations result in branchio-oculo-facial syndrome. *Am J Hum Genet* 82: 1171-7. doi: S0002-9297(08)00215-2 [pii]
- Mitchell LE, Risch N (2001) Mode of inheritance of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a reanalysis. *Am J Hum Genet* 51: 323-32.

- Moreno LM, Mansilla MA, Bullard SA, Cooper ME, Busch TD, Machida J, Johnson MK, Brauer D, Krahn K, Daack-Hirsch S, L'Heureux J, Valencia-Ramirez C, Rivera D, Lopez AM, Moreno MA, Hing A, Lammer EJ, Jones M, Christensen K, Lie RT, Jugessur A, Wilcox AJ, Chines P, Pugh E, Doheny K, Arcos-Burgos M, Marazita ML, Murray JC, Lidral AC (2009) FOXE1 association with both isolated cleft lip with or without cleft palate, and isolated cleft palate. *Hum Mol Genet* 18: 4879-96.
- Moore JH, Gilbert JC, Tsai CT, Chiang FT, Holden T, Barney N, White BC (2006) A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. *J Theor Biol* 241: 252-61.
- Morkuniene A, Steponaviciut D, Utkus A, Kucinskas V (2007) Few associations of candidate genes with nonsyndromic orofacial clefts in the population of Lithuania. *J Appl Genet* 48: 89-91.
- Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC (2009) Cleft lip and palate. *Lancet* 374: 1773-85.
- Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicki P, Dziegielewska M, Jagodzinski PP (2010) Associations of folate and choline metabolism gene polymorphisms with orofacial clefts. *J Med Genet* 47: 809-15.
- Munger RG, Romitti PA, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC, Hanson J (1996) Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects. *Teratology* 54: 27-33. doi:
- Murray JC (2002) Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet* 61: 248-56.
- Nawshad A, LaGamba D, Hay ED (2004) Transforming growth factor beta (TGFbeta) signalling in palatal growth, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation (EMT). *Arch Oral Biol* 49: 675-89.
- Nikopensius T, Ambrozaityte L, Ludwig KU, Birnbaum S, Jagomagi T, Saag M, Matuleviciene A, Linkeviciene L, Herms S, Knapp M, Hoffmann P, Nothen MM, Kucinskas V, Metspalu A, Mangold E (2009) Replication of novel susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24 in Estonian and Lithuanian patients. *Am J Med Genet A* 149A: 2551-3.
- Niswander JD, MacLean CJ, Chung CS, Dronamraju K (1972) Sex ratio and cleft lip with or without cleft palate. *Lancet* 2: 858-60.
- Padanilam BJ, Stadler HS, Mills KA, McLeod LB, Solursh M, Lee B, Ramirez F, Buetow KH, Murray JC (1992) Characterization of the human HOX 7 cDNA and identification of polymorphic markers. *Hum Mol Genet* 1: 407-10.
- Paranaiba LM, Bufalino A, Martelli-Junior H, de Barros LM, Graner E, Coletta RD (2010) Lack of association between IRF6 polymorphisms (rs2235371 and rs642961) and non-syndromic cleft lip and/or palate in a Brazilian population. *Oral Dis* 16: 193-7.

- Park J, Park BY, Kim HS, Lee JE, Suh I, Nam CM, Kang DR, Kim S, Yun JE, Go EN, Jee SH, Beaty TH (2007) MSX1 polymorphism associated with risk of oral cleft in Korea: evidence from case-parent trio and case-control studies. *Yonsei Med J* 48: 101-8.
- Perez-Molina JJ, Alfaro-Alfaro N, Angulo-Castellanos E, Nario-Castellanos JG (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: 110-3.
- Pezzetti F, Martinelli M, Scapoli L, Carinci F, Palmieri A, Marchesini J, Carinci P, Caramelli E, Rullo R, Gombos F, Tognon M (2004) Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat* 24: 104-5.
- Prescott NJ, Lees MM, Winter RM, Malcolm S (2000) Identification of susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a two stage genome scan of affected sib-pairs. *Hum Genet* 106: 345-50.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-59.
- Puho EH, Szunyogh M, Metneki J, Czeizel AE (2007) Drug treatment during pregnancy and isolated orofacial clefts in Hungary. *Cleft Palate Craniofac J* 44: 194-202.
- Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M, Domann FE, Govil M, Christensen K, Bille C, Melbye M, Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Fitzpatrick DR, Green ED, Mossey PA, Little J, Steegers-Theunissen RP, Pennacchio LA, Schutte BC, Murray JC (2008) Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet* 40: 1341-7.
- Rojas-Martinez A, Reutter H, Chacon-Camacho O, Leon-Cachon RB, Munoz-Jimenez SG, Nowak S, Becker J, Herberz R, Ludwig KU, Paredes-Zenteno M, Arizpe-Cantu A, Raeder S, Herms S, Ortiz-Lopez R, Knapp M, Hoffmann P, Nothen MM, Mangold E (2010) Genetic risk factors for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Mesoamerican population: Evidence for IRF6 and variants at 8q24 and 10q25. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88: 535-7.
- Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC (1999) Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology* 59: 39-50.
- Romitti PA, Sun L, Honein MA, Reefhuis J, Correa A, Rasmussen SA (2007) Maternal periconceptional alcohol consumption and risk of orofacial clefts. *Am J Epidemiol* 166: 775-85.
- Rosenquist TH, Ratashak SA, 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.

- Rosenquist TH, Schneider AM, Monogham DT (1999) N-methyl-D-aspartate receptor agonists modulate homocysteine-induced developmental abnormalities. *FASEB J* 13: 1523-31.
- Rullo R, Gombos F, Ferraraccio F, Farina A, Morano D, Festa VM, Guida L, Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F (2006) TGFbeta3 expression in non-syndromic orofacial clefts. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 70: 1759-64.
- Saleem S, Rajendran R, Moinak B, Anna J, Pramod BJ (2012) Evidence for transforming growth factor-beta 3 gene polymorphism in non-syndromic cleft lip and palate patients from Indian sub-continent. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 17: e197-200.
- Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci P, Tognon M, Carinci F (2005) Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the IRF6 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population. *Am J Hum Genet* 76: 180-3.
- Schliekelman P, Slatkin M (2002) Multiplex relative risk and estimation of the number of loci underlying an inherited disease. *Am J Hum Genet* 71: 1369-85.
- Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, Todoroff K, Lammer EJ (1998) Infant C677T mutation in MTHFR, maternal periconceptional vitamin use, and cleft lip. *Am J Med Genet* 80: 196-8.
- Shi J, Song T, Jiao X, Qin C, Zhou J (2011) Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the IRF6 and TFAP2A in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCLP) in a northern Chinese population. *Biochem Biophys Res Commun* 410: 732-6.
- 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.
- Sivertsen A, Wilcox AJ, Skjaerven R, Vindenes HA, Abyholm F, Harville E, Lie RT (2008) Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population based cohort study of first degree relatives. *BMJ* 336: 432-4.
- Slayton RL, Williams L, Murray JC, Wheeler JJ, Lidral AC, Nishimura CJ (2003) Genetic association studies of cleft lip and/or palate with hypodontia outside the cleft region. *Cleft Palate Craniofac J* 40: 274-9.
- Souza LT, Kowalski TW, Vanz AP, Giugliani R, Felix TM (2012) TGFA/Taq I polymorphism and environmental factors in non-syndromic oral clefts in Southern Brazil. *Braz Oral Res* 26: 431-5.
- Sözen MA, Suzuki K, Tolarova MM, Bustos T, Fernandez Iglesias JE, Spritz RA (2001) Mutation of PVRL1 is associated with sporadic, non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela. *Nat Genet* 29: 141-2.
- Srichomthong C, Siriwan P, Shotelersuk V (2005) Significant association between IRF6 820G->A and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in the Thai population. *J Med Genet* 42: e46.

- Stanier P, Moore GE (2004) Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1: R73-81.
- Stoll C, Qian JF, Feingold J, Sauvage P, May E (1992) Genetic variation in transforming growth factor alpha: possible association of BamHI polymorphism with bilateral sporadic cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 50: 870-1.
- Suazo J, Santos JL, Jara L, Blanco R (2010) Parent-of-origin effects for MSX1 in a Chilean population with nonsyndromic cleft lip/palate. *Am J Med Genet A* 152A: 2011-6.
- Sull JW, Liang KY, Hetmanski JB, Wu T, Fallin MD, Ingersoll RG, Park JW, Wu-Chou YH, Chen PK, Chong SS, Cheah F, Yeow V, Park BY, Jee SH, Jabs EW, Redett R, Scott AF, Beaty TH (2009) Evidence that TGFA influences risk to cleft lip with/without cleft palate through unconventional genetic mechanisms. *Hum Genet* 126: 385-94.
- Suzuki K, Hu D, Bustos T, Zlotogora J, Richieri-Costa A, Helms JA, Spritz RA (2000) Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia. *Nat Genet* 25: 427-30.
- Suzuki Y, Jezewski PA, Machida J, Watanabe Y, Shi M, Cooper ME, Viet le T, Nguyen TD, Hai H, Natsume N, Shimozato K, Marazita ML, Murray JC (2004) In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate. *Genet Med* 6: 117-25.
- Tanabe A, Taketani S, Endo-Ichikawa Y, Tokunaga R, Ogawa Y, Hiramoto M (2000) Analysis of the candidate genes responsible for non-syndromic cleft lip and palate in Japanese people. *Clin Sci (Lond)* 99: 105-11.
- Tolarova M, Harris J (1995) Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology* 51: 71-8.
- Tolarova MM, Cervenka J (1998) Classification and birth prevalence of orofacial clefts. *Am J Med Genet* 75: 126-37.
- Tongkobpetch S, Siriwan P, Shotelersuk V (2006) MSX1 mutations contribute to nonsyndromic cleft lip in a Thai population. *J Hum Genet* 51: 671-6.
- Tseng YT, Hsiao HH, Hsiao HP, Tsai WC, Chiu HH (2006) A study of PVRL1 mutations for non-syndromic cleft lip and/or palate among Taiwanese patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 35: 453-5.
- Turhani D, Item CB, Watzinger E, Sinko K, Watzinger F, Lauer G, Ewers R (2005) Mutation analysis of CLPTM 1 and PVRL 1 genes in patients with non-syndromic clefts of lip, alveolus and palate. *J Craniomaxillofac Surg* 33: 301-6.
- van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ (1998) A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 62: 1044-51.

- van Rooij IA, Vermeij-Keers C, Kluijtmans LA, Ocke MC, Zielhuis GA, Goorhuis-Brouwer SM, van der Biezen JJ, Kuijpers-Jagtman AM, Steegers-Theunissen RP (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: 583-91.
- Vanderas AP (1987) Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. *Cleft Palate J* 24: 216-25.
- Velazquez-Aragon JA, Alcantara-Ortigoza MA, Estandia-Ortega B, Reyna-Fabian ME, Cruz-Fuentes C, Villagomez S, Gonzalez-del Angel A (2012) Association of interactions among the IRF6 gene, the 8q24 region, and maternal folic acid intake with non-syndromic cleft lip/palate in Mexican Mestizos. *Am J Med Genet A* 158A: 3207-10.
- 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 A* 143A: 952-60.
- Vieira AR (2006) Association between the transforming growth factor alpha gene and nonsyndromic oral clefts: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 163: 790-810.
- Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Felix TM, Rahimov F, Harrington J, Schultz RR, Watanabe Y, Johnson M, Fang J, O'Brien SE, Orioli IM, Castilla EE, Fitzpatrick DR, Jiang R, Marazita ML, Murray JC (2005) Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet* 1: e64.
- Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Cooper ME, Marazita ML, Murray JC (2003) MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America. *J Dent Res* 82: 289-92.
- Villalobos-Comparan M, Teresa Flores-Dorantes M, Teresa Villarreal-Molina M, Rodriguez-Cruz M, Garcia-Ulloa AC, Robles L, Huertas-Vazquez A, Saucedo-Villarreal N, Lopez-Alarcon M, Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Gutierrez-Aguilar R, Menjivar M, Coral-Vazquez R, Hernandez-Stengele G, Vital-Reyes VS, Acuna-Alonzo V, Romero-Hidalgo S, Ruiz-Gomez DG, Riano-Barros D, Herrera MF, Gomez-Perez FJ, Froguel P, Garcia-Garcia E, Teresa Tusie-Luna M, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S (2008) The FTO gene is associated with adulthood obesity in the Mexican population. *Obesity (Silver Spring)* 16: 2296-301.
- Wan M, Cao X (2005) BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 651-7.
- Wang H, Zhang T, Wu T, Hetmanski JB, Ruczinski I, Schwender H, Murray T, Fallin MD, Redett RJ, Raymond GV, Jin SC, Wu-Chou YH, Chen PK, Yeow V, Chong SS, Cheah FS, Jee SH, Jabs EW, Liang KY, Scott A, Beaty TH (2011) The FGF&FGFR Gene Family and Risk of Cleft Lip with/without Cleft Palate. *Cleft Palate Craniofac J*.

- Washbourne BJ, Cox TC (2006) Expression profiles of cIRF6, cLHX6 and cLHX7 in the facial primordia suggest specific roles during primary palatogenesis. *BMC Dev Biol* 6: 18.
- Wikner BN, Stiller CO, Bergman U, Asker C, Kallen B (2007) Use of benzodiazepines and benzodiazepine receptor agonists during pregnancy: neonatal outcome and congenital malformations. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 16: 1203-10.
- Wu T, Liang KY, Hetmanski JB, Ruczinski I, Fallin MD, Ingersoll RG, Wang H, Huang S, Ye X, Wu-Chou YH, Chen PK, Jabs EW, Shi B, Redett R, Scott AF, Beaty TH (2010) Evidence of gene-environment interaction for the IRF6 gene and maternal multivitamin supplementation in controlling the risk of cleft lip with/without cleft palate. *Hum Genet* 128: 401-10.
- Wyszynski DF, Beaty TH (1996) Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts. *Teratology* 53: 309-17.
- Xu J, Turner A, Little J, Bleecker ER, Meyers DA (2002) Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? *Hum Genet* 111: 573-4.
- Xu S, Yin X, Li S, Jin W, Lou H, Yang L, Gong X, Wang H, Shen Y, Pan X, He Y, Yang Y, Wang Y, Fu W, An Y, Wang J, Tan J, Qian J, Chen X, Zhang X, Sun Y, Wu B, Jin L (2009) Genomic dissection of population substructure of Han Chinese and its implication in association studies. *Am J Hum Genet* 85: 762-74.
- Zhang Z, Song Y, Zhao X, Zhang X, Fermin C, Chen Y (2002) Rescue of cleft palate in *Msx1*-deficient mice by transgenic *Bmp4* reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis. *Development* 129: 4135-46.
- Zhu J, Hao L, Li S, Bailey LB, Tian Y, Li Z (2010) MTHFR, TGFB3, and TGFA polymorphisms and their association with the risk of non-syndromic cleft lip and cleft palate in China. *Am J Med Genet A* 152A: 291-8.
- Zhu J, Ren A, Hao L, Pei L, Liu J, Zhu H, Li S, Finnell RH, Li Z (2006) Variable contribution of the MTHFR C677T polymorphism to non-syndromic cleft lip and palate risk in China. *Am J Med Genet A* 140: 551-7.
- Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, Caprau D, Christensen K, Suzuki Y, Machida J, Natsume N, Yoshiura K, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Moreno L, Arcos-Burgos M, Lidral AC, Field LL, Liu YE, Ray A, Goldstein TH, Schultz RE, Shi M, Johnson MK, Kondo S, Schutte BC, Marazita ML, Murray JC (2004) Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *N Engl J Med* 351: 769-80.