



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

SECRETARIA DE SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**PREVALENCIA DE MUTACIONES PATOGENICAS EN EL GEN *IRF6*  
RESPONSABLES DEL SÍNDROME DE VAN DER WOUDE EN  
PACIENTES MEXICANOS CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LABIO  
PALADAR HENDIDO NO SINDROMÁTICO.**

## **TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA**

PRESENTA

**DR. DAVID ALFONSO APAM GARDUÑO**

TUTOR DE TESIS

**DRA. ARIADNA ESTELA GONZÁLEZ DEL ÁNGEL**

COTUTOR

**DR. JOSÉ ANTONIO VELÁZQUEZ ARAGÓN**



CIUDAD DE MÉXICO

2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



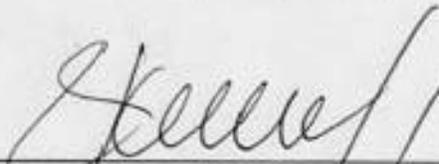
**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**PREVALENCIA DE MUTACIONES PATOGENICAS EN EL GEN  
IRF6 RESPONSABLES DEL SÍNDROME DE VAN DER WOUDE EN PACIENTES  
MEXICANOS CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LABIO PALADAR HENDIDO  
NO SINDROMÁTICO.**



---

DRA. ROSAURA ROSAS VARGAS  
DIRECTORA DE ENSEÑANZA



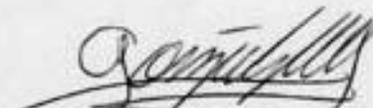
---

DR. MANUEL ENRIQUE FLORES LANDERO  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO



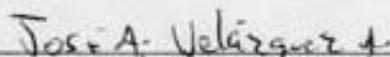
---

DRA. VICTORIA DEL CASTILLO RUIZ  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO



---

DRA. ARIADNA ESTELA GONZÁLEZ DEL ÁNGEL  
TUTOR DE TESIS



---

DR. JOSÉ ANTONIO VELÁZQUEZ ARAGÓN  
CO-TUTOR DE TESIS

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, de quien fue su voluntad el formarme en este camino, quien me dio la humildad para aprender de mis profesores, el compañerismo para formar un gran equipo con mis camaradas residentes y la solidaridad para ver en cada paciente la oportunidad de desarrollarme como genetista y ser humano.

A mis **padres**, quienes siempre me han apoyado en mis decisiones profesionales, me escucharon en todos mis problemas y me han amado en toda mi formación humana.

A mi profesora la **Dra. Ari**, quien no solo fue mi guía y mentor en este trabajo, sino que me dio el impulso y los conocimientos para formarme como médico especialista y siempre dar el 100% por lo que hago.

A **José**, quien me enseñó desde el ABC de la biología molecular y más que mi maestro fue un amigo quien me deja bellas vivencias en estos 3 años.

A la **Dra. Del Castillo** por haberme aceptado en este curso, por los conocimientos y la experiencia que me transmitió y el apoyo que me brindo.

A mis profesores el **Dr. Camilo**, la **Dra Emy** y la **Dra. Esther**, por todas sus enseñanzas y empatía. Y a mis maestros de Laboratorio, el **Dr. Miguel**, la **Dra. Bertha**, **Sara** y **Paty**, quienes me recibieron en sus servicios con una sonrisa y sembraron en mí el cariño por la genética y el deseo de superarme día a día.

A mis hermanitos: **Luisa** y **Sinhue**, por 3 años, de bellas experiencias, por siempre escucharme, apoyarme en los malos momentos y reírse de mis bromas. Siempre los llevare en mi corazón.

A mis demás compañeros y amigos: **Chio** y **Rey** quienes fueron mis mentores, amigos y camaradas, **Lore**, **Den**, **Alan**, **Pau** y **Dime**, quienes más que compañeros son mi familia.

A los niños del Instituto Nacional de Pediatría quienes son el motor que me mueve todos los días y me han enseñado no sólo de genética sino lecciones de vida. Y a cada químico y biólogo de laboratorio que pusieron una semillita de amor y sabiduría en mi formación.

## ÍNDICE

1. Resumen estructurado.	6
2. Antecedentes y marco teórico.	7
3. Planteamiento del problema.	13
4. Pregunta de investigación.	13
5. Justificación.	13
6. Objetivos.	14
7. Clasificación de la investigación.	14
8. Población (universo de estudio).	14
9. Criterios de selección.	15
10. Definiciones operacionales.	15
11. Variables.	16
12. Material y métodos.	18
13. Análisis estadístico.	20
14. Factibilidad y financiamiento.	20
15. Aspectos éticos.	21
16. Resultados clínicos.	21
17. Resultados moleculares	23
18. Discusión.	28
19. Conclusiones.	33
20. Bibliografía.	34
21. Anexos.	37

**PREVALENCIA DE MUTACIONES PATOGENICAS EN EL GEN *IRF6*  
RESPONSABLES DEL SÍNDROME DE VAN DER WOUDE EN PACIENTES  
MEXICANOS CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LABIO PALADAR HENDIDO  
NO SINDROMÁTICO.**

***COAUTORES***

- Dra. Ariadna Estela González del Ángel.
  - Tutor de tesis
  - Investigador en Ciencias Médicas D, Laboratorio de Biología Molecular
  
- Dr. en C. José Antonio Velázquez Aragón.
  - Co-tutor de tesis
  - Investigador en Ciencias Médicas C, Laboratorio de Biología Molecular.
  
- Dra. Bernardette Estandia Ortega.
  - Médico Genetista, Laboratorio de Biología Molecular.
  
- Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza.
  - Investigador en Ciencias Médicas D. Jefe del laboratorio de Biología Molecular.
  
- Dr. David Alfonso Apam Garduño.
  - Tesista para obtener el grado de Especialista en Genética Médica

## 1. RESUMEN ESTRUCTURADO

**Antecedentes, marco teórico y justificación.** El labio y paladar hendido (LPH) es una hendidura en el labio superior que puede involucrar o no al paladar. El 70% es aislado, mientras que el 30% forma parte de una entidad multimalformativa siendo el síndrome de Van der Woude (SVW) la forma más frecuente ya que representa el 3% de los casos (Brito, 2012). El SVW es causado por mutaciones en el gen *IRF6* con una herencia autosómica dominante. Algunos reportes en la literatura indican que la única manifestación en SVW es el LPH, debido a que el 15% de estos pacientes no presentan los pits labiales que lo caracterizan. Se ha descrito que en el 0.4-3.7% de pacientes con diagnóstico de LPH no sindromático presentan mutaciones en el gen *IRF6*. En población mexicana no hay estudios que determinen si existen casos de SVW en pacientes con LPH no sindromático, lo que es relevante para ofrecer un diagnóstico certero y determinar si en estudios de asociación de polimorfismos en genes candidato y LPH aislado, realizados previamente por nuestro grupo, se incluyeron casos con SVW que pudieran haber generado sesgo en los resultados.

**Objetivos.** Determinar la frecuencia de mutaciones en el gen *IRF6* en un grupo de pacientes diagnosticados como LPH no sindromático. Describir clínicamente a los individuos que resulten con una mutación en el gen *IRF6*. Buscar dirigidamente las mutaciones de *IRF6* en familiares y replantear el asesoramiento genético en los casos y familias con una mutación caracterizada.

**Material y métodos.** Se incluyeron 96 pacientes con LPH no sindromático que acuden al Instituto Nacional de Pediatría. Este estudio fue observacional, descriptivo, transversal y ambispectivo, ya que se contaba con información clínica y muestra de DNA de individuos con LPH de un banco de DNA del laboratorio de Biología Molecular, en los nuevos pacientes se realizó un interrogatorio y exploración física por un médico genetista, los datos se consignaron en la hoja de captación de datos, se firmó la carta de consentimiento informado y se tomó una muestra de 3-5 mL de sangre periférica de donde se obtuvo DNA, donde se realizó una búsqueda de variantes patogénicas en los exones 3, 4, 5 y 9 del gen *IRF6* donde se localizan la mayoría de las variantes responsables del SVW reportadas en la literatura. La búsqueda de mutaciones se realizó por PCR y su posterior secuenciación automatizada tipo Sanger. Se compararon las secuencias obtenidas contra la de referencia del gen *IRF6* reportada en el NCBI (NG\_007081.2). Las variantes detectadas se buscaron en las bases de datos de SNP's (dbSNP) y en las base de mutaciones de *IRF6* (Human Gene Mutation Database).

**Resultados.** Se analizaron 88 secuencias del exón 3 y para los exones 4, 5 y 9 se estudiaron 85, 95 y 88 secuencias respectivamente, las cuales contaban con la calidad adecuada y cubrieron la totalidad del exón. No se identificaron variantes patogénicas, sin embargo se observaron dos polimorfismos previamente descritos en la literatura, uno intrónico y otro sinónimo. El polimorfismo c.175-5C>G, p.= (rs7552506) mostró una frecuencia alélica para el alelo C de 0.30 y para el alelo G de 0.70, con una p=0.6, lo que es igual a lo reportado en otras poblaciones. La segunda variante c.459G>T, p.Ser153= (rs2013162), obtuvo frecuencias alélicas de 0.42 para el alelo G y 0.58 para el T, con una p= 0.09, similar a lo descrito en

población Mexicana residente de Estados Unidos y diferente estadísticamente a población de Europa, África y Sur de Asia.

**Discusión y conclusiones.** En el presente estudio se observó una proporción de individuos del sexo masculino vs femenino cercana a 2:1, semejante a lo descrito en literatura. De los 96 pacientes incluidos, el 61% eran casos únicos y el 39% con antecedentes familiares, lo cual está acorde con la herencia multifactorial del LPH no sindromático en donde se observa agregación familiar sin un patrón sugerente de herencia mendeliana. Además, la hendidura facial en la mayoría de los casos fue unilateral izquierda (39%), acorde a lo referido en la literatura.

Al analizar los exones 3, 4, 5 y 9 del gen *IRF6*, no se identificaron variantes patogénicas. Dentro de las posibles explicaciones por las que no observamos pacientes con SVW se encuentran: la variación étnica y los criterios de inclusión en los diferentes estudios, ya que se sugiere que es más probable encontrar casos de SVW cuando existen antecedentes familiares con LPH con un patrón de herencia autosómico dominante, o el hecho de que todos nuestros pacientes fueron valorados clínicamente por un genetista, capacitado para buscar dirigidamente datos de expresión mínima de SVW al evaluar casos con LPH. Se identificaron 2 variantes no patogénicas previamente descritas en la literatura. El polimorfismo, c.175-5C>G mostró frecuencias alélicas parecidas a las reportadas en otras poblaciones sanas, dato que apoya que es un polimorfismo no asociado al desarrollo de LPH aislado. La segunda variante c.459G>T presentó una frecuencia alélica semejante a lo reportado en población Mexicana sana residente de Estados Unidos, lo cual podría ser esperado al ser poblaciones que aparentemente comparten ascendencia similar. Este polimorfismo en la literatura se ha asociado al desarrollo de LPH aislado al conformar un haplotipo con la variante rs2235371 que se ha reportado que está en perfecto desequilibrio de ligamiento con la variante funcional rs642961 localizada en el enhancer de *IRF6* y que elimina el sitio de unión del factor de transcripción AP2 alfa el cual favorece la transcripción de *IRF6* para la proliferación de queratinocitos en los procesos palatinos. Por lo anterior, en el futuro se determinará si la variante rs2013162 (c.459G>T), también está conformando un haplotipo con rs2235371, la cual se había determinado por estudios previos, en estos mismos casos, que asociaba a LPH aislado.

Para definir con certeza si tenemos casos de SVW en nuestra población diagnosticada como LPH no sindromático, se completará el análisis de todo el gen *IRF6*, lo cual es relevante para ofrecer un diagnóstico certero y determinar si en estudios de asociación de polimorfismos en genes candidato y LPH aislado, realizados previamente por nuestro grupo, se incluyeron casos con SVW que pudieran haber generado sesgo en los resultados así como para establecer los criterios para seleccionar a casos con LPH no sindromático en donde debe descartarse la presencia de mutaciones en *IRF6* como lo mencionado en literatura, con relación a la presencia de antecedentes de LPH en familiares.

# **PREVALENCIA DE MUTACIONES PATOGENICAS EN EL GEN *IRF6* RESPONSABLES DEL SÍNDROME DE VAN DER WOUDE EN PACIENTES MEXICANOS CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LABIO PALADAR HENDIDO NO SINDROMÁTICO.**

## **2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO.**

### **DEFINICIÓN.**

El labio paladar hendido (LPH) es un defecto congénito originado por una falla en la fusión de las prominencias fronto-nasal y maxilares entre la 4<sup>o</sup> y 8<sup>o</sup> semanas de la gestación. Clínicamente se observa como una hendidura a lo largo del filtrum entre la región lateral y premaxilar del labio superior, puede ser bilateral o unilateral y presentarse con o sin paladar hendido parcial o total (Jones, 2006).

El LPH, considerado como el defecto craneofacial más frecuente a nivel mundial y nacional (Mossey, 2009; Dixon, 2011), causa alta morbilidad en los individuos afectados y representa un gasto económico importante por el manejo a largo plazo que requiere. Asimismo se ha observado que tiene un fuerte impacto clínico, ya que los pacientes suelen presentar alteración en la alimentación, lenguaje, audición, en el aspecto estético y en la interacción social, lo que requiere de un manejo multidisciplinario tanto quirúrgico, dental, lingüístico y psicológico (Dixon, 2011).

### **EPIDEMIOLOGÍA.**

El 70% de los casos de LPH son aislados con una herencia multifactorial en la cual hay participación de factores genéticos y ambientales, generalmente el riesgo de recurrencia es de un 4 a 6%. El 30% restante de los casos de LPH son sindromáticos al presentar otras alteraciones en el crecimiento, desarrollo y/o anomalías estructurales en regiones diferentes de la región orofacial (Stainer and Moore, 2004). Se han descrito más de 300 síndromes en los cuales el LPH es parte del fenotipo clínico, en estos casos, dado que la etiología de las entidades sindromáticas es heterógena el riesgo de recurrencia puede variar desde nulo hasta un 50%, por ello la importancia de establecer un diagnóstico certero (Gorlin, 2001).

### **SÍNDROME DE VAN DER WOUDE**

El síndrome de Van der Woude (SVW) [OMIM 119300] es la forma más frecuente del labio paladar hendido (LPH) sindromático ya que representa el 3% del total de los casos (Schutte, 1996, Brito 2012). El SVW es una entidad monogénica con un modo de herencia autosómico dominante con una penetrancia de 89-99% y se caracteriza clínicamente por la presencia de LPH, paladar hendido, hoyuelos en el labio inferior y/o hipodoncia (Burdick, 1985; Van der Woude, 1954). Presenta una expresividad clínica muy amplia, desde un cuadro severo con todas las

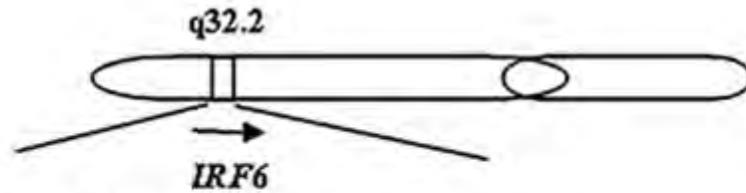
manifestaciones descritas hasta la presencia de sólo labio paladar hendido. El 15% de los pacientes con SVW no presenta los pits u hoyuelos labiales que caracterizan a esta entidad lo que origina que el fenotipo simule una forma no sindrómica de LPH, por lo que en estos casos se puede dar un diagnóstico y asesoramiento genético incorrecto ya que la ausencia de otras manifestaciones clínicas no permite distinguir al SVW de un LPH aislado con herencia multifactorial (Desmyter, 2010; Brito, 2012).

## GEN *IRF6*

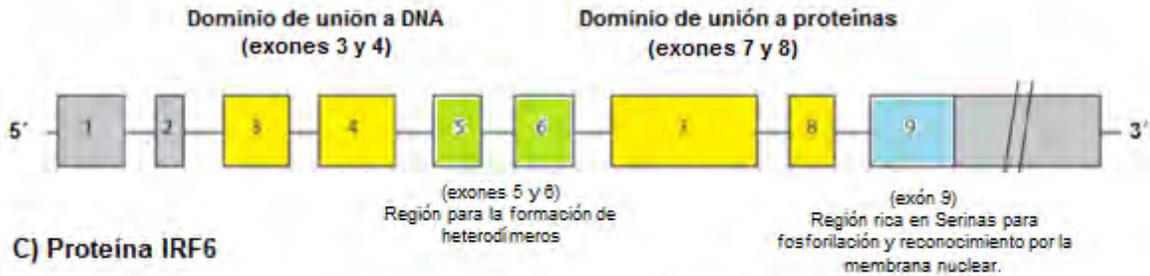
### **Estructura.**

El gen factor regulador de interferón 6 (*IRF6*) se ubica en el locus 1q32.3-q41, tiene 9 exones los cuales el 1 y 2 no son codificantes. Este gen codifica a la proteína IRF6 que contiene 517 aminoácidos y que pertenece a la familia de los factores de transcripción reguladores de interferón, posee un dominio altamente conservado de unión a DNA tipo hélice-bucle-hélice (aminoácidos 13 a 113) y un dominio de unión a proteínas menos conservado (aminoácidos 226 a 394). El dominio de unión a DNA contiene un motivo único penta-triptófano el cual se describe como esencial para su función; a través del dominio de unión a proteína forma homo y heterodímeros, por lo que también se conoce como dominio de asociación a IRF (IAD: IRF association domain), para llevar a cabo esta dimerización es necesario la fosforilación en residuos de serina en el extremo carboxilo que es indispensable para el reconocimiento en la membrana nuclear. La proteína IRF6 se expresa de forma constitutiva en los tres tejidos germinales desde la semana 5 del desarrollo embrionario participando en procesos de proliferación y diferenciación celular. (Fitzpatrick 1990; Briyanlou y Darnell 2002) (Figura 1).

A) Cromosoma 1



B) Gen *IRF6* (Representación de exones)



C) Proteína *IRF6*



Figura 1. Locus, estructura y dominios del gen *IRF6*. Figura adaptada de Desmyter, 2010

### Funciones

*IRF6* codifica un factor de transcripción, el cual regula la expresión de otros genes blanco, los primeros descritos son el interferón alfa e interferón-beta, donde *IRF6* se une al sitio promotor favoreciendo su expresión tanto en células embrionarias durante el proceso de diferenciación y proliferación celular así como en la vida extra uterina durante procesos inflamatorios (Taniguchi, 2001).

Estudios en modelos de ratón knockout apoyan el papel de *IRF6* en la regulación del crecimiento celular, detención del ciclo celular, proliferación y diferenciación de queratinocitos así como proliferación de mesénquima, también se ha descrito en la literatura que participa en el desarrollo inmunológico al estimular la proliferación de células T y diferenciación de células pre-B, aunque su función exacta en la respuesta inmune sigue siendo desconocida, se sugiere que pudiera participar a través de promover la expresión de interleucinas e interferones (Takaoka, 2005).

### Función de *IRF6* asociado al desarrollo embrionario del paladar.

En seres humanos este gen se expresa en las crestas palatinas laterales, en el esbozo mandibular caudal al estomodeo y placoda nasal a inicios de la quinta semana de desarrollo embrionario intrauterino, que conlleva al crecimiento y diferenciación del mesénquima celular para inducir una fusión de dichas estructuras a finales de la novena semana del desarrollo (Ingraham, 2006; Richardson, 2006; Desmeyer 2010; Ferrero, 2010).

Dentro de los genes blanco de *IRF6* asociados al desarrollo del labio y paladar se mencionan: *TP63* que codifica para un factor de transcripción involucrado en la regulación del crecimiento celular e interacción epitelio mesénquima de los procesos maxilares en el embrión, *HEK293* (embryonic epithelial kidney) el cual codifica para un factor de crecimiento epidérmico que se expresa de forma significativa en los procesos maxilares durante la sexta semana del desarrollo y el gen del factor de crecimiento transformante beta (*TGF-β*) que se relaciona a proliferación de células epidérmicas (Ferrero, 2010; Richardson, 2006).

### **Mutaciones en *IRF6***

La haploinsuficiencia de *IRF6* condiciona anomalías de la piel y del desarrollo craneofacial. Modelos embrionarios murinos con mutaciones con efecto negativo en *IRF6* presentan carencia de células de epidermis y mesénquima alrededor de la región oral, además de deficiencia de E-caderina la cual es indispensable en la adherencia celular e interacción mesénquima-epitelio (Richardson, 2006). Estas interacciones aberrantes podrían llevar a la falta de formación y de proliferación de las crestas palatinas, que conduce a las fisuras palatinas (Ferrero, 2010).

Mutaciones puntuales de sentido erróneo y sin sentido en *IRF6* son responsables de la mayoría de los casos de SVW y aunque pueden ocurrir en cualquier región de este gen, el 80% se localizan en los exones 3, 4, 7 y 9 (Kondo, 2002). Se ha observado que las variantes génicas patogénicas asociadas con este síndrome causan pérdida de la función del gen *IRF6* cuyo papel es crítico en el desarrollo de estructuras orofaciales como el paladar. Aún no es posible predecir la severidad del cuadro clínico en individuos que presentan mutaciones en *IRF6* debido a que no se ha establecido una correlación genotipo-fenotipo en el SVW (Brito, 2012). Sin embargo, se ha descrito que variantes génicas que introducen un codón de paro y de corrimiento de marco de lectura, que afectan al dominio de unión a DNA son más frecuente en el fenotipo clásico de SVW con la presencia de LPH, hipodoncia y pits en labio inferior (Little, 2009; Ferreira de Lima, 2009).

### **SÍNDROME DE VAN DER WOUDE Y LPH AISLADO**

Algunos casos de SVW pueden confundirse con LPH no sindromático al manifestarse sólo con la hendidura facial sin otra característica clínica que pueda distinguirlos. De acuerdo a la literatura, existe un estudio en 108 casos de LPH no sindromático de origen brasileño que reporta una frecuencia de mutaciones de 3.7% en *IRF6* al analizar los exones 3, 4 y 7, en los que se ha reportado el 78% de las mutaciones responsables de SVW (Jehee, 2009); otro reporte en 95 pacientes diagnosticados como LPH no sindromático de Bélgica y Francia encuentran una frecuencia de 3.15% de variantes génicas patológicas en *IRF6* al analizar los exones 2 al 9 (Desmyter, 2010). Por otro lado, en 17 familias suecas, con al menos dos miembros diagnosticados con LPH, no sindromático no se encontraron mutaciones en los nueve exones de *IRF6* (Pegelow, 2008) al igual que en otro estudio en Malasia en donde también se analizaron los nueve exones de *IRF6* en 160 pacientes con LPH aislado (Zuccheri, 2004). Finalmente, en Estados Unidos, al analizar a *IRF6* en 1521 familias (tríos) con probandos con LPH no sindromático, se

encontró que el porcentaje de mutaciones fue del 0.4%, por lo que los autores concluyen que la frecuencia de variantes patogénicas es baja y sugieren que el análisis del gen se realice preferentemente en familias con LPH aislado que muestren un patrón de herencia autosómico dominante (Leslie, 2015). Aun cuando este último trabajo menciona que la presencia de variantes patogénicas en *IRF6* en LPH no sindrómico es poco frecuente, algunos autores sugieren analizar a *IRF6* en pacientes con LPH en quienes está en duda la morfología del labio inferior y no se pueda descartar la presencia de pits u hoyuelos así como en personas con esta malformación que cuenten con antecedentes familiares (Desmyter, 2010, Salashourifar, 2012, Leslie 2015).

El confirmar el diagnóstico de SVW mediante el estudio molecular de *IRF6* permite brindar un asesoramiento genético de certeza, ya que el SVW al ser una entidad autosómica dominante tiene un riesgo de recurrencia del 50% en la descendencia, lo cual es superior al riesgo de recurrencia del LPH no sindrómico de herencia multifactorial (Brito, 2012). Al contar con un diagnóstico certero, se puede establecer un pronóstico con relación al manejo quirúrgico, dado que se ha reportado que casos con SVW suelen presentar mayores complicaciones de cicatrización que los pacientes con LPH no sindrómico. Un estudio al comparar las complicaciones postquirúrgicas de 17 casos de SVW y 68 casos de LPH aislado pareados, encuentra que la frecuencia de complicaciones de cicatrización son mayores entre los pacientes con SVW (47%, 8/17) con respecto a los casos de LPH no sindrómico (19%, 13/68) ( $p=0.02$ ), siendo las fistulas la complicación más frecuente (Jones, 2010). Se ha postulado mediante modelos murinos que el tejido dérmico con mutaciones en *IRF6* se relaciona a niveles disminuidos de citoqueratinas las cuales participan en el proceso de cicatrización; sin embargo, al realizar estudios histológicos en humanos no se ha encontrado una diferencia significativa en los niveles de citoqueratinas (Dixon 2016).

La identificación de casos de SVW es relevante porque permite la búsqueda dirigida de mutaciones en familiares aparentemente no afectados como consecuencia de la penetrancia incompleta, la cual se reporta del 80 al 88%, (Gorlin, 2010; Desmeyer, 2014) y favorece la descripción de la variedad de manifestaciones clínicas consecuencia de la expresividad variable de la enfermedad, donde se menciona que un 88% de los afectados presentan los defectos de labio y paladar, 85% la presencia de pits u hoyuelos de labio inferior y 80% las alteraciones dentales (Ghassibé, 2004, Birkeland, 2010). Esta expresividad en el cuadro clínico se reporta amplia, incluso en los miembros de una familia con la misma variante genética patológica, un ejemplo de esto es un reporte de una familia con la mutación c.290A>C del exón 4, con cambio a nivel de proteína p.Tyr97Cys, en donde los 9 miembros afectados presentaban diferentes manifestaciones del cuadro clínico, ya que sólo en 2 de ellos se observaron pits labiales asociados a LPH, 6 LPH sin pits y 1 pits sin LPH (Jobling, 2011).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México no existen estudios sobre la frecuencia de SVW en pacientes con diagnóstico clínico de LPH no sindromático. En la literatura se ha reportado una frecuencia de mutaciones en *IRF6* en pacientes diagnosticados con LPH aislado que oscila desde 0.4% hasta el 3.7% (Jehee, 2009; Desmyter, 2010; Leslie, 2015). La dificultad que existe en algunos casos para poder distinguir clínicamente entre un LPH no sindromático de un caso de SVW origina el subdiagnóstico de este síndrome monogénico. Si un paciente con diagnóstico de LPH en realidad se trata de un caso de SVW, pueden pasar desapercibidas, por no buscarse dirigidamente, algunas características asociadas con este síndrome como la hipodoncia; además de no realizarse un estudio adecuado a la familia al no buscar en ellos la mutación responsable en *IRF6* y datos clínicos compatibles con una expresión mínima. La falta de un diagnóstico preciso causa un asesoramiento genético poco certero, ya que el modo de herencia y los riesgos de recurrencia entre estas dos entidades son distintos.

Por otro lado, si la etiología de la malformación no está bien definida puede condicionar un sesgo en los estudios que se realizan sobre asociación entre polimorfismos en genes candidatos y LPH no sindromático al existir un error de clasificación en el grupo de los casos. Esto último conlleva a una subestimación del efecto de las variantes genéticas en la etiología de una enfermedad multifactorial, en este caso del LPH no sindromático, ya que la inclusión de estos individuos con una entidad sindromática diluye el efecto de las variantes asociadas dentro del grupo de casos por lo que deben ser excluidos (Quade, 1980.)

### 4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la frecuencia de individuos con síndrome de Van der Woude por mutación en el gen *IRF6* en una muestra de pacientes mexicanos con diagnóstico clínico de labio paladar hendido no sindromático?

### 5. JUSTIFICACIÓN

El 15% de los pacientes con SVW no presenta los pits u hoyuelos labiales que caracterizan a esta entidad lo que origina que el fenotipo simule una forma no sindromática de LPH (Desmyter, 2010). Se ha observado previamente mutaciones en *IRF6* hasta en el 3.7% (Jehee, 2009) de individuos que sólo presentan LPH, por lo que es importante realizar el estudio de este gen para descartar que en nuestra población tengamos casos con un diagnóstico erróneo (Desmyter, 2010, Leslie 2015). Si se identifican casos de SVW en nuestros pacientes con LPH no sindromático se puede justificar realizar el estudio de *IRF6* en individuos con esta malformación a pesar de no presentar otro dato clínico que apoyará el diagnóstico de SVW. Por otro lado, la confirmación del SVW permite buscar intencionadamente otras alteraciones clínicas como hipodoncia en los pacientes además de tratar de definir si se observa una correlación fenotipo-genotipo. Asimismo al identificar la variante génica responsable de esta entidad se puede brindar un asesoramiento

genético de certeza al determinar si existe expresión mínima o no penetrancia en otros miembros de la familia a quienes se les buscaría dirigidamente la mutación identificada en el caso índice. Con lo anterior, se pueden definir adecuadamente los riesgos de recurrencia, dado que el SVW tiene un modo de herencia autosómico dominante con un riesgo de presentarse en la descendencia del individuo afectado del 50% en cada embarazo, mientras que en el LPH no sindromático, al tener una etiología multifactorial, el riesgo de recurrencia depende del número de afectados en la familia pero en la mayoría de los casos es menor (4-6%). Finalmente, el hallazgo de casos de SVW dentro de nuestro grupo de pacientes permitirá determinar si en los estudios realizados previamente sobre asociación de genes candidatos y LPH no sindromático existió un sesgo de asociación por la inclusión de individuos con SVW (Velázquez-Aragón, 2012; Estandia-Ortega, 2014).

## **6. OBJETIVOS.**

Determinar la frecuencia de mutaciones en el gen *IRF6* en un grupo de pacientes diagnosticados clínicamente como LPH no sindromático

Describir clínicamente a los casos que resulten con una mutación en estado heterocigoto en el gen *IRF6*.

Buscar dirigidamente las mutaciones de *IRF6* en familiares de los pacientes identificados como casos de SVW e identificar casos de no penetrancia o expresividad mínima mediante su exploración física.

Replantear el asesoramiento genético en los casos y familias con mutación caracterizada en *IRF6*.

## **7. CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

Observacional, descriptiva, transversal, ambispectiva

## **8. POBLACION (UNIVERSO DE ESTUDIO)**

A) POBLACIÓN OBJETIVO: Pacientes con diagnóstico clínico de labio paladar hendido no sindromático que acuden para su manejo al Instituto Nacional de Pediatría.

B) POBLACIÓN DE ESTUDIO: Pacientes con diagnóstico clínico de labio paladar hendido no sindromático que acudan al servicio de Consulta Externa de Genética del Instituto Nacional de Pediatría y los familiares de aquellos pacientes en quienes se haya confirmado una mutación en el gen *IRF6*.

## 9. CRITERIOS DE SELECCIÓN

### A) CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Pacientes con labio paladar hendido no sindromático.
- Cualquier género.
- Cualquier edad.
- Firma de carta de consentimiento y/o asentimiento informado del caso índice (Anexo 2 y/o 3).
- Firma de consentimiento informado en los familiares de pacientes en quienes se haya confirmado una mutación en el gen *IRF6* (Anexo 4).

### B) CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Pacientes en quienes la muestra de DNA que se obtiene a partir de sangre periférica fuera insuficiente o nula y no aceptaran una segunda toma de muestra.
- Pacientes que se hayan transfundido en los últimos 3 meses (criterio de exclusión temporal).

## 10. DEFINICIONES OPERACIONALES

**Edad.** Tiempo de existencia de una persona desde su nacimiento hasta la actualidad.

**Género.** Término utilizado para hacer referencia al sexo del individuo (femenino, masculino).

**Pit u hoyuelo en labio inferior.** Hoyo o fosa en el labio inferior de la boca.

**Fístula labial.** Conexión o canal entre la parte externa e interna del labio superior o inferior de la cavidad oral.

**Labio hendido.** Fisura en el labio superior, unilateral (izquierda o derecha) o bilateral.

**Microforma labio hendido.** Fisura labial poco frecuente que corresponde a una expresión mínima o muy leve del labio hendido y se caracteriza por alteración de la línea cutáneo-mucosa a nivel del arco de Cupido, surco en el rojo labial, disrupción del músculo orbicular o malformación nasal menor.

**Labio y paladar hendido.** Fisura unilateral o bilateral en el labio y en el paladar duro y/o blando.

**Úvula bífida.** Muesca o hendidura en la estructura que cuelga del velo del paladar.

**Paladar hendido solo.** Fisura que involucra al paladar duro y/o blando sin afectar al labio.

**Paladar hendido submucoso.** Fisura del hueso del paladar que no involucra la mucosa del mismo y es visible sólo mediante una radiografía o nasofibroscofia; clínicamente el paladar se ve íntegro con o sin úvula bífida y se acompaña de voz nasal.

**Hipodoncia.** Es la anomalía dental más común y se caracteriza por la ausencia de 1 o más dientes.

**Malformación.** Defecto congénito que se origina por una alteración primaria en el desarrollo embrionario de algún órgano o sistema y puede afectar la función del mismo.

**Síndrome de Van der Woude (SVW).** Entidad genética causada por mutación en el gen *IRF6* y caracterizada por la presencia de hoyuelos o elevaciones cónicas en el labio inferior, labio hendido, labio paladar hendido o solo paladar hendido, hipodoncia y/o adhesiones entre el maxilar y la mandíbula (singnatia).

**Variante génica.** Cambio en la secuencia de nucleótidos de una región genética tomando como referencia una secuencia consenso.

**Variante patogénica:** Cambio en la secuencia de nucleótidos de una región genética que contribuye de manera directa a una enfermedad. Estas variantes por lo general alteran los niveles normales de su producto. (MacArthur, 2014)

**Variante polimórfica:** Cambio en la secuencia de nucleótidos de una región genética presente en población sana con una frecuencia mayor al 1%, que no suele asociarse con enfermedad (MacArthur, 2014)

## 11. VARIABLES

Las variables que se incluirán en el presente estudio se enumeran a continuación:

Nombre de la Variable	Definición Conceptual	Tipo de Variable	Medición de la Variable
<b>Género</b>	Sexo: masculino o femenino	Nominal	Masculino o femenino
<b>Edad</b>	Tiempo de existencia desde el nacimiento hasta la actualidad	Continua	Años

<b>Pit u hoyuelo en el labio inferior</b>	Hoyo o fosa en el labio inferior de la boca	Nominal	Ausente Presente
<b>Fistula labial</b>	Conexión o canal que comunica la región interna y externa del labio superior o inferior de la boca	Nominal	Ausente Presente
<b>Labio hendido</b>	Fisura en el labio superior, unilateral (izquierda o derecha) o bilateral	Nominal	Ausente Presente
<b>Microforma labio hendido</b>	Fisura labial poco frecuente que corresponde a una expresión mínima o muy leve del labio hendido	Nominal	Ausente Presente
<b>Labio y paladar hendido</b>	Fisura unilateral o bilateral en el labio y en el paladar duro y/o blando	Nominal	Ausente Presente
<b>Paladar hendido</b>	Fisura en el paladar duro y/o blando sin afección del labio	Nominal	Ausente Presente
<b>Úvula bífida</b>	Úvula dividida por una muesca o hendidura	Nominal	Ausente Presente
<b>Paladar hendido submucoso</b>	Fisura del hueso del paladar que no involucra la mucosa del mismo	Nominal	Ausente Presente
<b>Hipodoncia</b>	Ausencia de uno o más dientes	Nominal	Ausente Presente
<b>Malformación</b>	Defecto congénito por una alteración primaria del desarrollo embrionario	Nominal	Ausente Presente
<b>Síndrome de Van Der Woude</b>	Presencia de labio paladar hendido o solo paladar hendido, hipodoncia y/o pits labiales por mutación en el gen <i>IRF6</i>	Nominal	Ausente Presente
<b>Variante génica</b>	Cambio en la secuencia de nucleótidos de una región genética	Nominal	Ausente Presente

<b>Variante Patogénica</b>	Cambio en la secuencia de nucleótidos de una región genética que contribuye de manera directa a una enfermedad.	Nominal	Ausente Presente
<b>Variante Polimórfica</b>	Cambio en la secuencia de nucleótidos de una región genética con frecuencia mayor al 1% en población sana que no suele asociarse con enfermedad	Nominal	Ausente Presente

## 12. MATERIAL Y MÉTODOS

### A. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

El presente trabajo forma parte del proyecto titulado: “Prevalencia de mutaciones patogénicas en el gen *IRF6* responsables del síndrome de Van Der Woude en pacientes mexicanos con diagnóstico clínico de labio paladar hendido no sindromático”, que se realiza en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría el cual está aprobado por los comités de Investigación, Ética y Bioseguridad del INP con el número de registro 061/2014.

Este estudio estuvo dirigido a determinar la frecuencia de mutaciones en 4 exones del gen *IRF6* responsables del SVW, en pacientes diagnosticados clínicamente con labio paladar hendido no sindromático dado que en literatura se refieren casos de SVW con expresión mínima de la enfermedad los cuales son indistinguibles clínicamente de casos de labio paladar hendido aislado.

### B. TAMAÑO DE MUESTRA

La muestra analizada fue a conveniencia de 96 casos de LPH no sindromático.

### C. CAPTACIÓN DE PACIENTES

1. Se han realizado en el laboratorio de Biología Molecular estudios dirigidos para identificar los factores genéticos involucrados en la etiología del LPH no sindromático en pacientes mexicanos y actualmente se cuenta con una muestra de 160 casos de LPHA valorados clínicamente por un genetista.
2. Los pacientes de los cuales ya se contaba con muestra de DNA, por su participación en estudios anteriores, se recontactaron para solicitarles su consentimiento informado para ingresarlos en este estudio.
3. Aquellos casos donde no se contó con muestra de DNA suficiente se localizaron para solicitar consentimiento informado y la realización de una nueva toma de muestra de sangre periférica de 3-5 ml para la obtención de DNA.
4. A los pacientes que no habían participado en los estudios previos, se les realizó un interrogatorio y exploración física, los datos se consignaron en la hoja de captación de datos y se les solicitó firma de consentimiento y/o

asentimiento informado previa toma de 3-5 mL de sangre periférica para obtención de DNA.

#### D. METODOLOGÍA MOLECULAR.

##### Extracción de DNA

La extracción de DNA se llevó a cabo a través de la técnica de purificación por resinas de intercambio iónico con el kit QIAamp DNA blood mini kit (QIAGEN Sciences, Maryland EUA) a partir de los leucocitos de las muestras de sangre periférica. Para determinar la integridad del DNA obtenido, las muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con GelStar®. La concentración y pureza de DNA se analizó mediante fotoespectrometría. Las muestras de DNA obtenidas se conservaron a una temperatura de 4°C hasta su análisis.

##### Amplificación de PCR (reacción en cadena polimerasa)

La amplificación de los exones de *IRF6* se realizó en el termociclador Applied Biosystems modelo Gene Amp PCR System 2720. La secuencia de los primers utilizados fueron diseñados en el Laboratorio de Biología Molecular del INP con el programa Primer Blast para los diferentes exones, sus secuencias están descritas en la tabla 1 y las condiciones utilizadas en la tabla 2. Para la amplificación se utilizó 0.2UI de Taq Gold™ polimerasa, en presencia de 3mL de buffer, 3mL de MgCL<sub>2</sub>, 0.5 mL de dNTPs, 0.7 mL de primers.

Tabla 1. Secuencia de primers de los exones amplificados del gen <i>IRF6</i>		
Exón	Secuencia sentido 5'----3'	Secuencia sentido 3'-----5'
3	ACCTGGCACAGCTTATTCCC	GCTATACTGCGTGCCTGCTA
4	AATCGGGGTTGGGATGATGG	TCTGGGTCCTTCCCAGAGAAA
5	CCCTAGCTTGAATGGTGGGT	GCAGGGACTGATCCTGCTTT
9	TCAGGGCCTCTTTGGTCTGT	AAACTCCCAGGCCAAATCTCC

Tabla 2. Condiciones del termociclador Applied Biosystems modelo Gene Amp PCR System 2720	
Desnaturalización inicial	94°C 6 minutos
Desnaturalización	94°C 35 segundos
Alineación	57°C 35 segundos
Extensión	72°C 45 segundos
Extensión final	72°C 10 minutos
	4°C infinito
	40 ciclos

Los productos de PCR tuvieron un tamaño para el exón tres de 748 pb (148 del intrón 2, 177 del exón 3 y 423 del intrón 3), el del exón 4 de 512 pb (162 del intrón 3, 205 del exón 4 y 145 del intrón 4), el del exón 5 fue de 323 pb (82 pb del intrón 4, 129 del exón 5 y 112 pb del intrón 5) y finalmente el amplicón del exón 9 estuvo

conformado por 99 pb del intrón 8, los 225 pb codificantes del exón 9 y 254 pb de la región 3'UTR.

Para el análisis de la secuenciación automatizada tipo Sanger, la reacción Big Dye de los productos de PCR se realizó en la empresa MacroGen (Rockville, MD, USA), con primers de secuenciación específicos, diseñados por el laboratorio de Biología Molecular mediante el programa de Primer Blast, las secuencias de dichos primers se muestran en la tabla 3. Para el exón 3 el primer de secuenciación hibrida con la hebra sentido o forward y permite el análisis de 78 bases antes del inicio de la secuencia exónica y 81 bases antes del codón de inicio de la traducción (con la eliminación de los primeros 70 nucleótidos del producto de PCR que pertenecen al intrón 2). Para el exón 4 el primer de secuenciación reconoce a la hebra antisentido o reverse con lo que se observan 121 nucleótidos antes del extremo 3' de la secuencia exónica (se excluyen 24 bases del extremo 3' del producto de PCR del intrón 4). El exón 5 fue secuenciado al utilizar un primer que reconoce a la hebra sentido o forward para analizar 77 bases antes del inicio de la secuencia exónica y excluyendo 5 del producto de PCR las cuales se encuentran en el intrón 4. Finalmente para obtener las secuencias del exón nueve se utilizó un primer de reconocimiento de la hebra sentido o forward con el análisis de 74 bases previo a la secuencia exónica y el cual excluye las primeras 25 del extremo 5' del producto de PCR las cuales pertenecen al intrón 8 del gen. Las secuencias obtenidas fueron comparadas contra la de referencia del gen *IRF6* reportada en el NCBI (NG\_007081.2).

<b>Tabla 3. Primers de secuenciación de <i>IRF6</i></b>	
<b>Exón</b>	<b>Secuencia</b>
<b>3</b>	5'-GCACAGCTTATTCCCATATT-3'
<b>4</b>	5'-AAAGGCTTTCTTGCTTTATCCA-3'
<b>5</b>	5'-GCTTGAATGGTGGGTAGCTG-3'
<b>9</b>	5'-CTTTGGTCTGTCCTTCAATC-3'

### **13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En el presente estudio se planeó realizar estadísticas descriptivas para la frecuencia de variantes en *IRF6* en pacientes diagnosticados con LPH no sindromático y de sus características clínicas. A las variantes polimórficas identificadas se estimó si se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg por la prueba exacta de Fisher. Se compararon las frecuencias alélicas de las variantes obtenidas con las frecuencias alélicas reportadas en el Database SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) para población Mexicana de Los Angeles (MEX), población Europea (EUR), población Africana (AFR) y población del sureste de Asia (SAS) por la prueba de Ji cuadrada.

### **14. FACTIBILIDAD Y FINANCIAMIENTO**

El grupo de trabajo de laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría tiene un banco de DNA de pacientes con LPH aislado y en la consulta de

Genética se captaron a los casos nuevos. Se cuenta con los recursos humanos con preparación en biología molecular para la realización de este estudio. Los materiales necesarios fueron proporcionados por el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría a través de Recursos Fiscales (proyecto 061/2014) y con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social FOSSIS (proyecto 262385 apoyado en la convocatoria S0008-2015-22). Además, el Dr. David Apam cuenta con el apoyo económico otorgado por la Fundación Carlos Slim, a través de la beca Impulso para la Investigación 2016.

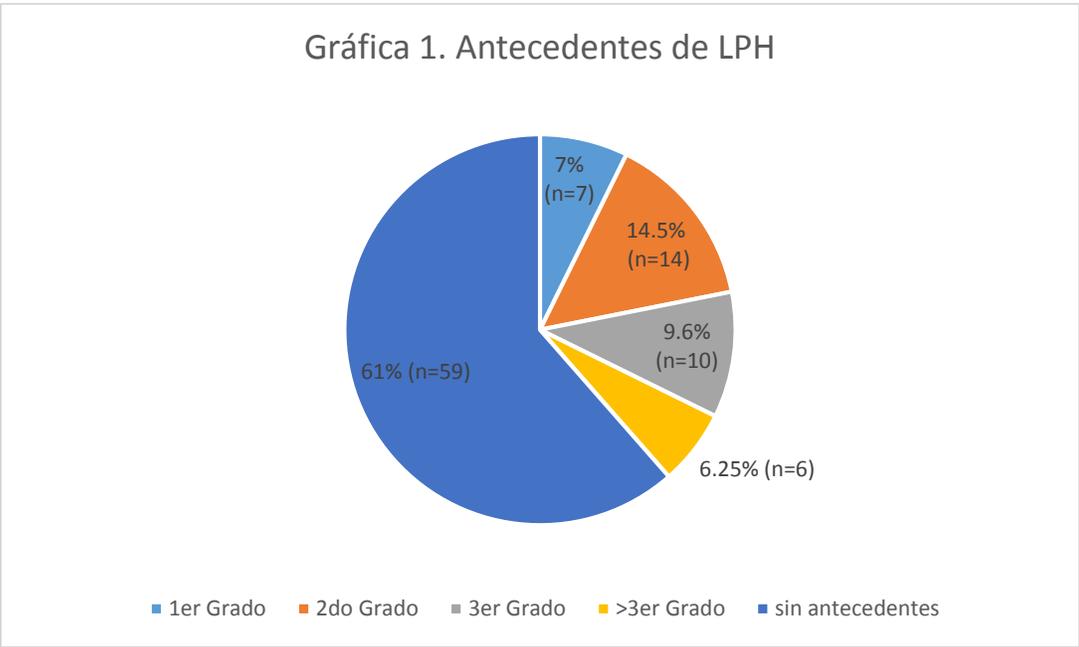
## **15. ASPECTOS ÉTICOS**

Este protocolo de investigación se apegó a los Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos de la Declaración de Helsinki y a las regulaciones de Salud en México (Art. 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la salud). Fue revisado para su aprobación por los comités de Investigación, Ética y Bioseguridad del Instituto Nacional de Pediatría. Todos los pacientes que participaron dieron su consentimiento a través de su firma en el consentimiento y/o asentimiento informado (Anexo 2 y 3). La información clínica y genética se resguardo en archivos electrónicos encriptados y sólo los investigadores responsables del proyecto son quienes tienen acceso a la misma para preservar la confidencialidad. Este estudio se considera de bajo riesgo ya que sólo requirió de una toma de 3 a 5 ml de sangre de los casos nuevos de LPH. El asesoramiento genético se brindó en todos los casos de acuerdo a los hallazgos obtenidos en el estudio molecular y los resultados genéticos no se comparten con terceros a menos que el paciente y/o sus representantes legales lo soliciten y autoricen por escrito.

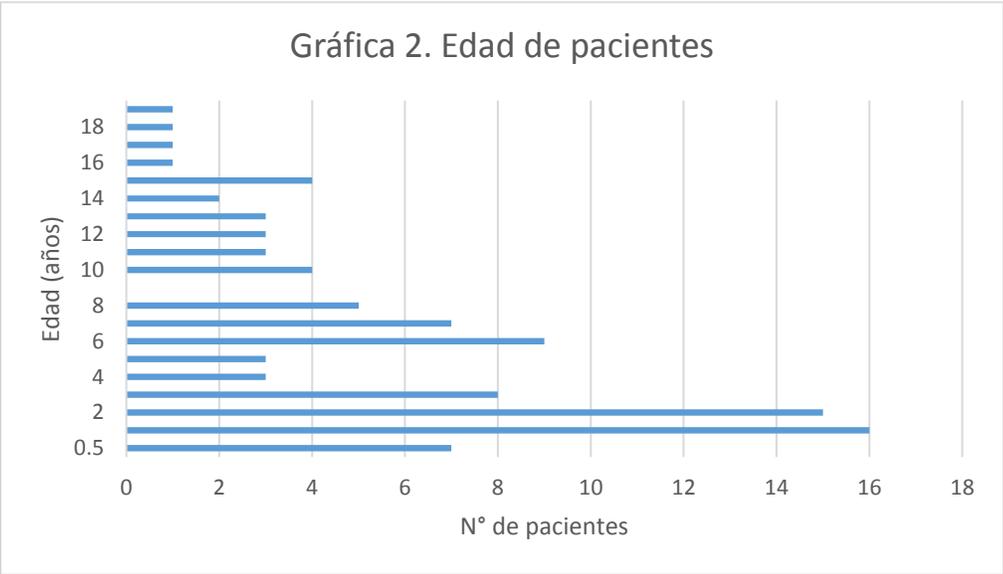
## **16. RESULTADOS CLÍNICOS**

En el presente trabajo se incluyeron 96 pacientes diagnosticados con LPH no sindromático que acudieron a la consulta de Genética que presentaban seguimiento en los servicios de Ortodoncia, Cirugía Plástica o Foniatría en el Instituto Nacional de Pediatría. Los pacientes fueron examinados por un médico genetista donde se determinó que todos presentaban somatometría y desarrollo psicomotor esperado para la edad, sin presentación de dismorfias u otras malformaciones por lo que se consideraron como casos con LPH no sindromático.

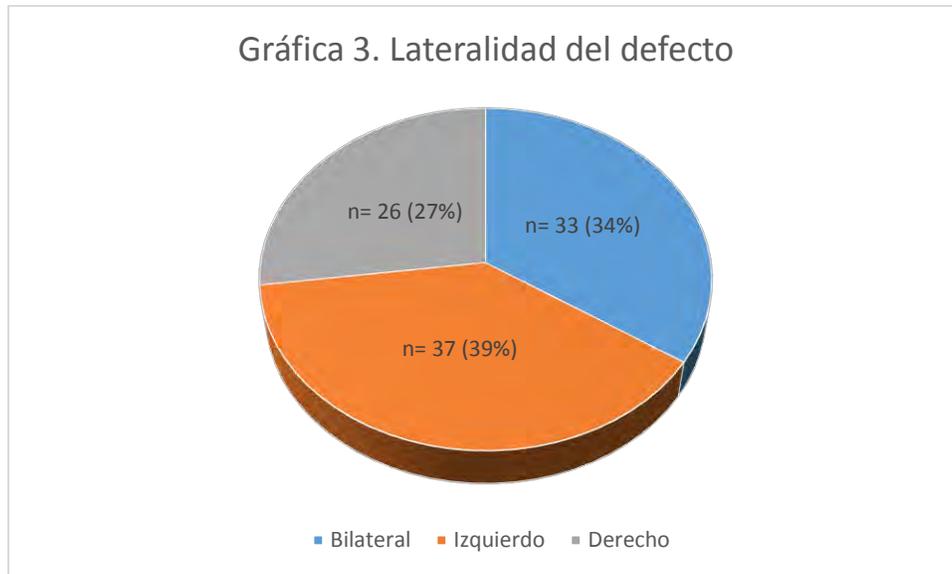
Dentro de los antecedentes heredo-familiares se reportó una mayor cantidad de pacientes sin familiares afectados (n=59), mientras que en aquellos casos con antecedentes de familiares afectados (n=37) se describe el grado de parentesco y los porcentajes en la Gráfica 1.



En cuanto al género el 29.2% (n=28) de los casos fueron femeninos y el 70.2% (n= 68) masculinos. El promedio de edad fue de 6.26 años con una desviación estándar de 4.97, siendo la edad más frecuente 1 año (Gráfica 2).



Referente a la lateralidad del defecto se observó que 37 pacientes lo presentaron del lado izquierdo, 26 del derecho y 33 de forma bilateral (Gráfica 3).



## 17.RESULTADOS MOLECULARES

La integridad del DNA se evaluó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con GelStar® (Figura 1)

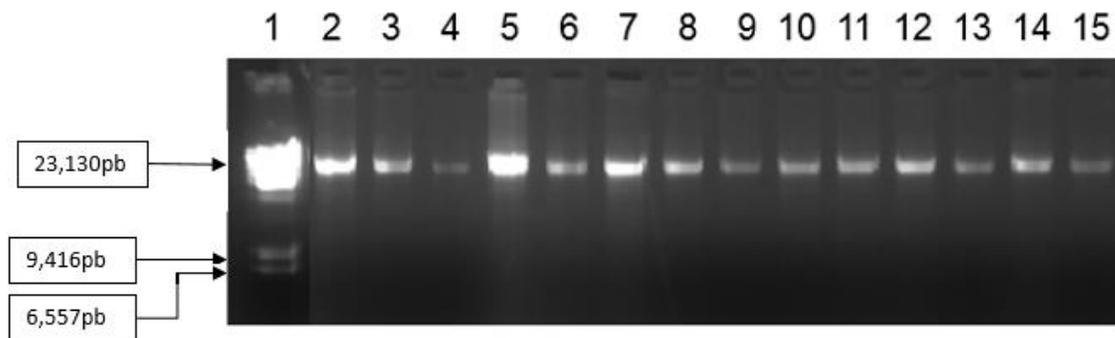


Figura 1. Gel de agarosa al 1% de muestras de DNA extraídas de leucocitos de pacientes con LPH no sintomático. Carril 1: Marcador de peso molecular Fago Lambda *Hind*III. Carriles 2-15: muestras de DNA el cual se considera de buena calidad.

Para la búsqueda de mutaciones en los exones 3, 4, 5 y 9 del gen *IRF6*, se realizó amplificación de los mismos en el termociclador Applied Biosystems modelo Gene Amp PCR System 2720, con las secuencias de primers y condiciones descritas previamente en la metodología. Para determinar la presencia de los amplicones de los diferentes exones, se colocaron 5uL de cada reacción en geles de agarosa al 1% teñido con GelSar® y observados en un transiluminador con luz UV (Figuras 2, 3, 4 y 5).

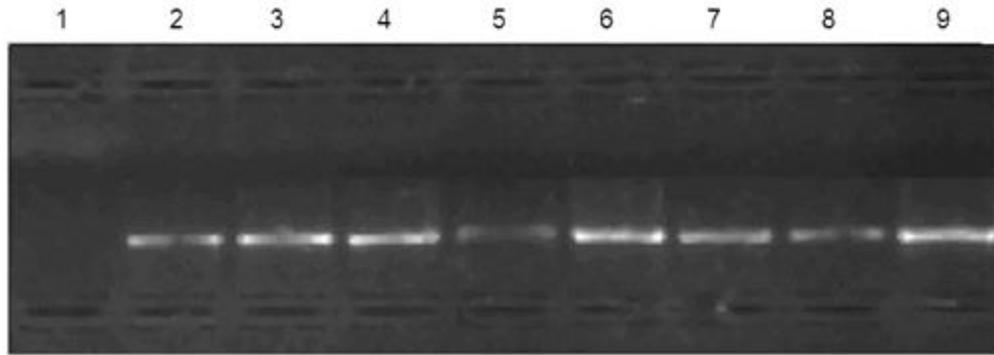


Figura 2. Análisis de productos de PCR (5ul/cada reacción) del exón 3 del gen *IRF6* en gel de agarosa al 1% teñido con GelStar®. Carril 1: control negativo sin DNA. Carriles 2 al 9 productos de PCR (tamaño 748pb) en 8 pacientes.

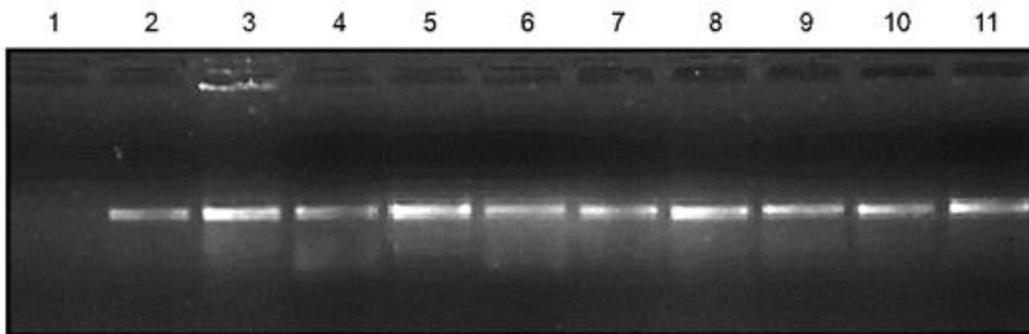


Figura 3. Análisis de productos de PCR (5ul/cada reacción) del exón 4 del gen *IRF6* en gel de agarosa al 1% teñido con GelStar®. Carril 1: control negativo sin DNA. Carriles 2 al 11 productos de PCR (tamaño 512pb) en 10 pacientes.

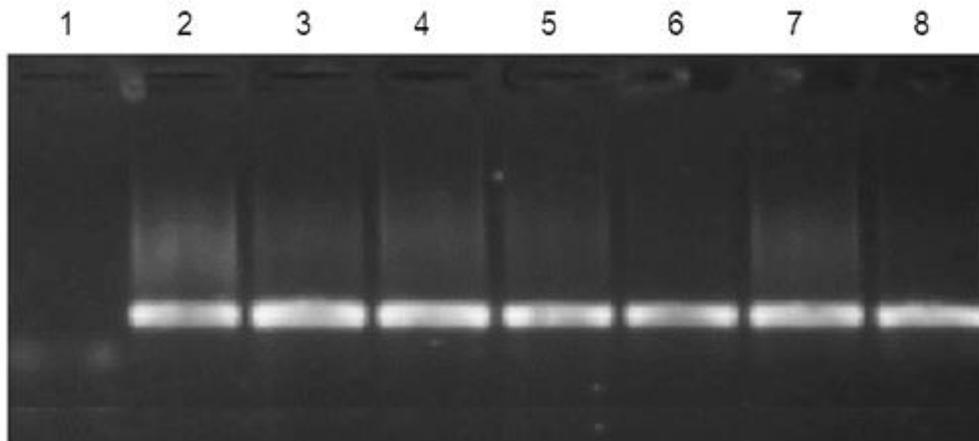


Figura 4. Análisis de productos de PCR (5ul/cada reacción) del exón 5 del gen *IRF6* en gel de agarosa al 1% teñido con GelStar®. Carril 1: control negativo sin DNA. Carriles 2 al 8 productos de PCR (tamaño 323pb) en 7 pacientes.

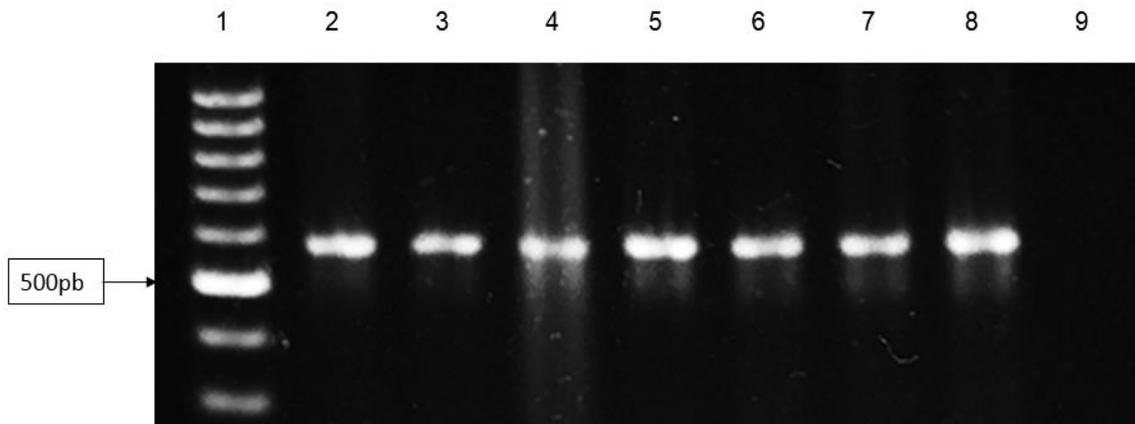


Figura 5. Análisis de productos de PCR (5ul/cada reacción) del exón 9 del gen *IRF6* en gel de agarosa al 1% teñido con GelStar®. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carriles 2 al 8 productos de PCR (tamaño 578pb) en 7 pacientes. Carril 9: control negativo sin DNA.

Los exones amplificados de las diferentes muestras de DNA fueron secuenciados mediante la técnica automatizada tipo Sanger. Para el exón 3 se obtuvieron 88 secuencias con la calidad adecuada y que cubrieron la totalidad del exón, para los exones 4, 5 y 9 se analizaron 85, 95 y 88 secuencias respectivamente. Se tiene contemplado realizar el análisis de estos exones en los pacientes que faltan para tener información completa en los 96 casos así como el estudio de los otros exones codificantes del gen *IRF6*, no analizados en el presente trabajo

En el análisis de las secuencias de los exones 3, 4, 5 y 9 no se identificaron variantes génicas patogénicas, pero se observaron dos variantes polimórficas, en los exones 4 y 5 del gen *IRF6*. Estas variantes se encuentran reportadas en la literatura y en la base de datos Database SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

La variante polimórfica rs7552506 (c.175-5C>G; p.=) localizada en el intrón 3, detectada en el análisis de las secuencias del exón 4 (Figura 6), mostró una frecuencia alélica para el alelo C de 0.30 y para el alelo G de 0.70, la distribución de genotipos de la población mostró estar en equilibrio de Hardy-Weinberg por la prueba exacta de Fisher ( $p=0.6$ ) (tabla 1). Al comparar con las frecuencias alélicas reportadas en el Database SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) con cuatro diferentes poblaciones, mediante la prueba de Ji cuadrada, no se observó una diferencia estadísticamente significativa (tabla 2). Las frecuencias de estos cuatro grupos geográficos pertenecen al proyecto de los 1000 genomas, los cuales son individuos sin ninguna enfermedad y mayores de 18 años.

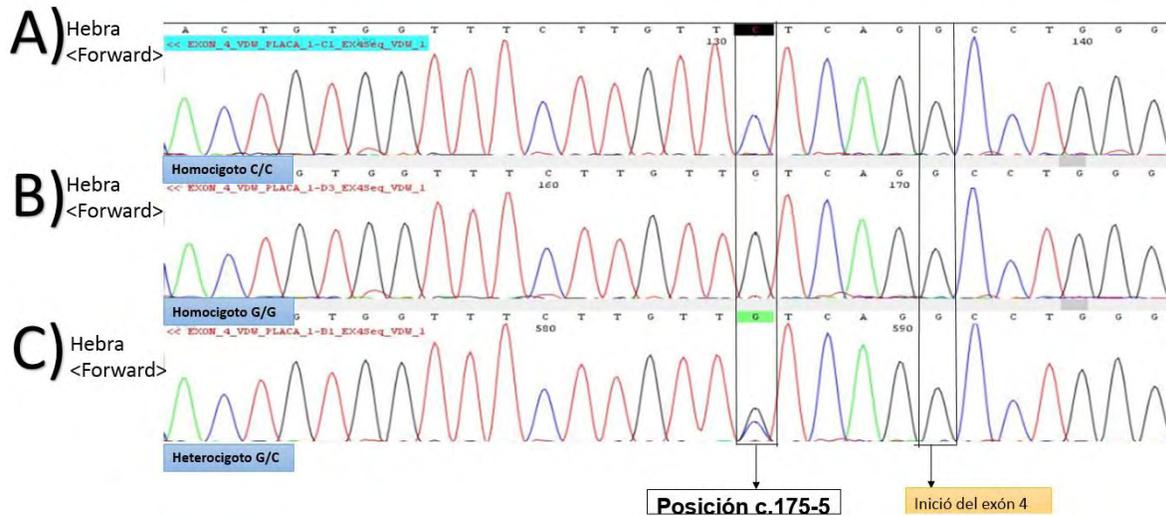


Figura 6. Electroferogramas parciales de la hebra sentido o forward del exón 4 en donde se muestran los diferentes genotipos de la variante rs7552506 en la posición c.175-5. A) homocigoto C/C. B) homocigoto G/G. C) heterocigoto G/C. Esta variante se describe como un polimorfismo intrónico, registrado en SNP database (NM\_006147.3:c.175-5C>G, NP\_006138.1: p.=).

Tabla 1. Frecuencia genotípica y alélica de la variante rs7552506 (n=85) (NM_006147.3:c.175-5C>G, NP_006138.1: p.=)				
CC	CG	GG	Frecuencia C	Frecuencia G
6	39	40	0.30	0.70

Tabla 1. Distribución de genotipos para la variante rs7552506 en la población analizada y frecuencia alélica calculada.

Tabla 2. Comparación de las frecuencias alélicas en diferentes poblaciones de la variante rs7552506 (NM_006147.3:c.175-5C>G, NP_006138.1: p.=)						
Alelos	total	C	Fr. alélica	G	Fr. alélica	Valor de p, Ji <sup>2</sup>
<b>Nuestra población</b>	170	51	0.30	119	0.70	
<b>Mexicanos de Los Ángeles</b>	100	33	0.33	67	0.67	0.6071
<b>Europeos</b>	1006	352	0.35	654	0.65	0.2048
<b>Africanos</b>	1322	317	0.24	1005	0.76	0.0865
<b>Sur de Asia</b>	978	327	0.33	651	0.67	0.3790

Tabla 2. Comparación de las frecuencias alélicas de la variante rs7552506 en diferentes poblaciones. Valores de p calculados mediante la prueba de Ji cuadrada, obtenidos con GraphPad online Software (<http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>).

En el análisis de las secuencias del exón 5 se observó la variante sinónima rs2013162 (c.459G>T; pSer153=) (Figura 7), con una frecuencia alélica para el alelo G de 0.42 y para el T de 0.58. La distribución de genotipos mostró estar en equilibrio de Hardy-Weinberg por la prueba exacta de Fisher (p= 0.09) (tabla 3). Al comparar

con las frecuencias alélicas reportadas en el SNP Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) de otras poblaciones (tabla 4) se observaron diferencias estadísticamente significativas con las reportadas en poblaciones de Europa, África y el sureste Asiático. Las frecuencias de estos cuatro grupos geográficos pertenecen al proyecto de los 1000 genomas, los cuales son individuos sin ninguna enfermedad y mayores de 18 años.

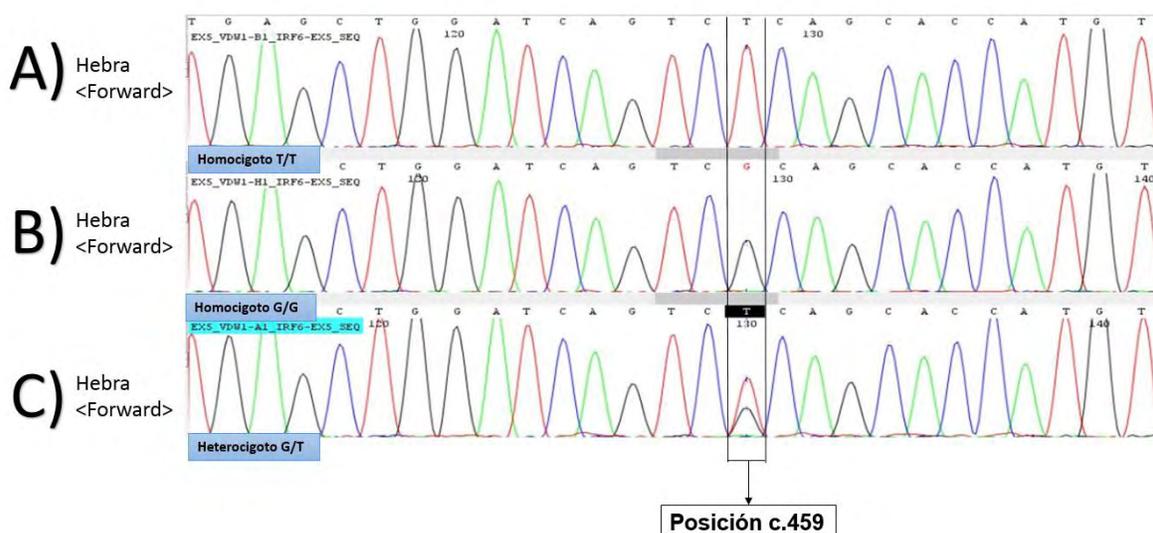


Figura 7. Electroferogramas parciales de la hebra sentido o forward del exón 5. Se muestran los diferentes genotipos de la variante rs2013162. A) homocigoto T/T. B) homocigoto G/G. C) heterocigoto T/G. Esta variante se describe como un polimorfismo, registrado en SNP database (NM\_006147.3:c.459G>T, NP\_006138.1: p.Ser153=). Es una variante sinónima, sin ningún efecto a nivel de proteína debido a que el cambio ocurre en la tercera posición del codón para Serina (TCG a TCT).

Tabla 3. Frecuencia genotípica y alélica de la variante rs2013162 (n=95) (NM_006147.3:c.459G>T, NP_006138.1: p.Ser153=)				
GG	GT	TT	Frecuencia G	Frecuencia T
12	55	28	0.42	0.58

Tabla 3. Distribución de genotipos para la variante rs2013162 en la población analizada y frecuencia alélica calculada.

Tabla 4. Comparación de las frecuencias alélicas en diferentes poblaciones de la variante rs2013162 (NM_006147.3:c.459G>T, NP_006138.1: p.Ser153=)						
Alelos	total	G	Fr. alélica	T	Fr. alélica	Valor de p, Ji <sup>2</sup>
<b>Nuestra población</b>	190	79	0.42	111	0.58	
<b>Mexicanos de Los Ángeles</b>	100	51	0.51	49	0.49	0.1673
<b>Europeos</b>	1006	643	<b>0.64</b>	363	<b>0.36</b>	<b>0.0001</b>
<b>Africanos</b>	1322	1001	<b>0.76</b>	321	<b>0.24</b>	<b>0.0001</b>
<b>Sur de Asia</b>	978	557	<b>0.57</b>	421	<b>0.43</b>	<b>0.0001</b>

Tabla 4. Comparación de frecuencias alélicas de la variante rs2013162 en diferentes poblaciones. Valores de p calculados mediante la prueba de Ji cuadrada, obtenidos con GraphPad online Software (<http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>). Los valores de p marcados en rojo tienen diferencias en las frecuencias alélicas con respecto a nuestro estudio.

## **18. DISCUSIÓN**

### **A. RESULTADOS CLÍNICOS.**

El presente estudio se realizó en 96 pacientes diagnosticados con LPH no sindromático que acudieron a la consulta de Genética en el Instituto Nacional de Pediatría. Los pacientes que se incluyeron tenían una somatometría y desarrollo psicomotor esperado para la edad.

El 70.2% de los pacientes fueron masculinos y 29.8%, femeninos, estas proporciones son similares a lo reportado en la literatura en donde se ha establecido una predominancia de afectados varones con una proporción de 2:1 (Jones 2006; Mossey 2009, Gorlin 2010).

Dentro de los antecedentes familiares, el 61% de pacientes fueron casos únicos, mientras que 7% refirieron un familiar afectado en primer grado y 14.5% en segundo grado. La presencia de antecedentes heredo familiares de LPH en nuestros pacientes está acorde a la forma de herencia multifactorial del LPH no sindromático en donde se observa agregación familiar sin que sea un patrón que sugiera una herencia mendeliana (Thompson, 2008).

La edad promedio fue de 6.26 años con una desviación estándar de 4.27. Esta variación se debe a que los pacientes fueron incluidos en este trabajo durante su seguimiento o manejo por los servicios de consulta externa de Genética, Ortodoncia, Cirugía Plástica y Foniatría, en donde se atienden individuos de recién ingreso así como con varios años de seguimiento.

Respecto a la lateralidad del defecto, se observó afección unilateral izquierda en 39% de los casos, unilateral derecha en el 27% y bilateral en el 34%. Estos porcentajes son similares a lo que se reporta en la literatura, donde se refiere que el LPH unilateral izquierdo es la forma más común al presentarse en el 40-55%. (Jones 2006, Gorlin 2010).

### **B. RESULTADOS MOLECULARES.**

En el presente trabajo sólo se analizaron 88 secuencias del exón 3, mientras que para los exones 4, 5 y 9 se analizaron 85, 95 y 88 secuencias respectivamente, al contar con la calidad adecuada y al cubrir la totalidad del exón, sin embargo se tiene pendiente realizar el análisis de los exones faltantes para tener información completa en los 96 casos.

Se ha reportado que del 0.4 al 3.7% de casos considerados como LPH no sindromático son en realidad pacientes con SVW por lo que es importante realizar el estudio molecular del gen *IRF6* (Jehee 2009, Desmyter 2010, Leslie 2015); sin embargo, en nuestro trabajo no se observaron variantes patológicas en los

pacientes mexicanos analizados. Lo anterior puede deberse a que no se analizaron todos los exones del gen *IRF6*, en particular el exón 7, en donde en estudios similares al presente han identificado tres pacientes con una variante patogénica, lo que corresponde al 21.4% de las mutaciones observadas (3/14) (tabla 5), por lo anterior, se tiene planeado completar el análisis molecular en todos nuestros pacientes para de acuerdo a ello definir con certeza si hay casos de LPH aislado que en realidad son SVW.

Otra explicación por la que no observamos pacientes con SVW en el presente trabajo puede ser la variación étnica, dado que en otras poblaciones tampoco se han identificado variantes patogénicas en *IRF6* en pacientes diagnosticados con LPH aislado (Suecia y Malasia) (Pagelow et al; 2008. Zuccherro et al; 2004).

Otro factor que podría modificar la identificación de mutaciones en *IRF6* son los criterios de inclusión en los diferentes estudios, como el contar con antecedentes familiares con LPH. En los tres reportes descritos en la literatura con mutación caracterizada en *IRF6*, 6 de los 14 individuos identificados con SVW contaban con antecedente de LPH en un familiar de primer grado (42.8%) (tabla 5), cifra que es mayor a la de los casos en este estudio en donde sólo 7 de 96 pacientes tenían el antecedente de un padre o hermano afectado. Lo anterior, apoya lo mencionado por Leslie y cols. en el 2015 con relación a que la presencia de antecedentes heredofamiliares de LPH con un patrón de herencia autosómico dominante, es un dato que puede ser útil para seleccionar a casos con LPH no sindromático en donde debe descartarse la presencia de mutaciones en *IRF6*.

Otra posible causa por la que no se observaron mutaciones en *IRF6*, puede ser el hecho de que todos nuestros pacientes fueron valorados clínicamente por un genetista (Dra. Ariadna E. González del Ángel o Dra. Bernardette Estandia Ortega), quienes están capacitadas para realizar una exploración minuciosa y hacer un adecuado diagnóstico diferencial entre LPH no sindromático vs SVW, al buscar dirigidamente datos de expresión mínima de este último. En los tres reportes de literatura donde identificaron casos con SVW no se menciona al profesional que determinó que sus casos eran LPH no sindromático y es de llamar la atención que al revalorar a los pacientes que tuvieron mutación en *IRF6* en cinco de 14 (35.7%) identificaron depresiones irregulares en el labio inferior (Jehee 2009, Desmyter 2010, Leslie 2015), las cuales consideramos que no se descarta que podrían haber sido identificadas desde la valoración inicial.

Estudio Autor/año	Población	Región del gen <i>IRF6</i> analizada	Número de casos y % con mutación identificada	Características de las mutaciones encontradas				Correlación clínica
				Variante patogénica	Exón donde se localiza	Efecto a nivel de proteína	Descrita en literatura	
Jehee, 2009	108 familias de Brasil. LPH sin pits labiales con al menos dos familiares afectados.	Exones 3, 4 y 7.	4/108 3.7%	c.25C>T c.50A>C c.337G>C c.1060G>A	3 3 4 7	p.Arg9Trp p.Gln17Pro p.Val113Leu p.Asp354Asn	Si Si Si Si	Pit labial atípico NR NR Irregularidades en labio inferior
Desmyter, 2010	95 pacientes con LPH de diferentes etnias (Belgas, Holandeses, Ingleses, Suizos, Turcos, Españoles y Franceses).	Exones 2 al 8 y la parte codificante del 9.	3/95 3.15%	c.16C>T c.749G>A c.1199G>A	3 7 9	p.Arg6Cys p.Arg250Gln p.Arg400Gln	Si Si Si	Depresiones en labio inf. Depresiones en labio inf. Un pit central en labio inf. Los tres casos con antecedentes
Leslie, 2015	1521 tríos (probando con LPH y ambos padres). Estudio realizado en EUA con individuos de diferente origen étnico (China, Turquía, España, Filipinas, Dinamarca, Guatemala).	Exones 1 al 8 y parte codificante del exón 9.	7/1521 0.4%	c.39G>A  c.165delC c.379delG c.250C>T c.254G>T c.1060+1G>T c.1289_1297del	3  4 4 4 7 9	p.Trp13X  p.Ile56Phefs*7 p.Gly127Valfs*43 p.Arg84Cys p.Cys85Phe [p.? p.Asp430_Ile423del	Si  Si Si Si Si Si	Caso familiar, padre con pits labiales Caso de novo Caso de novo Caso de novo Caso familiar Caso de novo Caso familiar
Zucchero, 2004	160 pacientes de Malasia con LPH.	Los 9 exones y regiones 3' y 5' del gen (23 Kb).	No se reportaron variantes patogénicas.					
Pegelow, 2008	17 familias suecas con LPH.	Los 9 exones y los extremos UTR 3' y 5'.	No se reportaron variantes patogénicas.					

Tabla 5. Comparación entre los diferentes estudios de LPH no sindromático con análisis del gen *IRF6* responsable de SVW. Se muestra el porcentaje de casos identificados con variantes génicas patológicas así como su correlación clínica. (NR: no referido)

En los pacientes analizados se identificaron 2 variantes polimórficas previamente descritas en la literatura. La primera c.175-5C>G, (p.=), localizada en el intrón 3, es una variante puntual sin efecto sobre la traducción a proteína la cual se encuentra reportada como no patogénica en la base de datos dbSNP con el número rs7552506 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=7552506](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=7552506)). En nuestra muestra se obtuvo una frecuencia alélica para el alelo C de 0.30 y para G de 0.70. Al compararla con las reportadas para esta variante en otras poblaciones como descendientes de mexicanos residentes en Los Ángeles, Estados Unidos, Europeos, Africanos y Asiáticos del Sur, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al tener frecuencias alélicas similares (0.24 a 0.35 para el alelo C). Lo anterior sugiere que la muestra analizada en este trabajo es representativa de nuestra población, a pesar de ser relativamente pequeña en comparación con las de las otras poblaciones (n=170 alelos en nuestro estudio vs n=1006 alelos Europeos, n=1322 alelos Africanos y n=978 alelos del Sur de Asia) (tabla 2).

Hasta donde sabemos, esta variante rs7552506 ha sido analizada en sólo dos estudios para conocer la participación de polimorfismos en genes candidatos en pacientes con LPH aislado; el primero incluyó a 17 familias Suecas (105 individuos) y la variante se observó en 23 pacientes, por lo que se postuló que pudiera estar asociada a la malformación; sin embargo, los autores mencionan que se requerían más estudios para definir su participación en el desarrollo de LPH ya que no se analizaron controles sanos ni se observó una asociación estadísticamente significativa (Pegelow, 2008). El segundo análisis fue realizado en 8 familias Polacas en las cuales se identificó en 5 de ellas, pero formando un haplotipo con los polimorfismos rs2013162 y rs2235375, lo cual fue observado en otros miembros de las familias sanos; lo que también indica que esta variante no está asociada a la presencia de LPH (Charzewska, 2015). Aunque el presente trabajo no tenía como objetivo definir la participación de polimorfismos de *IRF6* en el desarrollo de LPH no sindromático, el encontrar frecuencias alélicas similares de esta variante en los pacientes analizados con LPH en nuestro estudio y la población mexicana originaria de Los Ángeles considerada como sana, es un dato que también apoya que la variante rs7552506 no está asociada a LPH aislado.

La segunda variante identificada fue c.459G>T;(p.Ser153=), con efecto sinónimo a nivel de la proteína, la cual se localiza en el exón 5. Este polimorfismo se ha reportado en la base de datos dbSNP con el número rs2013162 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=2013162](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2013162)). En nuestro estudio se encontró con una frecuencia para el alelo G de 0.42 y para el T de 0.58. Al comparar las frecuencias alélicas con lo reportado en población de ascendencia Mexicana residentes de Los Ángeles, Estados Unidos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, lo cual podría ser esperado al ser grupos que aparentemente comparten ascendencia similar; sin embargo difieren significativamente de lo reportado en poblaciones de origen Africano (0.76 para el alelo G), Europeo (0.64 para el alelo G) y del sur de Asia (0.57 para el alelo G),

estas discrepancias pueden deberse a que son grupos étnicamente diferentes lo que se sustenta al observar valores de  $p$  de la prueba de  $J_i$  muy pequeños ( $p=0.0001$ ). Otra explicación, es el hecho de que nuestra muestra es de menor tamaño (tabla 4), pero lo consideramos menos probable al observar que nuestra muestra y la proveniente de mexicanos de Los Ángeles en EUA tienen frecuencias alélicas parecidas, con un tamaño de población similar, por lo que si fueran muestras pequeñas, que no son representativas de la población, estadísticamente tenderían más a mostrar diferencias entre ellas (Relethford, 2012).

La asociación de este polimorfismo rs2013162 con LPH no sindromático se ha reportado previamente en población del noreste de China ( $p<0.0001$ ) (Lu, 2014); sin embargo en otras poblaciones no se ha identificado esto (Maryland, EUA, Corea y Polonia) (Park, 2007; Charzewska, 2015). En Taiwán y Singapur, encuentran asociación pero al formar un haplotipo con el polimorfismo rs2235371 ( $p=0.0002$  y  $p=0.014$  respectivamente). En oeste de China esta variante no se encontró asociada de manera independiente a LPH, pero si al conformar un haplotipo con rs2235375 y rs2235371 ( $p=0.0013$ ) (Huang, 2009). Los datos anteriores sugieren que la variante rs2013162 se asocia a la presencia de LPH no sindromático al conformar un haplotipo con el polimorfismo rs2235371 (p.Val274Ile) que se ha reportado que está en perfecto desequilibrio de ligamiento con la variante funcional rs642961 localizada en el enhancer de *IRF6* y que elimina el sitio de unión del factor de transcripción AP2 alfa (Rakhimov, 2008), el cual normalmente fomenta la expresión de *IRF6* en los queratinocitos anteriores del estomodeo estimulando su proliferación celular y con ello el cierre de los procesos palatinos anteriores (Rakhimov, 2008). Para determinar si la variante rs2013162 se encuentra asociada al desarrollo de LPH aislado, podríamos determinar en un futuro si se encuentra en desequilibrio de ligamiento con la variante rs2235371 la cual previamente identificamos asociada a LPH aislado en esta misma muestra de pacientes (Velázquez, 2012).

Para definir con certeza si tenemos casos de SVW en nuestra población diagnosticada como LPH no sindromático, se completará el análisis de todo el gen *IRF6*, lo cual es relevante para ofrecer un diagnóstico certero y determinar si en estudios de asociación de polimorfismos en genes candidato y LPH aislado, realizados previamente por nuestro grupo, se incluyeron casos con SVW que pudieran haber generado sesgo en los resultados así como para establecer los criterios para seleccionar a casos con LPH no sindromático en donde debe descartarse la presencia de mutaciones en *IRF6*, como lo mencionado en literatura, con relación a la presencia de antecedentes de LPH en familiares.

## 19. CONCLUSIONES

- En el presente estudio se observó una proporción de individuos del sexo masculino vs femenino cercana a 2:1, semejante a lo descrito en literatura.
- De los 96 pacientes incluidos, el 61% eran casos únicos y el 39% con antecedentes familiares, lo cual está acorde con la herencia multifactorial del LPH no sindromático en donde se observa agregación familiar sin un patrón sugerente de herencia mendeliana.
- La mayoría de los casos presentaron la hendidura facial de manera unilateral izquierda (39%), acorde a lo referido en la literatura.
- En nuestro estudio no se identificaron variantes patogénicas al analizar los exones 3, 4, 5 y 9 del gen *IRF6*, se tiene pendiente realizar el análisis de los exones faltantes para tener información completa en los 96 casos y determinar con certeza si hay pacientes con SVW en nuestra población con diagnóstico de LPH aislado.
- Dentro de las posibles explicaciones por las que no observamos pacientes con SVW se encuentran: la variación étnica, los criterios de inclusión en los diferentes estudios o el hecho de que todos nuestros pacientes fueron valorados clínicamente por un genetista, capacitado para buscar dirigidamente datos de expresión mínima de SVW al evaluar casos con LPH.
- Se identificaron 2 variantes no patogénicas previamente descritas en la literatura, una intrónica y otra sinónima.
- El polimorfismo, c.175-5C>G, p.= mostró frecuencias alélicas parecidas a las reportadas en otras poblaciones.
- La variante c.175-5C>G en nuestros casos con LPH mostró frecuencias alélicas similares a lo observado en individuos mexicanos de Los Ángeles sanos, dato que apoya que es un polimorfismo no asociado al desarrollo de LPH aislado.
- El polimorfismo, c.459G>T (rs2013162) en nuestra población, presentó una frecuencia alélica semejante a lo reportado en población Mexicana residente de Estados Unidos, lo cual podría ser esperado al ser poblaciones que aparentemente comparten ascendencia similar.
- Para determinar si la variante rs2013162 se encuentra asociada al desarrollo de LPH aislado, podríamos determinar en un futuro si se encuentra en desequilibrio de ligamiento, como está descrito en la literatura, con la variante rs2235371 la cual previamente identificamos asociada a LPH aislado en esta misma muestra de pacientes.

## 20. BIBLIOGRAFÍA

1. Jones M. (2006). Lips. En R. Stevenson, & J. Hall, *Human Malformations and Related Anomalies* (Vol. 2, págs. 391-404). Oxford University Press.
2. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, *et al.* (2011) Cleft lip and palate: Understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet* 12:167–178.
3. Stainer P and Moore G (2004) Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Human Mol Genet* 13 (1): R73-R81.
4. Gorlin RJ, Cohen MM, Hennekam RCM: *Syndromes of the Head and Neck*, ed. 4 Oxford University Press, New York, 2001.
5. Schutte BC, Sander A, Malik M *et al.* (1996) Refinement of the Van der Woude gene location and construction of a 3.5- Mb YAC contig and STS map spanning the critical region in 1q32-q41 *Genomics*, 36 (3): 507–514.
6. Burdick AB, Bixler D and Puckett CI (1985) “Genetic analysis in families with Van Der Woude syndrome *J Craniofac Genet Dev Biol* 5(2):181–208.
7. van der Woude (1954) Fistula labii inferioris congenita and its association with cleft lip and palate *Am J Hum Genet* 6(2): 244–256.
8. Brito LA, Castro Meira JG, Kobayashi GS *et al.* (2012) Genetics and Management of the Patient with Orofacial Cleft *Plast Surg Int* doi: 10.1155/2012/782821.
9. Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ *et al.* (2002) Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes *Nature Genetics* 32(2): 285–289.
10. De Lima RL, Hoper S *et al.* (2009) Prevalence and non-random distribution of exonic mutations in Interferon Regulatory Factor 6 (*IRF6*) in 307 families with Van der Woude syndrome and 37 families with popliteal pterygium syndrome *Genet. Med.* 11(4): 241-247
11. Klein O, Oberoi S *et al.* (2013) Developmental disorders of the dentition: an update *Am. J. Med. Genet.* 163C: 318-332
12. Blanton SH, Cortez A, Stal S, *et al.* (2005) Variation in *IRF6* contributes to nonsyndromic cleft lip and palate *Am. J. Med. Genet* 137A(3): 259–62.
13. Jehee FS, Burin BA, Rocha KM *et al* (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* 149(6): 1319–1322.
14. Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS *et al* (2004) Interferon regulatory factor 6 (*IRF6*) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate *N Engl J Med* 351(8): 769–780.
15. Pegelow M, Peyrard-Janvid M, Zucchelli M *et al.* (2008) Familial non-syndromic cleft lip and palate—analysis of the *IRF6* gene and clinical phenotypes *Eur J Orthod* 30:169–175.

16. Jones JLP, Canady JW, Brookes JT *et al.* (2010) Wound complications after cleft repair in children with Van der Woude syndrome J Craniofac Surgery 21(5):1350–1353.
17. Ghassibé M, Revencu N, Bayet B *et al.* (2004) Six families with van der Woude and/or popliteal pterygium syndrome: all with a mutation in the *IRF6* gene J Med Genet 41(2):e15.
18. Desmyter L, Ghassibe M, Revencu N *et al.* (2010) *IRF6* Screening of Syndromic and a priori Non-Syndromic Cleft Lip and Palate Patients: Identification of a New Type of Minor VWS Sign Mol Syndromol 1:67–74.
19. Quade D, Lachenbruch P, Whaley P *et al.* (1980) Effect of misclassifications in statistical inferences in epidemiology Am. J. Epidemiol. 111(5): 503-515.
20. Velázquez-Aragón JA, Alcántara-Ortigoza MA, Estandia-Ortega B, *et al.* (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.
21. Estandia-Ortega B, Velázquez-Aragón JA, Alcántara-Ortigoza MA, *et al.* (2014) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase single nucleotide polymorphisms and gene– environment interaction analysis in non-syndromic cleft lip/palate Eur J Oral Sci 122: 109–113
22. Lam AK, David DJ, Townsend GC, *et al.* (2010) Van der Woude syndrome: dentofacial features and implications for clinical practice Aust Dent J 55: 51–58.
23. Jobling-Rebkah, Ferrier-Reachel, Thomas-Mary Ann, *et al.* (2011) Monozygotic Twins with Variable Expression of Van der Woude Syndrome. Am J Med Genet A. 155(8). 2008-10.
24. Leslie E.J, Koboldt D.C., Marazita M.L. *et al.* (2016). *IRF6* mutation screening in non-syndromic orofacial clefting: analysis of 1521 families. Clin Genet. Jul;90(1):28-34.
25. Fitzpatrick DR, Denhez F, Akhurst RJ, *et al.* (1990) Differential expression of TGF beta isoforms in murine palatogenesis. Development;109:585–95
26. Brivanlou AH, Darnell J, *et al.* (2002). Signal transduction and the control of gene expression. Science;295:813–8.
27. Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, *et al.* (2001) IRF family of transcription factors as regulators of host defense. Annu Rev Immunol;19:623–55.
28. Takaoka A, Yanai H, Taniguchi T, *et al.* (2005) Integral role of *IRF6* in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. Nature; 434:243–9.
29. Ingraham CR, Kinoshita A, Kondo S, *et al.* (2006). Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (*Irf6*). Nat Genet; 38:1335–40.
30. Richardson RJ, Dixon J, Dixon MJ, *et al.* (2006). *Irf6* is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch. Nat Genet; 38:1329–34.

31. Kondo S, Schutte BC, Murray JC, *et al.* (2002). Mutations in *IRF6* cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet*; 32:285–9.
32. Pegelow M, Peyrard-Janvid M, Karsten A. *et al.* (2008). Familial non-syndromic cleft lip and palate--analysis of the *IRF6* gene and clinical phenotypes. *Eur J Orthod*. Apr; 30(2):169-75.
33. Charzewska A, Obersztyn E, Bal. J, *et al.* (2015). Novel Mutations in the *IRF6* Gene on the Background of Known Polymorphisms in Polish Patients With Orofacial Clefting. *Cleft Palate Craniofac J*. Sep; 52(5): e161-7.
34. Lu Y, Liu Q, Li J, *et al.* (2013) *TGFA* and *IRF6* contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in northeast China. *PLoS One*. Aug 6;8(8): e70754.
35. Huang Y, Wu J, Shi B, *et al.* (2009). Association between *IRF6* SNPs and oral clefts in West China. *J Dent Res*. Aug; 88(8): 715-8.
36. Park JW, McIntosh I, Beaty TH, *et al.* (2007). Association between *IRF6* and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in four populations. *Genet Med*. Apr; 9(4): 219-27.
37. Rahimov F, Marazita ML, Murray JC, *et al.* (2008). Disruption of an AP-2alpha binding site in an *IRF6* enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet*. Nov; 40(11): 1341-7.
38. Relethford John H. Human population genetics. Ed 1. A John Wiley & Sons, inc. publication. 2012.

## 21. ANEXOS

### ANEXO #1 HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS CLINICOS Y ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES DE LPH/SVW

1. Nombre del paciente \_\_\_\_\_
2. Edad \_\_\_\_\_ 3. Género \_\_\_\_\_ 4. Expediente \_\_\_\_\_
5. Nombre de madre \_\_\_\_\_
6. Nombre del padre \_\_\_\_\_
7. Teléfono/celular \_\_\_\_\_
8. Dirección \_\_\_\_\_

#### ARBOL GENEALÓGICO: ANTECEDENTES FAMILIARES DE LPH/SVW

#### ANTECEDENTES PRENATALES (0=NO, 1=SI)

- ¿ La madre ingirió un suplemento de ácido fólico durante el embarazo Sí  NO
- ¿ En que periodo?
- a) Preconcepcional (3 meses antes del embarazo) \_\_\_\_\_
  - b) Periconcepcional (3m antes y primeros 3m del embarazo) \_\_\_\_\_
  - c) Postconcepcional (en los 3 primeros meses del embarazo) \_\_\_\_\_
- ¿ La madre fumó durante el primer trimestre del embarazo? Sí  NO
- ¿ La madre tomó alguna bebida alcohólica en el primer trimestre de embarazo? Sí  NO
- ¿ La madre tomó algún medicamento durante el primer trimestre del embarazo? Sí  NO

#### EXPLORACIÓN FÍSICA (0=NO, 1=SI)<sup>21</sup>

- PESO \_\_\_\_\_ (Pc \_\_\_\_\_)
- TALLA \_\_\_\_\_ (Pc \_\_\_\_\_)
- DESARROLLO PSICOMOTOR NORMAL Sí  NO
- PITS U HOYUELOS EN LABIO INFERIOR Sí  NO
- FISTULAS LABIALES Sí  NO
- LABIO HENDIDO Sí  NO

MICROFORMA LABIO HENDIDO	Sí <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
LABIO Y PALADAR HENDIDO (IZQUIERDO, DERECHO O CENTRAL)	<hr/>	
PALADAR HENDIDO SOLO	Sí <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
ÚVULA BIFIDA	Sí <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
PALADAR HENDIDO SUBMUCOSO	Sí <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
AUSENCIA DE DIENTES (HIPODONCIA)	Sí <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
OTRAS MALFORMACIONES	Sí <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
EN CASO POSITIVO DESCRIBIR CUÁLES	<hr/>	
<hr/>		

**ANEXO #2 CONSENTIMIENTO INFORMADO  
(CASO ÍNDICE menor 12 años) (otorgado por el padre o tutor)**

**TÍTULO: “PREVALENCIA DE MUTACIONES PATOGENICAS EN EL GEN *IRF6*  
RESPONSABLES DEL SÍNDROME DE VAN DER WOUDE EN PACIENTES  
MEXICANOS CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LABIO PALADAR HENDIDO NO  
SINDROMÁTICO”**

**¿Para qué se efectúa este estudio?**

Para conocer mejor la frecuencia del síndrome de Van der Woude de causa genética y poder distinguirlo de los casos labio paladar hendido no sindromático que pueden presentar características similares. Es probable que en el futuro los resultados puedan servir para un mejor diagnóstico y pronóstico del síndrome de Van der Woude.

**¿En qué consiste el estudio?**

Se tomará una muestra de 3 a 5 ml de sangre periférica para obtener el material genético (ADN) de su hijo (a), el cual determina sus características físicas y de éste se analizarán regiones de un gen que pueden estar implicadas en el padecimiento del Síndrome de Van der Woude. Se espera contar con la participación de al menos 200 pacientes para este estudio.

**¿Quiénes pueden participar en el estudio?**

Todos los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría que presenten labio paladar hendido no sindromático.

**¿Quiénes no podrán participar en el estudio?**

Aquellos pacientes que no cuenten con el diagnóstico de LPH no sindromático o que no deseen participar en el estudio.

**¿Qué se le pedirá a su hijo que haga?**

Se tomará una muestra de sangre periférica (3 a 5 ml), en una sola ocasión, por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como la utilización de guantes y material estéril y desechable.

**¿Quién sufragará los gastos del estudio?**

Ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación tendrán un costo para usted.

**¿Qué beneficio puede esperar mi hijo?**

El estudio permitirá establecer el diagnóstico de su hijo de manera más confiable, darle un mejor manejo y brindarle un asesoramiento genético más certero. La información obtenida durante el proyecto de investigación permitirá conocer mejor la frecuencia del síndrome de Van der Woude de causa genética y poder distinguirlo de los casos labio paladar hendido no sindromático ya que son enfermedades que pueden parecerse. Este estudio también será útil para saber si los familiares del paciente deberán ser estudiados o no.

### **¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas?**

Puede comunicarse con los investigadores responsables: Dr. José Antonio Velázquez Aragón y Dra. Bernardette Estandía Ortega. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 Ext. 1306. Presidente del Comité de Ética: Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica. Tel 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

### **¿Mi hijo puede negarse a participar en este estudio y se le puede pedir a mi hijo que abandone el estudio?**

La participación de su hijo (a) es total y absolutamente voluntaria, puede abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención de su hijo (a) en cualquier servicio de la Institución.

### **¿Quiénes van a tener información de los datos de mi hijo?**

Los datos personales de su hijo (a) en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartidos con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La información necesaria para el análisis de los resultados puede ser evaluada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, toda la información clínica e impresa de su hijo (a) recabada para el presente proyecto quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

### **¿Qué se va a hacer con las muestras biológicas (extracción de DNA) de mi hijo (a)?**

La muestra será codificada con una clave que no incluya su nombre y datos clínicos en su contenedor, la muestra no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La muestra sólo puede ser analizada y revisada por los médicos e investigadores del presente proyecto. Quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud. Esta muestra sólo podrá ser empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio de Síndrome de Van der Woude y del labio paladar hendido no sindromático, si usted así lo autoriza tras ser recontactado por los investigadores del INP, y de igual forma se mantendrá la confidencialidad de la información derivada de dichos estudios. La muestra de DNA será preservada por 10 años y en caso de no ser requerida para estudios futuros será destruida.

### **¿Puedo conocer los resultados del estudio?**

Sí, en cualquier momento los investigadores responsables del estudio podrán darle la información que usted solicite.

## **DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO**

Declaro, en forma libre y sin que nadie me presione, que permitiré que mi hijo (a) participe en este estudio. He leído cuidadosamente este formato, se me ha explicado en forma clara en qué consiste este estudio y mis preguntas han sido contestadas. Asimismo, entiendo que nuestra participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente, se me ha informado que si deseamos no participar no se verá afectada la atención médica brindada a mi hijo (a) dentro de la Institución y, que ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación tendrán un costo para mí.



### **ANEXO #3 ASENTIMIENTO INFORMADO (CASO ÍNDICE. 12 A 17 AÑOS)**

#### **TÍTULO: “PREVALENCIA DE MUTACIONES PATOGENICAS EN EL GEN *IRF6* RESPONSABLES DEL SÍNDROME DE VAN DER WOUDE EN PACIENTES MEXICANOS CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LABIO PALADAR HENDIDO NO SINDROMÁTICO”**

##### **¿Para qué se efectúa este estudio?**

Para conocer mejor la causa genética que origina tu enfermedad.

##### **¿En qué consiste el estudio?**

Se te tomará una muestra de 3 a 5 ml de sangre, y se estudiarán regiones de uno de tus genes que pueden estar relacionadas con tu enfermedad. Se espera contar con la participación de mínimo 200 niños como tú para este estudio.

##### **¿Quiénes pueden participar en el estudio?**

Todos los niños atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría que tengan labio paladar hendido no sindromático, o sea, sin ningún otro problema agregado.

##### **¿Quiénes no podrán participar en el estudio?**

Aquellos niños que no deseen participar en el estudio.

##### **¿Qué se te pedirá que hagas?**

Se te tomará una muestra de sangre (3 a 5 ml) por personas calificadas y bajo todas las medidas de seguridad, como el uso de guantes, material estéril y desechable.

##### **¿Quién pagará los gastos del estudio?**

Ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación tendrá un costo para ti o tu familia.

##### **¿Qué beneficio puedo esperar?**

El estudio permitirá que tu diagnóstico sea confiable, esto es importante porque permite que tu médico pueda darte un mejor manejo y tratamiento, también para que sepa si es necesario estudiar a más miembros de tu familia.

##### **¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas?**

Puedes comunicarte con los investigadores responsables: Dr. José Antonio Velázquez Aragón y la Dra. Bernardette Estandía Ortega. Así como también con la Dra. Matilde Ruiz García en caso de que tengas dudas sobre tus derechos.

##### **¿Puedo negarme a participar en este estudio y puedo abandonar el estudio?**

Tu participación es total y absolutamente voluntaria. Puedes decidir ya no participar en el estudio en cualquier momento, sin que esto afecte tu atención en los servicios de la Institución.

##### **¿Quiénes van a tener la información de mis datos?**

Tus datos personales en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con otras personas. La información necesaria para el análisis de los resultados puede ser evaluada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, toda la información recabada sobre ti para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave.

**¿Qué se va a hacer con la muestra de sangre que ya no ocupen?**

La muestra será codificada con una clave que no incluya tu nombre y otros datos en su contenedor, la muestra no será compartida con nadie si tú no lo permites. Quedará bajo el cuidado del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud. Tu muestra de DNA será preservada por 10 años y en caso de no ser requerida para estudios futuros será destruida, en caso de requerirse para estudios futuros serás re-contactado para consentir la utilización de dicha muestra.

**¿Puedo conocer los resultados del estudio?**

Si, en cualquier momento los investigadores responsables del estudio podrán darte la información que necesites.

**DECLARACIÓN DE ASENTIMIENTO**

Declaro, en forma libre y sin que nadie me presione, que participaré en este estudio. He leído cuidadosamente este formato, se me ha explicado en forma clara en qué consiste este estudio y mis preguntas han sido contestadas. Asimismo, entiendo que mi participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente se me ha informado que si no quiero participar en este estudio, no se verá afectará la atención médica brindada dentro de la Institución y, que ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación tendrán un costo para mí ni para mis familiares.

Atentamente

\_\_\_\_\_  
Nombre del paciente Fecha y Firma

\_\_\_\_\_  
Madre o tutor Firma Fecha

\_\_\_\_\_  
Padre o tutor Firma Fecha

—

\_\_\_\_\_  
Nombre del testigo Fecha y Firma

\_\_\_\_\_  
Nombre del testigo Fecha y Firma

Obtuvo el asentimiento: \_\_\_\_\_  
Nombre Fecha

Recibí copia de este asentimiento \_\_\_\_\_  
Nombre y firma Fecha

Investigadores responsables: Dr. José Antonio Velázquez Aragón y Dra. Bernardette Estandía Ortega. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 Ext. 1306

Presidente del Comité de Ética: Dra. Matilde Ruíz García. Servicio de Neurología Pediátrica. Tel 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

**Nota:** En caso de obtener poco material genético al tomar la muestra de sangre o de requerir futuros estudios se le recontactará por los investigadores responsables del proyecto para solicitarle una nueva toma de muestra o en caso de que se realicen nuevas investigaciones con relación al Labio Paladar Hendido Aislado o al Síndrome de Van der Woude se le recontactará para invitarlo a participar y en caso de aceptar, firme una nueva carta de consentimiento informado

**ANEXO #4 CONSENTIMIENTO INFORMADO  
(FAMILIARES MENORES DE 12 AÑOS OTORGADO POR EL PADRE O  
TUTOR)**

**TÍTULO: “PREVALENCIA DE MUTACIONES PATOGENICAS EN EL GEN *IRF6*  
RESPONSABLES DEL SÍNDROME DE VAN DER WOUDE EN PACIENTES  
MEXICANOS CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LABIO PALADAR HENDIDO NO  
SINDROMATICO”**

**¿Para qué se efectúa este estudio?**

Para conocer mejor la frecuencia del síndrome de Van der Woude de causa genética y poder distinguirlo de los casos labio paladar hendido no sindromático que pueden presentar características similares. Es probable que en el futuro los resultados puedan servir para un mejor diagnóstico y pronóstico del síndrome de Van der Woude.

**¿En qué consiste el estudio?**

Se tomará una muestra de 3 a 5 ml de sangre periférica para obtener el material genético (ADN) de si hijo (a), el cual determina sus características físicas y de éste se analizarán regiones en un gen que pueden estar implicadas en el padecimiento del Síndrome de Van der Woude. Se espera contar con la participación de al menos 200 pacientes para este estudio y en algunos casos será necesaria la participación de los familiares del paciente.

**¿Quiénes pueden participar en el estudio?**

Todos los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría que presenten labio paladar hendido no sindromático y sus familiares.

**¿Quiénes no podrán participar en el estudio?**

Lo familiares de aquellos pacientes que no deseen participar en el estudio.

**¿Qué se le pedirá a usted que haga?**

Se le tomará a su hijo (a) una muestra de sangre periférica (3 a 5 ml), en una sola ocasión, por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como la utilización de equipo estéril y desechable, y el uso de guantes.

**¿Quién sufragará los gastos del estudio?**

Ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación tendrá un costo para usted.

**¿Qué beneficio tiene este estudio?**

El estudio permitirá establecer el diagnóstico en la familia de manera más confiable, dar un mejor manejo y brindar un asesoramiento genético más certero. La información obtenida durante el proyecto de investigación permitirá conocer mejor la frecuencia del síndrome de Van der Woude de causa genética y poder distinguirlo de los casos labio paladar hendido no sindromático ya que son enfermedades que pueden parecerse.

**¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas?**

Puede comunicarse con los investigadores responsables: Dr. José Antonio Velázquez Aragón y Dra. Bernardette Estandía Ortega. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 Ext. 1306  
Presidente del Comité de Ética: Dra. Matilde Ruíz García. Servicio de Neurología Pediátrica. Tel 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

**¿Me puedo negar a la participación de mi hijo (a) en este estudio?**

La participación de usted es total y absolutamente voluntaria, pueden abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención de su familiar en los servicios de la Institución.

**¿Quiénes van a tener información de los datos de mi hijo (a)?**

Los datos personales contenidos en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La información necesaria para el análisis de los resultados puede ser evaluada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, toda la información clínica e impresa de usted recabada para el presente proyecto quedará resguardada bajo llave y, los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

**¿Qué se va a hacer con las muestras biológicas (extracción de DNA) de mi hijo (a)?**

La muestra será codificada con una clave que no incluya nombre y datos clínicos en su contenedor, la muestra no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La muestra podrá ser analizada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente proyecto. Quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud. Esta muestra sólo podrá ser empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio de Síndrome de Van der Woude y del labio paladar hendido no sindromático, si usted así lo autoriza tras ser re-contactado por los investigadores del INP, y de igual forma se mantendrá la confidencialidad de la información derivada de dichos estudios. La muestra de DNA será preservada por 10 años y en caso de no ser requerida para estudios futuros será destruida.

**¿Puedo conocer los resultados del estudio?**

Si, en cualquier momento los investigadores responsables del estudio le podrán dar la información que usted requiera.

**DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO**

Declaro, en forma libre y sin que nadie me presione, que mi hijo participará en este estudio. He leído cuidadosamente este formato, se me ha explicado en forma clara en qué consiste este estudio y mis preguntas han sido contestadas. Asimismo, entiendo que nuestra participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente, se me ha informado que si deseamos no participar, ello no repercutirá en la atención médica brindada a mi familiar dentro de la Institución y que ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación, tendrán un costo para mí.

Atentamente

---

Madre o tutor	Firma	Fecha
---------------	-------	-------

---

Padre o tutor	Firma	Fecha
---------------	-------	-------

Nombre del paciente \_\_\_\_\_

---

Nombre del testigo	Dirección	Fecha y Firma
--------------------	-----------	---------------

---

Nombre del testigo	Dirección	Fecha y Firma
--------------------	-----------	---------------

Obtuvo el consentimiento: \_\_\_\_\_

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

Recibí copia de este consentimiento \_\_\_\_\_

Nombre y firma	Fecha
----------------	-------

Investigadores responsables: Dr. José Antonio Velázquez Aragón y Dra. Bernardette Estandia Ortega. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 Ext. 1306

Presidente del Comité de Ética: Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica. Tel 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

**Nota:** En caso de obtener poco material genético al tomar la muestra de sangre o de requerir futuros estudios se le recontactará por los investigadores responsables del proyecto para solicitarle una nueva toma de muestra o en caso de que se realicen nuevas investigaciones con relación al Labio Paladar Hendido Aislado o al Síndrome de Van der Woude se le recontactará para invitarlo a participar y en caso de aceptar, firme una nueva carta de consentimiento informado

## **ANEXO #5 ASENTIMIENTO INFORMADO (FAMILIARES 12 A 17 AÑOS)**

### **TÍTULO: “PREVALENCIA DE MUTACIONES PATOGENICAS EN EL GEN *IRF6* RESPONSABLES DEL SÍNDROME DE VAN DER WOUDE EN PACIENTES MEXICANOS CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LABIO PALADAR HENDIDO NO SINDROMÁTICO”**

#### **¿Para qué se efectúa este estudio?**

Para conocer mejor la causa genética que origina la enfermedad en tu familiar.

#### **¿En qué consiste el estudio?**

Se te tomará una muestra de 3 a 5 ml de sangre, y se estudiarán regiones de uno de tus genes que pueden estar relacionadas con la enfermedad de tu familiar. Se espera contar con la participación de los miembros de tu familia para este estudio.

#### **¿Quiénes pueden participar en el estudio?**

Todos los niños atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría que tengan labio paladar hendido no sindromático, o sea, sin ningún otro problema agregado y sus familiares, por eso es que te invitamos a participar.

#### **¿Quiénes no podrán participar en el estudio?**

Aquellos niños que no deseen participar en el estudio.

#### **¿Qué se te pedirá que hagas?**

Se te tomará una muestra de sangre (3 a 5 ml) por personas calificadas y bajo todas las medidas de seguridad, como el uso de guantes, material estéril y desechable.

#### **¿Quién pagará los gastos del estudio?**

Ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación tendrá un costo para ti o tu familia.

#### **¿Qué beneficio puedo esperar?**

El estudio permitirá que tu diagnóstico de tu familiar y probablemente de otros miembros de tu familia sea confiable, esto es importante porque permite que el médico pueda dar un mejor manejo y tratamiento a toda la familia y también para que sepa si es necesario estudiar a más miembros de tu familia.

#### **¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas?**

Puedes comunicarte con los investigadores responsables: Dr. José Antonio Velázquez Aragón y la Dra. Bernardette Estandía Ortega. Así como también con la Dra. Matilde Ruiz García en caso de que tengas dudas sobre tus derechos.

#### **¿Puedo negarme a participar en este estudio y puedo abandonar el estudio?**

Tu participación es total y absolutamente voluntaria. Puedes decidir ya no participar en el estudio en cualquier momento, sin que esto afecte la atención de tu familiar en los servicios de la Institución.

#### **¿Quiénes van a tener la información de mis datos?**

Tus datos personales en el estudio, serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con otras personas. La información necesaria para el análisis de los resultados puede ser evaluada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente

proyecto. De igual forma, toda la información recabada sobre ti para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave.

**¿Qué se va a hacer con la muestra de sangre que ya no ocupen?**

La muestra será codificada con una clave que no incluya tu nombre y otros datos en su contenedor, la muestra no será compartida con nadie si tú no lo permites. Quedará bajo el cuidado del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud. Tu muestra de DNA será preservada por 10 años y en caso de no ser requerida para estudios futuros será destruida, en caso de requerirse para estudios futuros serás re-contactado para consentir la utilización de dicha muestra.

**¿Puedo conocer los resultados del estudio?**

Si, en cualquier momento los investigadores responsables del estudio podrán darte la información que necesites.

**DECLARACIÓN DE ASENTIMIENTO**

Declaro, en forma libre y sin que nadie me presione, que participaré en este estudio. He leído cuidadosamente este formato, se me ha explicado en forma clara en qué consiste este estudio y mis preguntas han sido contestadas. Asimismo, entiendo que mi participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente se me ha informado que si no quiero participar en este estudio, no se verá afectará la atención médica brindada dentro de la Institución y, que ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación tendrán un costo para mí ni para mis familiares.

Atentamente

Nombre del paciente		Fecha y Firma
Madre o tutor	Firma	Fecha
Padre o tutor	Firma	Fecha
Nombre del testigo		Fecha y Firma
Nombre del testigo		Fecha y Firma

Obtuvo el asentimiento: \_\_\_\_\_  
Nombre Fecha

Recibí copia de este asentimiento \_\_\_\_\_  
Nombre y firma Fecha

Investigadores responsables: Dr. José Antonio Velázquez Aragón y Dra. Bernardette Estandía Ortega. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 Ext. 1306

Presidente del Comité de Ética: Dra. Matilde Ruíz García. Servicio de Neurología Pediátrica. Tel 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

**Nota:** En caso de obtener poco material genético al tomar la muestra de sangre o de requerir futuros estudios se le recontactará por los investigadores responsables del proyecto para solicitarle una nueva toma de muestra o en caso de que se realicen nuevas investigaciones con relación al Labio Paladar Hendido Aislado o al Síndrome de Van der Woude se le recontactará para invitarlo a participar y en caso de aceptar, firme una nueva carta de consentimiento informado

**ANEXO #6 CONSENTIMIENTO INFORMADO (FAMILIARES MAYORES DE 18 AÑOS)**

**TÍTULO: “PREVALENCIA DE MUTACIONES PATOGENICAS EN EL GEN *IRF6*  
RESPONSABLES DEL SÍNDROME DE VAN DER WOUDE EN PACIENTES  
MEXICANOS CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LABIO PALADAR HENDIDO NO  
SINDROMATICO”**

**¿Para qué se efectúa este estudio?**

Para conocer mejor la frecuencia del síndrome de Van der Woude de causa genética y poder distinguirlo de los casos labio paladar hendido no sindromático que pueden presentar características similares. Es probable que en el futuro los resultados puedan servir para un mejor diagnóstico y pronóstico del síndrome de Van der Woude.

**¿En qué consiste el estudio?**

Se tomará una muestra de 3 a 5 ml de sangre periférica para obtener el material genético (ADN) de usted, el cual determina sus características físicas y de éste se analizarán regiones en un gen que pueden estar implicadas en el padecimiento del Síndrome de Van der Woude. Se espera contar con la participación de mínimo 200 pacientes para este estudio.

**¿Quiénes pueden participar en el estudio?**

Todos los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría que presenten labio paladar hendido no sindromático y sus familiares.

**¿Quiénes no podrán participar en el estudio?**

Los pacientes y los familiares de aquellos pacientes que no deseen participar en el estudio.

**¿Qué se le pedirá a usted que haga?**

Se le tomará una muestra de sangre periférica (3 a 5 ml), en una sola ocasión, por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como la utilización de equipo estéril y desechable, y el uso de guantes.

**¿Quién sufragará los gastos del estudio?**

Ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación tendrá un costo para usted.

**¿Qué beneficio tiene este estudio?**

El estudio permitirá establecer el diagnóstico en la familia de manera más confiable, dar un mejor manejo y brindar un asesoramiento genético más certero. La información obtenida durante el proyecto de investigación permitirá conocer mejor la frecuencia del síndrome de Van der Woude de causa genética y poder distinguirlo de los casos labio paladar hendido no sindromático ya que son enfermedades que pueden parecerse.

**¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas?**

Puede comunicarse con los investigadores responsables: Dr. José Antonio Velázquez Aragón y Dra. Bernardette Estandía Ortega. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 Ext. 1306  
Presidente del Comité de Ética: Dra. Matilde Ruíz García. Servicio de Neurología Pediátrica. Tel 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

#### **¿Me puedo negar a participar en este estudio?**

La participación de usted es total y absolutamente voluntaria, pueden abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención de su familiar en los servicios de la Institución.

#### **¿Quiénes van a tener información de mis datos?**

Sus datos personales contenidos en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La información necesaria para el análisis de los resultados puede ser evaluada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, toda la información clínica e impresa de usted recabada para el presente proyecto quedará resguardada bajo llave y, los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

#### **¿Qué se va a hacer con las muestras biológicas (extracción de DNA)?**

La muestra será codificada con una clave que no incluya su nombre y datos clínicos en su contenedor, la muestra no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La muestra podrá ser analizada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente proyecto. Quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud. Esta muestra sólo podrá ser empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio de Síndrome de Van der Woude y del labio paladar hendido no sindromático, si usted así lo autoriza tras ser re-contactado por los investigadores del INP, y de igual forma se mantendrá la confidencialidad de la información derivada de dichos estudios. La muestra de DNA será preservada por 10 años y en caso de no ser requerida para estudios futuros será destruida.

#### **¿Puedo conocer los resultados del estudio?**

Si, en cualquier momento los investigadores responsables del estudio le podrán dar la información que usted requiera.

### **DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO**

Declaro, en forma libre y sin que nadie me presione, que participaré en este estudio. He leído cuidadosamente este formato, se me ha explicado en forma clara en qué consiste este estudio y mis preguntas han sido contestadas. Asimismo, entiendo que nuestra participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente, se me ha informado que si deseamos no participar, ello no repercutirá en la atención médica brindada a mi familiar dentro de la Institución y que ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación, tendrán un costo para mí.



**ANEXO #7 CONSENTIMIENTO INFORMADO Participantes del estudio anterior  
(CASO ÍNDICE menor 12 años) (otorgado por el padre o tutor)**

**TÍTULO: “PREVALENCIA DE MUTACIONES PATOGENICAS EN EL GEN *IRF6*  
RESPONSABLES DEL SÍNDROME DE VAN DER WOUDE EN PACIENTES  
MEXICANOS CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LABIO PALADAR HENDIDO NO  
SINDROMÁTICO”**

**¿Para qué se efectúa este estudio?**

Para conocer mejor la frecuencia del síndrome de Van der Woude de causa genética y poder distinguirlo de los casos labio paladar hendido no sindromático que pueden presentar características similares. Es probable que en el futuro los resultados puedan servir para un mejor diagnóstico y pronóstico del síndrome de Van der Woude.

**¿En qué consiste el estudio?**

Se utilizará la muestra de DNA tomada a su hijo previamente y que se encuentra bajo resguardo del laboratorio de Biología Molecular, por lo que NO es requerida una nueva toma de muestra a su hijo, sin embargo requerimos de su aprobación para su utilización en este nuevo estudio.

**¿Quiénes pueden participar en el estudio?**

Todos los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría que presenten labio paladar hendido no sindromático.

**¿Quiénes no podrán participar en el estudio?**

Aquellos pacientes que no cuenten con el diagnóstico de LPH no sindromático o que no deseen participar en el estudio.

**¿Qué se le pedirá a su hijo que haga?**

No le será requerido nada más que confirmar su intención de participar, salvo que en algunos casos en donde los resultados de la investigación lo indiquen se le pedirá posteriormente presentarse para una exploración física.

**¿Quién sufragará los gastos del estudio?**

Ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación tendrán un costo para usted.

**¿Qué beneficio puede esperar mi hijo?**

El estudio permitirá establecer el diagnóstico de su hijo de manera más confiable, darle un mejor manejo y brindarle un asesoramiento genético más certero. La información obtenida durante el proyecto de investigación permitirá conocer mejor la frecuencia del síndrome de Van der Woude de causa genética y poder distinguirlo de los casos labio paladar hendido no sindromático ya que son enfermedades que pueden parecerse. Este estudio también será útil para saber si los familiares del paciente deberán ser estudiados o no.

**¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas?**

Puede comunicarse con los investigadores responsables: Dr. José Antonio Velázquez Aragón y Dra. Bernardette Estandía Ortega. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 Ext. 1306. Presidente del Comité de Ética: Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica. Tel 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

**¿Mi hijo puede negarse a participar en este estudio y se le puede pedir a mi hijo que abandone el estudio?**

La participación de su hijo (a) es total y absolutamente voluntaria, puede abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención de su hijo (a) en cualquier servicio de la Institución.

**¿Quiénes van a tener información de los datos de mi hijo?**

Los datos personales de su hijo (a) en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartidos con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La información necesaria para el análisis de los resultados puede ser evaluada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, toda la información clínica e impresa de su hijo (a) recabada para el presente proyecto quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

**¿Qué se va a hacer con las muestras biológicas (extracción de DNA) de mi hijo (a)?**

La muestra será codificada con una clave que no incluya su nombre y datos clínicos en su contenedor, la muestra no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La muestra sólo puede ser analizada y revisada por los médicos e investigadores del presente proyecto. Quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud. Esta muestra sólo podrá ser empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio de Síndrome de Van der Woude y del labio paladar hendido no sindromático, si usted así lo autoriza tras ser recontactado por los investigadores del INP, y de igual forma se mantendrá la confidencialidad de la información derivada de dichos estudios. La muestra de DNA será preservada por 10 años y en caso de no ser requerida para estudios futuros será destruida.

**¿Puedo conocer los resultados del estudio?**

Sí, en cualquier momento los investigadores responsables del estudio podrán darle la información que usted solicite.

**DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO**

Declaro, en forma libre y sin que nadie me presione, que permitiré que mi hijo (a) participe en este estudio. He leído cuidadosamente este formato, se me ha explicado en forma clara en qué consiste este estudio y mis preguntas han sido contestadas. Asimismo, entiendo que nuestra participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente, se me ha informado que si deseamos no participar no se verá afectada la atención médica brindada a mi hijo (a) dentro de la Institución y, que ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación tendrán un costo para mí.



**ANEXO #8 ASENTIMIENTO INFORMADO Participantes del estudio anterior  
(CASO ÍNDICE mayor 12 años)**

**TÍTULO: “PREVALENCIA DE MUTACIONES PATOGENICAS EN EL GEN *IRF6*  
RESPONSABLES DEL SÍNDROME DE VAN DER WOUDE EN PACIENTES  
MEXICANOS CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LABIO PALADAR HENDIDO NO  
SINDROMÁTICO”**

**¿Para qué se efectúa este estudio?**

Para conocer mejor la frecuencia de una enfermedad llamada síndrome de Van der Woude y poder distinguirlo de otra enfermedad que es el labio paladar hendido no sindromático pues estas dos enfermedades se parecen. Es probable que en el futuro los resultados puedan servir para un mejor diagnóstico y pronóstico del síndrome de Van der Woude.

**¿En qué consiste el estudio?**

Se utilizará la muestra de DNA te tomamos hijo previamente y que se encuentra bajo resguardo del laboratorio de Biología Molecular, por lo que NO es requerida una nueva toma de muestra tuya, sin embargo requerimos de tu aprobación para su utilización en este nuevo estudio.

**¿Quiénes pueden participar en el estudio?**

Todos los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría que presenten labio paladar hendido no sindromático.

**¿Quiénes no podrán participar en el estudio?**

Aquellos pacientes que no cuenten con el diagnóstico de LPH no sindromático o que no deseen participar en el estudio.

**¿Qué se te pedirá que hagas?**

No se te pedirá nada más que confirmar tu intención de participar y en algunos casos en los resultados de la investigación lo indiquen se te pedirá posteriormente presentarte para una exploración física.

**¿Quién sufragará los gastos del estudio?**

Ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación tendrán un costo para ti o tu familia.

**¿Qué beneficio puedo esperar?**

El estudio permitirá establecer tu diagnóstico de manera más confiable, darte un mejor manejo y brindarte a ti a tu familia un asesoramiento genético más certero. La información obtenida durante el proyecto de investigación permitirá conocer mejor la frecuencia del síndrome de Van der Woude de causa genética y poder distinguirlo de los casos labio paladar hendido no sindromático ya que son enfermedades que pueden parecerse.

**¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas?**

Puedes comunicarse con los investigadores responsables: Dr. José Antonio Velázquez Aragón y Dra. Bernardette Estandía Ortega. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 Ext. 1306. Presidente del Comité de Ética: Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica. Tel 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

**¿Me puedo negar a participar en este estudio y se me puede pedir que abandone el estudio?**

Tu participación es total y absolutamente voluntaria, puedes abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en tu atención en cualquier servicio de la Institución.

**¿Quiénes van a tener información de mis datos?**

Tus datos personales en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no serán compartidos con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La información necesaria para el análisis de los resultados puede ser evaluada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente proyecto. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

**¿Qué se va a hacer con mis muestras biológicas (extracción de DNA)?**

La muestra será codificada con una clave que no incluya tu nombre y datos clínicos en su contenedor, la muestra no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. Esta muestra sólo podrá ser empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio de Síndrome de Van der Woude y del labio paladar hendido no sindromático, si usted así lo autoriza tras ser re-contactado por los investigadores del INP, y de igual forma se mantendrá la confidencialidad de la información derivada de dichos estudios. La muestra de DNA será preservada por 10 años y en caso de no ser requerida para estudios futuros será destruida.

**¿Puedo conocer los resultados del estudio?**

Sí, en cualquier momento los investigadores responsables del estudio podrán darte la información que solicites.

**DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO**

Declaro, en forma libre y sin que nadie me presione, que participaré en este estudio. He leído cuidadosamente este formato, se me ha explicado en forma clara en qué consiste este estudio y mis preguntas han sido contestadas. Asimismo, entiendo que mi participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente, se me ha informado que si deseo no participar no se verá afectada la atención médica que me sea brindada dentro de la Institución y, que ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación tendrán un costo para mí.

Atentamente

---

Nombre del paciente

Fecha y Firma

---

Madre o tutor	Firma	Fecha
---------------	-------	-------

---

Padre o tutor	Firma	Fecha
---------------	-------	-------

---

Nombre del testigo	Fecha y Firma
--------------------	---------------

---

Nombre del testigo	Fecha y Firma
--------------------	---------------

Obtuvo el asentimiento: \_\_\_\_\_  
Nombre Fecha

Recibí copia de este asentimiento \_\_\_\_\_  
Nombre y firma Fecha

Investigadores responsables: Dr. José Antonio Velázquez Aragón y Dra. Bernardette Estandía Ortega. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 Ext. 1306

Presidente del Comité de Ética: Dra. Matilde Ruíz García. Servicio de Neurología Pediátrica. Tel 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

**Nota:** En caso de obtener poco material genético al tomar la muestra de sangre o de requerir futuros estudios se le recontactará por los investigadores responsables del proyecto para solicitarle una nueva toma de muestra o en caso de que se realicen nuevas investigaciones con relación al Labio Paladar Hendido Aislado o al Síndrome de Van der Woude se le recontactará para invitarlo a participar y en caso de aceptar, firme una nueva carta de consentimiento informado