

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MEXICO



---

---

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
SECRETARIA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

"IDENTIFICACIÓN DE 7 LOCI ASOCIADOS A LABIO PALADAR HENDIDO AISLADO E  
IDENTIFICACIÓN DE INTERACCIONES GÉNICAS EN POBLACIÓN MESTIZA MEXICANA."

TESIS  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
PEDIATRÍA

PRESENTA  
DRA. CAROLINA DERCELLA MENDEZ ADAME

TUTOR  
DR. JOSE VELÁZQUEZ ARAGÓN



CIUDAD DE MEXICO

2018



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.

“IDENTIFICACIÓN DE 7 LOCI ASOCIADOS A LABIO PALADAR HENDIDO AISLADO  
E IDENTIFICACIÓN DE INTERACCIONES GÉNICAS EN POBLACIÓN MESTIZA  
MEXICANA.”



DR. ALEJANDRO SERRANO SIERRA  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO  
DE ESPECIALIZACIÓN EN PEDIATRÍA



DR. JOSE N. REYNES MANZUR  
DIRECTOR DE ENSEÑANZA



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



DR. JOSE VELÁZQUEZ ARAGÓN  
TUTOR DE TESIS



DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA  
CO-TUTOR DE TESIS

**TITULO.** “IDENTIFICACIÓN DE 7 LOCI ASOCIADOS A LABIO PALADAR HENDIDO AISLADO E IDENTIFICACIÓN DE INTERACCIONES GÉNICAS EN POBLACIÓN MESTIZA MEXICANA.”

**RESUMEN.**

El LPHA tiene una herencia multifactorial y su incidencia en México es de 1.1/1000 rnv. Estudios han reportado nuevas asociaciones de genes con LPHA en diferentes poblaciones, pero en población mestiza mexicana no existen estudios de asociación ni de interacciones génicas de estos genes. Nuestro objetivo fue analizar la asociación de 25 SNP's de 17 genes y las interacciones génicas entre ellos, la interacción de las 25 variantes actuales con 19 variantes analizadas en un trabajo anterior y la interacción de estos 25 SNP's con consumo de ácido fólico.

Estudio de casos (n=133) y controles (n=263). Se genotificaron 25 SNP's localizados en 17 genes por un ensayo Kasp. La asociación de cada variante con LPHA se determinó por la prueba de tendencia de Armitage. Se determinaron las interacciones gen-gen de estos 17 genes y su interacción con las variantes analizadas en el trabajo anterior y las interacciones gen-ambiente (ingesta ácido fólico) por un análisis MDR.

El SNP rs6659735 del gen *PAX7* estuvo fuera de EHW en casos y controles fue excluido del análisis. En nuestro análisis encontramos seis SNP's en 5 loci con asociados con riesgo a LPHA (rs742071 *PAX7* OR 1.88 p=0.00011, rs2738265 *BMP4* OR 1.36 p=0.037, rs7078160 OR 1.49 p= 0.004 y rs4752028 OR 1.52 p= 0.004 del gen *VAX1*, rs8001641 *SPRY2* OR 1.35 p=0.042, rs1873147 *TPM1* OR 1.48 p= 0.013) dos SNP's en 2 loci mostraron asociación a protección (rs11696257 *MAFB* OR 0.71 p=0.032, rs1880646 *NTN1* OR 0.67 p= 0.013) En el análisis MDR se encontraron 6 interacciones gen-gen estadísticamente significativas (p= 0.0004-0.001), cinco de ellas no descritas previamente. También se identificó una interacción gen-ambiente entre *ABCA4*-consumo de ácido fólico (p= 0.0001) no descrita previamente.

En nuestro estudio se replicó la asociación previamente descrita de siete loci con LPHA, siendo el SNP del gen *PAX7* el más claramente asociado. Dos variantes en los genes *ABCA4* y *NOG* mostraron tendencia a la asociación con valores de p< 0.074, probablemente con una muestra más grande estas variantes alcanzarían niveles estadísticos de asociación.

En estudio reportamos siete loci asociados de manera independiente a LPHA en población mestiza mexicana y siete interacciones génicas. Nuestros resultados de asociación e interacciones génicas sugieren la identificación de dos vías de señalización relevantes en la etiología de LPHA, al menos en población mestiza mexicana, una es la ruta de señalización de TGF-beta con la participación de *VAX1*, *BMP4* y *NOG* y otra ruta en la que participan el consumo de *AF*, *IRF6*, *NTN1* y *ARHGAP29*.

**PALABRAS CLAVE:** *Labio paladar hendido aislado, estudio de asociación, interacción gen-gen.*

## INTRODUCCIÓN

El labio hendido con o sin paladar hendido aislado (LPHA) es uno de los defectos craneofaciales más comunes ya que a nivel mundial afecta a 1 de cada 700 nacimientos. Presenta variaciones en esta frecuencia, por origen étnico o geográfico, dado que se ha demostrado que es más frecuente en poblaciones asiáticas y amerindias con un afectado en cada 500 nacimientos y menos común en poblaciones del sur de Europa, Sudáfrica e Israel con una frecuencia cercana a 1 afectado en cada 3000 nacimientos. (Mossey, 2009). En México la prevalencia de esta malformación congénita se ha estimado en 1.1 casos por 1000 recién nacidos vivos (Blanco-Dávila, 2003).

Los pacientes con LPHA presentan problemas dentales, auditivos, de alimentación y dificultades de lenguaje que implica un tratamiento a largo plazo a cargo de un grupo multidisciplinario, por lo que se considera representa un problema de salud pública (Jugessur, 2009).

La etiología del LPHA es compleja con la participación de factores genéticos y ambientales, así como de las múltiples interacciones que ocurren entre ellos (Murray, 2002). Con respecto a los factores genéticos se ha estimado que entre 2 y 14 loci pudieran estar involucrados en la etiología del LPHA (Schliekelman, 2002), aunque los resultados de asociación en algunos estudios no son constantes en todos los grupos étnicos. Entre los primeros genes asociados a LPHA están *MSX1*, *TGFA*, *TGFB3*, *PVRL1*, *MTHFR* (Mossey, 2009), pero el primer gen consistentemente asociado a LPHA en diferentes poblaciones fue *IRF6* (Jugessur, 2009).

En el año 2009 se publicaron dos estudios de asociación genómica (GWAS, por sus siglas en inglés) en LPHA, uno realizado en población alemana y el otro en población de EUA, en donde confirman la asociación de *IRF6*, pero además se destaca la asociación identificada con una región de 640 Kb, sin genes reconocidos, ubicada en 8q24 (Birnbbaum, 2009; Grant, 2009). Recientemente, se ha reportado

que en la región 8q24 sinténica en el ratón se encuentran potenciadores de la transcripción de acción lejana (“long range enhancers”) del gen *Myc*. En este estudio observaron que ratones con delección de esta región presentan una discreta alteración de la morfología facial y ocasionalmente LPH. A nivel molecular reportaron que los ratones con la delección muestran un patrón de expresión anormal de algunos genes que se encuentran corriente abajo como *Nr2f1*, *Bmp7*, *Sox11*, *Rplp1* y *Rps20*, cuyos productos participan en la traducción y el correcto funcionamiento ribosomal (Uslu, 2014).

En el 2010 se publicaron otros dos estudios de GWAS para LPHA, uno realizado en población alemana en donde identifican dos nuevos loci cercanos a los genes *VAX1* y *NOG* asociados a LPHA (Mangold, 2010) y en el otro estudio, realizado en poblaciones de origen europeo y asiático, se identificaron dos nuevas regiones asociadas a LPHA en 1p22.1, cercana a los genes *ARHGAP29* y *ABCA4* y en 20q11 cercana al gen *MAFB* (Beaty, 2010).

En el año 2012 se publicó un meta-análisis con los datos de los cuatro estudios de GWAS, previamente mencionados, en el cual se reportaron todas las regiones que alcanzan un valor combinado de asociación significativa con LPHA y en donde se encuentran los genes *ARHGAP29*, *PAX7*, *IRF6*, *THADA*, *EPHA3*, *VAX1*, *SPRY2*, *TPM1*, *NOG*, *MAFB* y las regiones cromosómicas 8q24 y 8q21.3 (Ludwig, 2012). Además, recientemente estudios de genes candidatos han reportado asociaciones con LPHA de los genes *FOXE1*, *BMP4*, *DVL2*, *COL8A1*, *NTN1*, *RBFOX3* y *GADD45G* en diferentes grupos étnicos (Lennon, 2012; Chen, 2012; Motowska, 2012; Beaty, 2013).

Entre los genes más consistentemente asociados a LPHA se encuentra *IRF6*, el cuál es un factor de transcripción que es clave en la proliferación y diferenciación de los queratinocitos y es esencial para la formación del peridermo oral, el cual es requerido para la correcta adhesión palatina (Dixon, 2011). Otro gen consistentemente asociado a LPHA es el codificante de un miembro de la familia de los factores de transcripción con “cabeza en horquilla” (“fork-head”) *FOXE1*, el cual se expresa en el epitelio de las placas palatinas antes de su fusión (Meng, 2012), participa en la formación del labio (Moreno, 2009) y regula a dos genes que han sido asociados a LPHA: *MSX1* y *TGFB3*, lo cual indica que los productos de estos genes se encuentran en una misma ruta de señalización del desarrollo craneofacial. El gen *VAX1* también ha mostrado asociación consistente con LPHA (Beaty, 2010; Nikopensius, 2010; Motowska 2011; Ludwig, 2012; Butali, 2013, Rojas-Martínez, 2010), este gen

codifica a un regulador transcripcional con un dominio homeo-box de unión a DNA. Ratones knockout para *Vax1* desarrollan paladar hendido y se ha observado que se expresa en diferentes estructuras del desarrollo craneofacial (Hallonet, 1999).

Existen pocos reportes de asociación genética con LPHA en México, entre ellos se encuentran tres en población Maya del estado de Chiapas constituida por 153 casos de LPHA y 337 controles. En el primero de ellos, encuentra una asociación del gen *IRF6* y las regiones cromosómicas 8q24 y 10q25 con LPHA, bajo un modelo dominante (Rojas Martínez, 2010). El segundo, reporta una asociación con los genes *PAX7*, *TPM1* y la región cromosómica 13q31 (Ludwing, 2014-1) y en el tercero esta población forma parte de un estudio multiétnico donde se replica una asociación con variantes del gen *FOXE1* y LPHA (Ludwing, 2014-2). Por otro lado, en población Mestiza Mexicana del estado de Jalisco con 67 casos de LPHA y 70 controles, se analizaron las variantes rs1801131 (677C>T) y rs1801133 (1298A>C) del gen *MTHFR* sin encontrar asociación con LPHA (Dávalos-Rodríguez, 2009).

En México, nuestro grupo de investigación, en dos estudios previos de casos y controles, corroboró la asociación como factor importante de protección a LPHA el consumo materno periconcepcional del AF así como la asociación de LPHA con polimorfismos en los genes *IRF6* y *MTHFR* en población mestiza mexicana. En nuestros estudios, a diferencia de lo observado en literatura, no se identificó asociación de los genes *TFGA*, *TGFB3*, *MSX1* y la región 8q24 con LPHA (Velázquez-Aragón, 2012; Estandia-Ortega, 2014).

Los estudios realizados en México muestran que en nuestro país, al ser una población heterogénea, los hallazgos de asociaciones condicionantes de LPHA pueden variar de una región a otra.

En México los únicos estudios que han analizado interacción gen-ambiente y gen-gen son los dos descritos por nuestro grupo, lo cual es necesario conocer dado que estas interacciones juegan un papel importante en la etiología del LPHA (Mossey, 2009). En literatura la interacción gen-ambiente ha sido analizada para variantes en genes candidatos para LPHA y la exposición materna a factores ambientales como tabaquismo, consumo de alcohol y de multivitamínicos, así como la interacción entre variantes genéticas en diferentes loci. Para la identificación de estas interacciones se han utilizado modelos lineales como la regresión logística (Hozyasz, 2014; Butali, 2012; Beaty, 2013; Wu, 2012; Song, 2013; Ibarra-López, 2013; Letra 2012; Leslie, 2012; Romitti, 1999) pero han sido pocas

las interacciones observadas; sin embargo, destacan la de variantes en *IRF6* y consumo de multivitamínicos (OR 1.3, Wu, 2010) así como la de consumo de AF y una variante en *MTHFR* (OR 6.5, van Rooij, 2003).

El método de reducción de la dimensionalidad multifactorial (MDR), que es un método no lineal, se ha implementado de manera exitosa para identificar interacciones en un número creciente de estudios de asociación en enfermedades multifactoriales (Moore, 2009) por lo que también ha sido empleado para la identificación de interacción génica en estudios de asociación con LPHA (Mostowska, 2012; Paranaíba, 2013; Murthy, 2013; Gurramkonda, 2013; Estandia-Ortega, 2014), los estudios previos realizados por nuestro grupo utilizaron este método a través del cual observamos la interacción entre *IRF6* y consumo de ácido fólico e *IRF6* y 8q24 (OR 4.12 y OR 3.01 respectivamente, Velázquez-Aragón, 2012).

Los estudios de replicación de asociaciones se requieren para poder aportar información sobre los genes que son relevantes en la etiología genética del LPHA en diferentes poblaciones, sobre todo en aquellas en donde el LPHA tiene una alta incidencia, como lo es la población mestiza mexicana. El identificar variantes asociadas a LPHA y las interacciones génicas permiten conocer la complejidad que existe en la etiología de esta malformación y podría identificar rutas de señalización susceptibles de convertirse en blancos para la prevención de la enfermedad. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es aportar mayor información sobre los factores genéticos involucrados en la etiología del LPHA en población mestiza mexicana así como identificar interacciones génicas que brinden información sobre las posibles rutas de señalización involucradas en esta malformación.

## **OBJETIVOS**

General:

- Analizar la asociación de 25 variantes de tipo SNP ubicadas en 17 loci con LPHA e identificar interacciones gen-gen y gen-ambiente en una población mestiza mexicana para la identificación de genes y vías de señalización relevantes en la etiología del LPHA.

Particulares:

- Analizar la asociación independiente de 25 SNP's con LPHA en una muestra de población mestiza mexicana.

- Analizar la asociación de haplotipos formados entre variantes en desequilibrio de ligamiento con LPHA.
- Analizar las interacciones gen-gen entre los 25 SNP's estudiados, además de analizar la interacción gen-gen de estas 25 variantes con 19 variantes previamente genotipificadas en esta misma población.
- Analizar la interacción gen-ambiente entre los 25 SNP's y el consumo de AF (peri- pre- o post-concepcional)

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### Diseño del estudio y descripción de la muestra.

Estudio de asociación de casos y controles entre LPHA y 25 variantes genéticas en 17 genes candidatos en una población mestiza mexicana.

Las muestras analizadas en este trabajo fueron obtenidas previamente de 133 pacientes diagnosticados con LPHA y 263 controles sanos. Todos los individuos incluidos en el estudio nacieron en la Ciudad de México y su zona conurbana y sus padres residieron en dicha ciudad por lo menos un año previo al nacimiento de los participantes. Los padres y los abuelos de todos los participantes eran de nacionalidad mexicana. Los pacientes con LPHA se incluyeron durante su seguimiento médico en los servicios de genética, cirugía o estomatología del Instituto Nacional de Pediatría. Todos los pacientes tuvieron una evaluación por un genetista y los individuos con cualquier dato sugerente de una forma sindrómica de LPH fueron excluidos del estudio. El grupo control se conformó por niños que se encontraban en seguimiento de protocolos de seguridad de vacunas en el Instituto Nacional de Pediatría, quienes fueron considerados como sanos por la evaluación de un pediatra.

En el momento que se obtuvieron las muestras de DNA se aplicó a las madres de los casos y controles un cuestionario para conocer antecedentes sobre la historia familiar, exposición a teratógenos durante el embarazo y consumo de AF en el periodo periconcepcional, el cual fue considerado como el consumo de AF durante los tres meses previos a la concepción y durante los tres meses posteriores a ésta. Por otro lado el consumo de AF sólo durante los tres meses previos a la concepción se consideró consumo preconcepcional y el consumo de AF sólo durante los tres meses posteriores a la concepción fue considerado como consumo postconcepcional.

Las muestras de DNA que se utilizaron en este trabajo, se analizaron en un estudio previo con 10 marcadores informativos de ascendencia, con lo cual se descartó estratificación, lo anterior nos permite establecer que las asociaciones que se observen no son espurias (Velázquez-Aragón, 2012).

#### Genotipificación, selección de genes candidatos y de las variantes genéticas.

Las muestras de DNA que se analizaron en el presente trabajo se obtuvieron previamente por el método de precipitación salina (Gentra Systems, Minneapolis, USA) o por el método de adsorción en sílica (QIAamp DNA blood mini kit, QIAGEN, Germantown, MD, USA) a partir de sangre periférica (casos) o mucosa oral (controles). Se obtuvo la aprobación para la realización del estudio por parte de los comités de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Pediatría. Todos los padres de los casos y controles firmaron una carta de consentimiento informado para su inclusión en el estudio.

Las 25 variantes en los genes *ABCA4*, *FOXE1*, *PAX7*, *BMP4*, *THADA*, *DVL2*, *MAFB*, *NOG*, *VAX1*, *COL8A1*, *NTN1*, *EPHA3*, *RBFOX*, *ARHGAP29*, *GADD45G*, *SPRY2*, *TPM1* y la región 8q21.3 fueron seleccionadas bajo el criterio de que cada una de ellas tuviera por lo menos un reporte positivo de asociación en la literatura en al menos una población (**Tabla1**), con los valores de asociación más significativos en dichos reportes y cuyas frecuencias alélicas reportadas en mexicanos fueran mayor al 0.1 para el alelo menor; en caso de no existir dicha información se utilizó la frecuencia reportada en asiáticos. Lo anterior, con la finalidad de aumentar la posibilidad de detectar asociaciones estadísticamente significativas (International HapMap Project <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Todas las variantes fueron genotipificadas por medio de un ensayo KASP (LGC Genomics, Beverly, Ma. USA <http://www.lgcgenomics.com/>)

#### Análisis Estadístico para las variantes y haplotipos.

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

El análisis de haplotipos se realizó en aquellas variantes ubicadas en el mismo gen y que además se encontraran en desequilibrio de ligamiento (DL) ( $D' > 0.60$ ) utilizando el programa Haploview (Barret, 2005). Los haplotipos con valores de asociación con LPHA de  $p < 0.05$  se sometieron a una prueba de

permutación de 100,000 repeticiones en el mismo programa. Se consideró una asociación positiva a LPHA si un haplotipo mostraba un valor de significancia  $<0.05$  después del análisis de permutación.

#### Análisis de interacciones gen-gen y gen-ambiente

La interacción gen-gen y gen-ambiente se analizó por el método de reducción de la dimensionalidad multifactorial (MDR), bajo un análisis forzado de dos atributos en donde cada variante fue analizada contra cada una de las demás variantes, así como el análisis de interacción de cada una de las variantes *versus* el consumo de AF (peri, pre o postconcepcional). También se realizó un análisis para cada una de las variantes genotipificadas en este estudio contra cada una de las 19 variantes previamente analizadas por nuestro grupo en dos trabajos previos, ubicadas en los genes *IRF6*, *MTHFR*, *TGFA*, *TGFB3*, *PVRL1*, *MSX1* y la región cromosómica 8q24 (Velázquez-Aragón, 2012; Estandía-Ortega, 2014).

El análisis por MDR se realizó con los parámetros preestablecidos en el programa. Los mejores modelos finales se obtuvieron a partir de los valores de "Testing Accuracy" (TA), y se utilizó una validación cruzada "Cross Validation" (CV) de 10. La significancia estadística de los modelos obtenidos por MDR se calculó con el módulo de permutación del programa después de 100,000 repeticiones.

## **RESULTADOS**

La información de la muestra con respecto a la edad promedio, género, consumo de ácido fólico y lateralidad del defecto se presentan en la **tabla 2**. Por el bajo consumo de AF observado en etapa periconcepcional, se estableció como una sola variable la ingesta de AF cuando las madres consumieron dicho suplemento de manera peri, pre o postconcepcional.

#### Análisis de asociación de marcadores individuales y de haplotipos.

El SNP rs6659735 del gen *PAX7* fue la única variante que estuvo fuera de EHW en casos y controles por lo que fue excluido del análisis.

Se realizó un análisis de tendencia de Armitage en las 24 variables en EHW y se encontró una asociación significativa con LPHA de ocho variantes localizadas en 7 loci, los resultados se muestran en la **tabla 3**. Seis variantes mostraron asociación a mayor riesgo a desarrollar LPHA las cuales se encuentran en los genes *PAX7*, *BMP4*, *VAX1*, *SPRY2* y *TPM1*, mientras que dos variantes en los genes *MAFB* y *NTN1* mostraron asociación a protección para LPHA. Además, dos variantes, una en

el gen *ABCA4* y otra en el gen *NOG* mostraron valores de significancia con tendencia a la asociación (**tabla 4**). El resto de variantes no mostraron asociación estadística con valores de p entre 0.13 y 0.87. El análisis de haplotipos se realizó entre las variantes pertenecientes a los genes *ARHGAP29*, *DVL2*, *VAX1* y *THADA*. El haplotipo "A-C" formado por los SNP's rs7078160 y rs4752028 ubicados en *VAX1* mostraron asociación a un mayor riesgo de LPHA después del análisis de permutación (p=0.012). Los otros tres haplotipos no mostraron asociación a LPHA.

#### Análisis de interacción gen-ambiente y gen-gen.

El análisis por MDR con modelos de dos atributos evidenció seis interacciones gen-gen y una interacción gen-ambiente estadísticamente significativas, de las cuales seis no estaban previamente descritas en literatura (**tabla 5**).

## **DISCUSION Y CONCLUSIONES**

La mayoría de los casos analizados (68%) fue del género masculino, con una relación 2:1 con respecto a mujeres, conforme a lo reportado en la literatura (Mossey, 2009). Con respecto a la lateralidad del defecto se observó una mayor proporción de casos con LPH unilateral izquierdo (44%) vs derecho (24%) y bilateral (32%), similar a lo reportado en la literatura (Dixon, 2011). Es notable el hecho de que el consumo de suplemento de AF en al menos alguno de los periodos pre, post o periconcepcional, fue bajo entre las madres de los casos (47.3%) y controles (75.3%). Este hallazgo fue reportado previamente en nuestro grupo en el que se corroboró la asociación de consumo de AF y menor riesgo de LPHA (OR 0.29, p< 0.0001, Estandia-Ortega, 2014). El no contar con el antecedente de consumir un suplemento de ácido fólico no implica una deficiencia de folatos en las madres de nuestros casos, sin embargo, dado que en la literatura se ha reportado en un meta-análisis que el consumo de AF de manera periconcepcional disminuye en un 29% la probabilidad de tener un hijo con LPHA (Badovinac, 2007), consideramos importante continuar con las campañas que fomenten el consumo de ácido fólico en nuestra población.

Una fortaleza de nuestro trabajo, que en otros no se menciona, es que todos los pacientes con LPHA fueron exhaustivamente examinados por un Médico Genetista para descartar a todo individuo con sospecha de formas sindrómicas de labio y/o paladar hendido. Es importante realizar este examen

clínico, dado que se ha reportado la clasificación incorrecta de pacientes con síndrome de Van der Woude como LPHA y la inclusión de pacientes con este síndrome podrían modificar los resultados de asociaciones; consideramos que lo anterior es poco probable en nuestro trabajo, dado que todos los casos fueron valorados por un Genetista, aunque se describe que aproximadamente en un 3% de los casos no es posible distinguirlos clínicamente (Jehee, 2009; Wu, 2010).

El SNP rs6659735 del gen *PAX7* estuvo fuera de EHW en casos y controles. La causa más común de encontrar una variante fuera de EHW es una incorrecta genotipificación (Xu, 2002). Esta variante pasó el control de calidad *in silico* para el diseño del ensayo de genotipificación, sin embargo no se puede descartar la posibilidad de una incorrecta asignación de alelos por un mal desempeño del ensayo que no puede ser previsto. Por otro lado cabe la posibilidad que este alelo sea de reciente ingreso (unas pocas generaciones atrás) en la población y no se encuentre todavía bajo equilibrio de Hardy-Weinberg (Xu, 2002). En cualquier caso este SNP rs6659735 fue excluido del análisis.

Seis de las 24 variantes analizadas mostraron asociación a mayor riesgo a LPHA y dos a protección. En la **tabla 6** se resumen los estudios en donde han sido analizadas estas variantes en otras poblaciones y en la que se puede observar que en los reportes en donde estas variantes muestran asociación, se comportan de manera similar a lo observado en este estudio (de riesgo o de protección); sin embargo en algunos casos existen poblaciones en donde estas variantes no muestran asociación. Los genes que muestran gran consistencia de asociación en diferentes poblaciones son *PAX7*, *VAX1* y *TPM1*, mientras que *BMP4* y *MAFB* son más inconsistentes en su asociación, los genes *SPRY2* y *NTN1* muestran consistencia en la asociación pero son pocos estudios en donde han sido reportadas estas variantes (**tabla 6**).

La variante que mostró la mayor significancia estadística fue rs742071 del gen *PAX7* ( $p= 0.00011$ ) permaneciendo con asociación estadísticamente significativa después de la corrección por análisis múltiples de Bonferroni ( $p= 0.027$ ). Lo anterior indica una fuerte asociación de esta variante a LPHA, ya que tomando en cuenta el tamaño de muestra de nuestro estudio es poco frecuente encontrar valores de asociación tan significativos. Estos datos, en conjunto con la consistencia de asociación que muestra *PAX7* con LPHA en diferentes poblaciones, nos permite considerarlo un locus importante en la etiología de esta malformación.

Las variantes asociadas en otros genes no mantuvieron valores de  $p$  significativos después de la corrección de Bonferroni; sin embargo es importante destacar que esta corrección es sumamente estricta y subestima los valores de asociación de las variantes en estudios en donde el tamaño de muestra es discreto (Armstrong, 2014). Por lo anterior tomamos como válidos los valores de asociación nominal de las variantes y presentamos los valores de asociación corregidos por el factor de Bonferroni para fines informativos.

Las asociaciones de variantes génicas identificadas con LPHA, generalmente no tienen una explicación funcional; a pesar de ello, a continuación mencionaremos algunas características de los genes y las variantes que mostraron asociación en el presente trabajo.

El gen *PAX7* codifica a un factor de transcripción que se requiere para el correcto desarrollo del mesénquima cefálico derivado de las crestas neurales ya que se ha observado en estudios realizados en ratones que la expresión de *Pax7* es requerida para la correcta formación de varios tejidos craneofaciales entre ellos cartílago y mesénquima frontonasal (Murdoch, 2012). El SNP rs742071 es una variante intrónica de la cual se desconoce si tiene un efecto funcional dado que no existen estudios funcionales sobre este polimorfismo, se postula que sea un marcador en DL con otras variantes funcionales localizadas en el mismo gen lo que explicaría su asociación con LPHA (Ludwig, 2012).

El haplotipo "A-C" formado por rs7078160 y rs4752028 en *VAX1* asoció a un mayor riesgo a presentar LPHA ( $p=0.012$ ), estas variantes están en DL ( $D'=0.94$ ) y ambas estuvieron asociadas a un mayor riesgo a LPHA de manera independiente, por lo que era de esperarse que el haplotipo conformado por ambas también mostrara asociación. Ratones Knockout *Vax1* presentan paladar hendido y se ha demostrado que la ausencia de *Vax1* afecta la expresión de genes que participan en la ruta de señalización de WTN. La expresión de *VAX1* es relevante para la formación correcta del ojo, mientras que en el humano mutaciones amorfas en estado homocigoto en *VAX1* pueden causar microoftalmia, agenesia del cuerpo calloso y hendiduras orofaciales (OMIM 614402) (Slavotinek, 2012). Las variantes rs7078160 y rs4752028 se encuentran aproximadamente a 50 Kb río debajo de la región 3'UTR del gen *VAX1* y esta región no está reportada como reguladora de la expresión del gen, sin embargo no se han realizado estudios funcionales que determinen el efecto de estas variantes en la expresión o la función de *VAX1*.

Variantes en el gen *BMP4* se han asociado a LPHA en poblaciones multiétnicas (**tabla 6**). El gen *BMP4* codifica a un factor de proliferación y diferenciación celular que participa en la formación del cerebro anterior y se expresa en conjunto con *VAX1* durante la fusión del paladar (Zhao, 2010). Mutaciones en estado heterocigoto en *BMP4* causan la microoftalmia con anomalías digitales y cerebrales sindrómica 6 (MCOPS6, OMIM 607932) y la delección de 14(q22q23), en donde se localiza *BMP4*, causa microoftalmia, micrognatia y paladar hendido (Phadke, 1994). El SNP rs2738265 se ubica a la mitad del intrón 1 de *BMP4*, se desconoce si tiene un efecto funcional puesto que no ha sido analizado experimentalmente, aunque por su ubicación es poco probable que afecte la función de la proteína o la expresión del gen por lo que se postula que sea un marcador genético en DL con otras variantes funcionales y que muestre mayor asociación estadística debido a su alta frecuencia, ya que es cercana a 0.50 en diferentes poblaciones (dbSNP, NCBI; 1000 Genomes Project).

El gen *SPRY2* ha sido poco estudiado en su asociación a LPHA (**tabla 6**) y codifica a un factor de crecimiento de tejido epitelial. El factor de transcripción c-MYC aumenta la transcripción de miRNA's que disminuyen la expresión de *SPRY2*, lo cual sugiere que estos genes están implicados en la ruta de señalización del factor de crecimiento epidérmico, la cual se conoce es necesaria para el correcto desarrollo craneofacial (Li, 2013). En nuestro estudio el SNP rs8001641 mostró asociación a LPHA, el cual se encuentra en una región intergénica a 250 Kb del gen *SPRY2* en donde no se identifican regiones reguladoras por lo que el efecto funcional de esta variante sobre la expresión o la función de *SPRY2* es desconocido.

*TPM1* codifica para la tropomiosina 1; la familia de la tropomiosinas, son proteínas del citoesqueleto que están involucradas en la regulación y estabilización de los microfilamentos de actina. La expresión aberrante de tropomiosinas condiciona cambios morfológicos anormales que causan la pérdida de la integridad epitelial (Kubo, 2013). Mutaciones en *TPM1* se han asociado a cardiomiopatía hipertrófica familiar del tipo 3, sin embargo en estos pacientes no se ha observado una coexistencia con labio y/o paladar hendido (OMIM 115196). El SNP rs1873147 asociado a LPHA en nuestro estudio se encuentra a 20 Kb río arriba del sitio del inicio de la transcripción del gen *TPM1* dentro de un mismo bloque en DL en una región sin elementos reguladores reportados, no existen estudios funcionales ni de expresión para esta variante.

En este trabajo se identificaron 2 variantes asociadas con protección a LPHA al igual que en todos los estudios en los que se han analizado (Tabla 6). La primera es el SNP rs1880646 en el gen *NTN1*, este gen codifica la netrina-1 que participa en la proliferación y migración celular, sin embargo en el catálogo OMIM no existe ningún fenotipo asociado a mutaciones en este gen y el SNP rs1880646 es una variante intrónica sin efecto funcional descrito. La segunda variante con asociación a protección fue rs11696257 en el gen *MAFB*. Mutaciones heterocigotas en *MAFB* causan el síndrome de osteólisis multicentrica carpotarsal (OMIM 166300), el cual no cursa con LPH. *MAFB* es un factor de transcripción importante en la regulación de la hematopoyesis y en ratones *Mafb* se expresa en el ectodermo craneofacial y en el mesodermo derivado de las crestas neurales; presenta una fuerte expresión en el epitelio alrededor de las placas palatinas y en el epitelio medio durante la fusión, posterior a la cual, la expresión de *Mafb* es mayor en el epitelio oral comparado con el tejido mesenquimatoso (OMIM, NCBI). La variante rs11696257 se encuentra a 40Kb río debajo de la región 3'UTR del gen *MAFB* y no se ha descrito ningún estudio funcional para ella.

En nuestro estudio dos variantes mostraron tendencia a la asociación con LPHA, una fue el SNP rs560426 en el gen *ABCA4* con un mayor riesgo a LPHA y un valor de  $p=0.056$  y la otra fue rs227731 del gen *NOG* también con mayor riesgo a LPHA y valor de  $p=0.073$ . Ambas variantes han sido asociadas a mayor riesgo a LPHA en diferentes poblaciones con valores de  $p$  entre 0.0068 y  $3.14 \times 10^{-12}$  para *ABCA* (Beaty, 2010; Fontoura, 2012; Ludwing, 2012; Bagordakis, 2013) y entre 0.0044 y  $1.07 \times 10^{-8}$  para *NOG* (Mangold, 2010; Mostowska, 2012; Ludwing, 2012). Todos estos estudios cuentan con tamaños de muestra mayores al nuestro por lo que consideramos que con una muestra de mayor tamaño estas variantes alcanzarían un valor estadístico formal de significancia en nuestra población. El SNP rs560426 está ubicado en el intrón 6 de *ABCA4* sin efecto funcional reportado; sin embargo, estudios de expresión y de secuenciación no apoyan la participación de *ABCA4* en la etiología del LPHA sino al gen *ARHGAP29*, adyacente a *ABCA4* (70 Kb), al identificar variantes deletéreas en pacientes con LPHA y tener expresión reducida de *Arhgap29* en ratones deficientes de *Irf6*, gen ampliamente asociado a LPHA (Leslie, 2012). *NOG* codifica a la proteína noggin la cual se une e inactiva a la proteína BMP4, ambas proteínas actúan en la ruta de señalización de TGF-beta (Zimmerman, 1996), BMP4 también interactúa con VAX1 (Zhao, 2010). En este estudio los genes

*VAX1* y *BMP4* mostraron asociación a LPHA, sugiriendo que la ruta de señalización de TGF-beta es relevante en la etiología del LPHA.

Debido a que existe poca información de los genes involucrados en la etiología de LPHA en poblaciones de origen Mexicano se decidió en el presente trabajo analizar genes que previamente habían mostrado asociación con LPHA en poblaciones mexicanas o en poblaciones de otras partes del mundo. Existen tres estudios de asociación a LPHA en población Maya (n= 149 casos, n= 303) del estado de Chiapas y en los cuales reportan asociación a la región 8q24 y de los genes *IRF6*, *VAX1*, *PAX7*, *EPHA3*, *MAFB*, *TPM1* y *FOXE1* (Rojas-Martínez, 2010; Ludwing, 2014; Ludwing, 2014-2). Al comparar este trabajo con los reportes en Mayas encontramos coincidencias de asociación en los genes *VAX1*, *PAX7*, y *TPM1* en población mestiza mexicana, además de la asociación previamente reportada por nuestro grupo con el gen *IRF6*. En los genes *VAX1*, *PAX7* y *TPM1* se analizaron los mismos SNP's en las dos poblaciones y encontramos resultados similares entre ellas: *VAX1* OR 1.43 Mayas - OR 1.49 mestizos, *PAX7* OR 1.57 Mayas - OR 1.88 mestizos, *TPM1* OR 1.62 Mayas - OR 1.48 mestizos. Sin embargo, en este estudio no identificamos asociación con los genes *EPHA3* y *FOXE1* a diferencia de lo reportado en población Maya, a pesar de analizar los mismos SNP's, mientras que un SNP en el gen *MAFB* no mostró asociación en población Maya pero en nuestro estudio encontramos tendencia a la asociación. Los datos anteriores nuevamente nos muestran que en la población mexicana, al ser genéticamente heterógena, las asociaciones de variantes con LPHA pueden variar de una región a otra, de ahí la relevancia de realizar estos estudios. Dado que nuestro trabajo es el único en población mexicana que realiza el análisis de interacciones génicas no podemos establecer ninguna comparación con respecto a lo publicado en población Maya.

El análisis MDR reveló seis interacciones gen-gen con valores estadísticamente significativos (p 0.0001-0.0011). Cinco de estas interacciones no habían sido descritas previamente en la literatura (*ABCA4-MAFB*, *PAX7-ARHGAP29*, *PAX7-TPM1*, *BMP4-VAX1*, *TPM1-IRF6*). La interacción *NTN1-IRF6* previamente se identificó por regresión logística en una población multiétnica con valores estadísticos marginales de asociación. Los autores argumentan que sus resultados no alcanzaron valores de significancia estadística formal probablemente por la pérdida de poder estadístico debido al método lineal que utilizan, la cual no permite identificar efectos de interacción moderados (Beaty,

2013). En nuestro trabajo al utilizar un modelo no lineal como el MDR y al utilizar un método forzado con modelos de sólo dos atributos, para evitar en lo posible la pérdida de poder estadístico, nos permitió observar esta interacción con alta significancia estadística ( $p= 0.0002$ ). Además, identificamos una interacción gen-ambiente entre el consumo de AF materno (peri- pre- o post- concepcional) y el gen *ABCA4*, la cual no ha sido descrito en la literatura. La variante en el gen *ABCA* en realidad se cree que es un marcador en DL con el gen *ARHGAP29* el cual interactúa con el gen *IRF6* (Leslie, 2012). En un trabajo anterior describimos la interacción de *IRF6* y el consumo de AF (Velázquez-Aragón, 2012), por lo que estos hallazgos sugieren una red de interacciones entre *AF-IRF6-ARHGAP29-NTN1*, los cuales participan en la misma vía de señalización.

La interacción entre *VAX1-BMP4* identificada en este estudio, está acorde a lo descrito con relación a la interacción de los productos de estos genes en la señalización para el desarrollo del cerebro anterior (Zhao, 2010), pero también sugiere que pudieran interactuar en la señalización para el desarrollo de la región oral.

Nuestros resultados de asociación e interacciones génicas sugieren la identificación de dos vías de señalización relevantes en la etiología de LPHA, al menos en población mestiza mexicana, una es la ruta de señalización de TGF-beta con la participación de *VAX1*, *BMP4* y *NOG* y otra ruta en la que participan el consumo de AF, *IRF6*, *NTN1* y *ARHGAP29*.

## **CONCLUSIONES**

En este estudio se reportan 7 loci asociados a LPHA y dos loci con tendencia a la asociación en población mestiza mexicana. Las variantes asociadas no parecen tener un efecto funcional sobre los productos génicos, por lo que sería conveniente en estudios futuros la búsqueda de mutaciones o variantes funcionales en estos loci en individuos afectados, lo que permitirá tener un mejor entendimiento de la etiología de esta malformación.

La identificación de 7 interacciones génicas asociadas a LPHA en este estudio permitió identificar dos posibles rutas de señalización relevantes en la etiología del LPHA, esta información puede servir como base para la identificación de otros participantes en estas rutas o para la identificación de otras vías de señalización. El mejor entendimiento de las complejas redes de señalización en el desarrollo

craneofacial pudieran permitir en un futuro la implementación de medidas de prevención para disminuir el riesgo a presentar esta malformación.

## REFERENCIAS

- Aldharae, K. A., A. C. Bohmer, K. U. Ludwig, A. H. Esmail, N. N. Al-Hebshi, B. Lippke, L. Golz, M. M. Nothen, N. Daratsianos, M. Knapp, A. Jager and E. Mangold (2014). "Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in arab populations: genetic analysis of 15 risk loci in a novel case-control sample recruited in Yemen." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 100(4): 307-313.
- Armstrong, R. A. (2014). "When to use the Bonferroni correction." *Ophthalmic Physiol Opt* 34(5): 502-508.
- Badovinac, R. L., M. M. Werler, P. L. Williams, K. T. Kelsey and C. Hayes (2007). "Folic acid-containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: a meta-analysis." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 79(1): 8-15.
- Bagordakis, E., L. M. Paranaiba, L. A. Brito, S. N. de Aquino, A. C. Messetti, H. Martelli-Junior, M. S. Swerts, E. Graner, M. R. Passos-Bueno and R. D. Coletta (2013). "Polymorphisms at regions 1p22.1 (rs560426) and 8q24 (rs1530300) are risk markers for nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population." *Am J Med Genet A* 161A(5): 1177-1180.
- Barrett, J. C., B. Fry, J. Maller and M. J. Daly (2005). "Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps." *Bioinformatics* 21(2): 263-265.
- Beaty, T. H., J. C. Murray, M. L. Marazita, R. G. Munger, I. Ruczinski, J. B. Hetmanski, K. Y. Liang, T. Wu, T. Murray, M. D. Fallin, R. A. Redett, G. Raymond, H. Schwender, S. C. Jin, M. E. Cooper, M. Dunnwald, M. A. Mansilla, E. Leslie, S. Bullard, A. C. Lidral, L. M. Moreno, R. Menezes, A. R. Vieira, A. Petrin, A. J. Wilcox, R. T. Lie, E. W. Jabs, Y. H. Wu-Chou, P. K. Chen, H. Wang, X. Ye, S. Huang, V. Yeow, S. S. Chong, S. H. Jee, B. Shi, K. Christensen, M. Melbye, K. F. Doheny, E. W. Pugh, H. Ling, E. E. Castilla, A. E. Czeizel, L. Ma, L. L. Field, L. Brody, F. Pangilinan, J. L. Mills, A. M. Molloy, P. N. Kirke, J. M. Scott, M. Arcos-Burgos and A. F. Scott (2010). "A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4." *Nat Genet* 42(6): 525-529.
- Beaty, T. H., M. A. Taub, A. F. Scott, J. C. Murray, M. L. Marazita, H. Schwender, M. M. Parker, J. B. Hetmanski, P. Balakrishnan, M. A. Mansilla, E. Mangold, K. U. Ludwig, M. M. Nothen, M. Rubini, N. Elcioglu and I. Ruczinski (2013). "Confirming genes influencing risk to cleft lip with/without cleft palate in a case-parent trio study." *Hum Genet* 132(7): 771-781.
- Birnbaum, S., K. U. Ludwig, H. Reutter, S. Herms, M. Steffens, M. Rubini, C. Baluardo, M. Ferrian, N. Almeida de Assis, M. A. Alblas, S. Barth, J. Freudenberg, C. Lauster, G. Schmidt, M. Scheer, B. Braumann, S. J. Berge, R. H. Reich, F. Schiefke, A. Hemprich, S. Potzsch, R. P. Steegers-Theunissen, B. Potzsch, S. Moebus, B. Horsthemke, F. J. Kramer, T. F. Wienker, P. A. Mossey, P. Propping, S. Cichon, P. Hoffmann, M. Knapp, M. M. Nothen and E. Mangold (2009). "Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24." *Nat Genet* 41(4): 473-477.
- Blanco-Davila, F. (2003). "Incidence of cleft lip and palate in the northeast of Mexico: a 10-year study." *J Craniofac Surg* 14(4): 533-537.

- Bohmer, A. C., E. Mangold, P. Tessmann, P. A. Mossey, R. P. Steegers-Theunissen, J. Lindemans, M. Bouwman-Both, M. Rubini, P. Franceschelli, V. Aiello, B. Peterlin, A. M. Molloy, M. M. Nothen, M. Knapp and K. U. Ludwig (2013). "Analysis of susceptibility loci for nonsyndromic orofacial clefting in a European trio sample." *Am J Med Genet A* 161A(10): 2545-2549.
- Butali, A., S. Suzuki, M. E. Cooper, A. M. Mansilla, K. Cuenco, E. J. Leslie, Y. Suzuki, T. Niimi, M. Yamamoto, G. Ayanga, T. Erkhembaatar, H. Furukawa, K. Fujiwawa, H. Imura, A. L. Petrin, N. Natsume, T. H. Beaty, M. L. Marazita and J. C. Murray (2013). "Replication of genome wide association identified candidate genes confirm the role of common and rare variants in PAX7 and VAX1 in the etiology of nonsyndromic CL(P)." *Am J Med Genet A* 161A(5): 965-972.
- Chen, Q., H. Wang, J. B. Hetmanski, T. Zhang, I. Ruczinski, H. Schwender, K. Y. Liang, M. D. Fallin, R. J. Redett, G. V. Raymond, Y. H. Wu Chou, P. K. Chen, V. Yeow, S. S. Chong, F. S. Cheah, E. W. Jabs, A. F. Scott and T. H. Beaty (2012). "BMP4 was associated with NSCL/P in an Asian population." *PLoS One* 7(4): e35347.
- Davalos-Rodriguez, I. P., E. J. Ramirez-Lizardo, J. P. Mena, V. Ledezma-Rodriguez, N. Omayra-Davalos, M. G. Gonzalez-Mercado, J. Duran-Gonzalez, M. C. Moran-Moguel, V. Peralta-Leal, M. Salazar-Paramo and V. Ledezma-Gomez (2009). "[Non-syndromic cleft lip/cleft palate and C677T methylene-tetrahydrofolate reductase variant in Mexican children]." *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 47(5): 549-552.
- de Aquino, S. N., A. C. Messetti, E. Bagordakis, H. Martelli-Junior, M. S. Swerts, E. Graner and R. D. Coletta (2013). "Polymorphisms in FGF12, VCL, CX43 and VAX1 in Brazilian patients with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate." *BMC Med Genet* 14: 53.
- Dixon, M. J., M. L. Marazita, T. H. Beaty and J. C. Murray (2011). "Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences." *Nat Rev Genet* 12(3): 167-178.
- Estandia-Ortega, B., J. A. Velazquez-Aragon, M. A. Alcantara-Ortigoza, M. E. Reyna-Fabian, S. Villagomez-Martinez and A. Gonzalez-Del Angel (2014). "5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase single nucleotide polymorphisms and gene-environment interaction analysis in non-syndromic cleft lip/palate." *Eur J Oral Sci* 122(2): 109-113.
- Fontoura, C., R. M. Silva, J. M. Granjeiro and A. Letra (2012). "Further evidence of association of the ABCA4 gene with cleft lip/palate." *Eur J Oral Sci* 120(6): 553-557.
- Grant, S. F., K. Wang, H. Zhang, W. Glaberson, K. Annaiah, C. E. Kim, J. P. Bradfield, J. T. Glessner, K. A. Thomas, M. Garris, E. C. Frackelton, F. G. Otieno, R. M. Chiavacci, H. D. Nah, R. E. Kirschner and H. Hakonarson (2009). "A genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24." *J Pediatr* 155(6): 909-913.
- Hallonet, M., T. Hollemann, T. Pieler and P. Gruss (1999). "Vax1, a novel homeobox-containing gene, directs development of the basal forebrain and visual system." *Genes Dev* 13(23): 3106-3114.
- Hozyasz, K. K., A. Mostowska, P. Wojcicki, A. Lasota, A. Wolkowicz, I. Dunin-Wilczynska and P. P. Jagodzinski (2014). "Association of common variants in PAH and LAT1 with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P) in the Polish population." *Arch Oral Biol* 59(4): 363-369.
- Ibarra-Lopez, J. J., P. Duarte, V. Antonio-Vejar, E. S. Calderon-Aranda, G. Huerta-Beristain, E. Flores-Alfaro and M. E. Moreno-Godinez (2013). "Maternal C677T MTHFR polymorphism and environmental

factors are associated with cleft lip and palate in a Mexican population." *J Investig Med* 61(6): 1030-1035.

- Jehee, F. S., B. A. Burin, K. M. Rocha, R. Zechi-Ceide, D. F. Bueno, L. Brito, J. Souza, G. F. Leal, A. Richieri-Costa, N. Alonso, P. A. Otto and M. R. Passos-Bueno (2009). "Novel mutations in IRF6 in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: when should IRF6 mutational screening be done?" *Am J Med Genet A* 149A(6): 1319-1322.
- Jugessur, A., M. Shi, H. K. Gjessing, R. T. Lie, A. J. Wilcox, C. R. Weinberg, K. Christensen, A. L. Boyles, S. Daack-Hirsch, T. N. Trung, C. Bille, A. C. Lidral and J. C. Murray (2009). "Genetic determinants of facial clefting: analysis of 357 candidate genes using two national cleft studies from Scandinavia." *PLoS One* 4(4): e5385.
- Kubo, E., N. Hasanova, N. Fatma, H. Sasaki and D. P. Singh (2013). "Elevated tropomyosin expression is associated with epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells." *J Cell Mol Med* 17(1): 212-221.
- Lennon, C. J., A. C. Birkeland, J. A. Nunez, G. H. Su, P. Lanzano, E. Guzman, K. Celis, S. B. Eisig, D. Hoffman, M. T. Rendon, H. Ostos, W. K. Chung and J. Haddad, Jr. (2012). "Association of candidate genes with nonsyndromic clefts in Honduran and Colombian populations." *Laryngoscope* 122(9): 2082-2087.
- Leslie, E. J., M. A. Mansilla, L. C. Biggs, K. Schuette, S. Bullard, M. Cooper, M. Dunnwald, A. C. Lidral, M. L. Marazita, T. H. Beaty and J. C. Murray (2012). "Expression and mutation analyses implicate ARHGAP29 as the etiologic gene for the cleft lip with or without cleft palate locus identified by genome-wide association on chromosome 1p22." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 94(11): 934-942.
- Letra, A., W. Fakhouri, R. F. Fonseca, R. Menezes, I. Kempa, J. L. Prasad, T. G. McHenry, A. C. Lidral, L. Moreno, J. C. Murray, S. Daack-Hirsch, M. L. Marazita, E. E. Castilla, B. Lace, I. M. Orioli, J. M. Granjeiro, B. C. Schutte and A. R. Vieira (2012). "Interaction between IRF6 and TGFA genes contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate." *PLoS One* 7(9): e45441.
- Ludwig, K. U., A. C. Bohmer, M. Rubini, P. A. Mossey, S. Herms, S. Nowak, H. Reutter, M. A. Alblas, B. Lippke, S. Barth, M. Paredes-Zenteno, S. G. Munoz-Jimenez, R. Ortiz-Lopez, T. Kreuzsch, A. Hemprich, M. Martini, B. Braumann, A. Jager, B. Potzsch, A. Molloy, B. Peterlin, P. Hoffmann, M. M. Nothen, A. Rojas-Martinez, M. Knapp, R. P. Steegers-Theunissen and E. Mangold (2014). "Strong association of variants around FOXE1 and orofacial clefting." *J Dent Res* 93(4): 376-381.
- Ludwig, K. U., E. Mangold, S. Herms, S. Nowak, H. Reutter, A. Paul, J. Becker, R. Herberz, T. AlChawa, E. Nasser, A. C. Bohmer, M. Mattheisen, M. A. Alblas, S. Barth, N. Kluck, C. Lauster, B. Braumann, R. H. Reich, A. Hemprich, S. Potzsch, B. Blaumeiser, N. Daratsianos, T. Kreuzsch, J. C. Murray, M. L. Marazita, I. Ruczinski, A. F. Scott, T. H. Beaty, F. J. Kramer, T. F. Wienker, R. P. Steegers-Theunissen, M. Rubini, P. A. Mossey, P. Hoffmann, C. Lange, S. Cichon, P. Propping, M. Knapp and M. M. Nothen (2012). "Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci." *Nat Genet* 44(9): 968-971.
- Ludwig, K. U., P. Wahle, H. Reutter, M. Paredes-Zenteno, S. G. Munoz-Jimenez, R. Ortiz-Lopez, A. C. Bohmer, P. Tessmann, S. Nowak, M. M. Nothen, M. Knapp, A. Rojas-Martinez and E. Mangold (2014). "Evaluating eight newly identified susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Mesoamerican population." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 100(1): 43-47.

- Mangold, E., K. U. Ludwig, S. Birnbaum, C. Baluardo, M. Ferrian, S. Herms, H. Reutter, N. A. de Assis, T. A. Chawa, M. Mattheisen, M. Steffens, S. Barth, N. Kluck, A. Paul, J. Becker, C. Lauster, G. Schmidt, B. Braumann, M. Scheer, R. H. Reich, A. Hemprich, S. Potzsch, B. Blaumeiser, S. Moebus, M. Krawczak, S. Schreiber, T. Meitinger, H. E. Wichmann, R. P. Steegers-Theunissen, F. J. Kramer, S. Cichon, P. Propping, T. F. Wienker, M. Knapp, M. Rubini, P. A. Mossey, P. Hoffmann and M. M. Nothen (2010). "Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate." *Nat Genet* 42(1): 24-26.
- Mei, Y., C. Bian, J. Li, Z. Du, H. Zhou, Z. Yang and R. C. Zhao (2013). "miR-21 modulates the ERK-MAPK signaling pathway by regulating SPRY2 expression during human mesenchymal stem cell differentiation." *J Cell Biochem* 114(6): 1374-1384.
- Meng, T., J. Y. Shi, M. Wu, Y. Wang, L. Li, Y. Liu, Q. Zheng, L. Huang and B. Shi (2012). "Overexpression of mouse TTF-2 gene causes cleft palate." *J Cell Mol Med* 16(10): 2362-2368.
- Moore, J. H. and S. M. Williams (2009). "Epistasis and its implications for personal genetics." *Am J Hum Genet* 85(3): 309-320.
- Moreno, L. M., M. A. Mansilla, S. A. Bullard, M. E. Cooper, T. D. Busch, J. Machida, M. K. Johnson, D. Brauer, K. Krahn, S. Daack-Hirsch, J. L'Heureux, C. Valencia-Ramirez, D. Rivera, A. M. Lopez, M. A. Moreno, A. Hing, E. J. Lammer, M. Jones, K. Christensen, R. T. Lie, A. Jugessur, A. J. Wilcox, P. Chines, E. Pugh, K. Doheny, M. Arcos-Burgos, M. L. Marazita, J. C. Murray and A. C. Lidral (2009). "FOXE1 association with both isolated cleft lip with or without cleft palate, and isolated cleft palate." *Hum Mol Genet* 18(24): 4879-4896.
- Mossey, P. A., J. Little, R. G. Munger, M. J. Dixon and W. C. Shaw (2009). "Cleft lip and palate." *Lancet* 374(9703): 1773-1785.
- Mostowska, A., K. K. Hozyasz, K. Wojcicka, B. Biedziak and P. P. Jagodzinski (2012). "Polymorphic variants at 10q25.3 and 17q22 loci and the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 94(1): 42-46.
- Mostowska, A., K. K. Hozyasz, P. Wojcicki, A. Lasota, I. Dunin-Wilczynska and P. P. Jagodzinski (2012). "Association of DVL2 and AXIN2 gene polymorphisms with cleft lip with or without cleft palate in a Polish population." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 94(11): 943-950.
- Murdoch, B., C. DelConte and M. I. Garcia-Castro (2012). "Pax7 lineage contributions to the mammalian neural crest." *PLoS One* 7(7): e41089.
- Murray, J. C. (2002). "Gene/environment causes of cleft lip and/or palate." *Clin Genet* 61(4): 248-256.
- Murthy, J., V. B. Gurramkonda, N. Karthik and B. V. Lakkakula (2014). "MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and risk of nonsyndromic orofacial clefts in a south Indian population." *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 78(2): 339-342.
- Murthy, P. S., S. Deshmukh, A. Bhagyalakshmi and K. Srilatha (2013). "Pre surgical nasoalveolar molding: changing paradigms in early cleft lip and palate rehabilitation." *J Int Oral Health* 5(2): 70-80.
- Nikopensius, T., S. Birnbaum, K. U. Ludwig, T. Jagomagi, M. Saag, S. Herms, M. Knapp, P. Hoffmann, M. M. Nothen, A. Metspalu and E. Mangold (2010). "Susceptibility locus for non-syndromic cleft lip with

or without cleft palate on chromosome 10q25 confers risk in Estonian patients." *Eur J Oral Sci* 118(3): 317-319.

- Paranaíba, L. M., S. N. de Aquino, A. Bufalino, H. Martelli-Junior, E. Graner, L. A. Brito, M. R. e Passos-Bueno, R. D. Coletta and M. S. Swerts (2013). "Contribution of polymorphisms in genes associated with craniofacial development to the risk of nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population." *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 18(3): e414-420.
- Phadke, S. R., A. K. Sharma and S. S. Agarwal (1994). "Anophthalmia with cleft palate and micrognathia: a new syndrome?" *J Med Genet* 31(12): 960-961.
- Rojas-Martinez, A., H. Reutter, O. Chacon-Camacho, R. B. Leon-Cachon, S. G. Munoz-Jimenez, S. Nowak, J. Becker, R. Herberz, K. U. Ludwig, M. Paredes-Zenteno, A. Arizpe-Cantu, S. Raeder, S. Herms, R. Ortiz-Lopez, M. Knapp, P. Hoffmann, M. M. Nothen and E. Mangold (2010). "Genetic risk factors for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Mesoamerican population: Evidence for IRF6 and variants at 8q24 and 10q25." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88(7): 535-537.
- Romitti, P. A., A. C. Lidral, R. G. Munger, S. Daack-Hirsch, T. L. Burns and J. C. Murray (1999). "Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts." *Teratology* 59(1): 39-50.
- Schliekelman, P. and M. Slatkin (2002). "Multiplex relative risk and estimation of the number of loci underlying an inherited disease." *Am J Hum Genet* 71(6): 1369-1385.
- Slavotinek, A. M., R. Chao, T. Vacik, M. Yahyavi, H. Abouzeid, T. Bardakjian, A. Schneider, G. Shaw, E. H. Sherr, G. Lemke, M. Youssef and D. F. Schorderet (2012). "VAX1 mutation associated with microphthalmia, corpus callosum agenesis, and orofacial clefting: the first description of a VAX1 phenotype in humans." *Hum Mutat* 33(2): 364-368.
- Song, T., D. Wu, Y. Wang, H. Li, N. Yin and Z. Zhao (2013). "Association of NAT1 and NAT2 genes with nonsyndromic cleft lip and palate." *Mol Med Rep* 8(1): 211-216.
- Uslu, V. V., M. Petretich, S. Ruf, K. Langenfeld, N. A. Fonseca, J. C. Marioni and F. Spitz (2014). "Long-range enhancers regulating Myc expression are required for normal facial morphogenesis." *Nat Genet* 46(7): 753-758.
- van Rooij, I. A., C. Vermeij-Keers, L. A. Kluijtmans, M. C. Ocke, G. A. Zielhuis, S. M. Goorhuis-Brouwer, J. J. van der Biezen, A. M. Kuijpers-Jagtman and R. P. Steegers-Theunissen (2003). "Does the interaction between maternal folate intake and the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms affect the risk of cleft lip with or without cleft palate?" *Am J Epidemiol* 157(7): 583-591.
- Velazquez-Aragon, J. A., M. A. Alcantara-Ortigoza, B. Estandia-Ortega, M. E. Reyna-Fabian, C. Cruz-Fuentes, S. Villagomez and A. Gonzalez-del Angel (2012). "Association of interactions among the IRF6 gene, the 8q24 region, and maternal folic acid intake with non-syndromic cleft lip/palate in Mexican Mestizos." *Am J Med Genet A* 158A(12): 3207-3210.
- Wu, T., M. D. Fallin, M. Shi, I. Ruczinski, K. Y. Liang, J. B. Hetmanski, H. Wang, R. G. Ingersoll, S. Huang, X. Ye, Y. H. Wu-Chou, P. K. Chen, E. W. Jabs, B. Shi, R. Redett, A. F. Scott, J. C. Murray, M. L. Marazita, R. G. Munger and T. H. Beaty (2012). "Evidence of gene-environment interaction for the

RUNX2 gene and environmental tobacco smoke in controlling the risk of cleft lip with/without cleft palate." Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 94(2): 76-83.

- Wu, T., K. Y. Liang, J. B. Hetmanski, I. Ruczinski, M. D. Fallin, R. G. Ingersoll, H. Wang, S. Huang, X. Ye, Y. H. Wu-Chou, P. K. Chen, E. W. Jabs, B. Shi, R. Redett, A. F. Scott and T. H. Beaty (2010). "Evidence of gene-environment interaction for the IRF6 gene and maternal multivitamin supplementation in controlling the risk of cleft lip with/without cleft palate." Hum Genet 128(4): 401-410.
- Xu, J., A. Turner, J. Little, E. R. Bleecker and D. A. Meyers (2002). "Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error?" Hum Genet 111(6): 573-574.
- Yuan, Q., S. H. Blanton and J. T. Hecht (2011). "Association of ABCA4 and MAFB with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate." Am J Med Genet A 155A(6): 1469-1471.
- Zhao, L., H. Saitsu, X. Sun, K. Shiota and M. Ishibashi (2010). "Sonic hedgehog is involved in formation of the ventral optic cup by limiting Bmp4 expression to the dorsal domain." Mech Dev 127(1-2): 62-72.
- Zimmerman, L., de Jesús-Escobar J., Harland M., (1996). "The Spemman Organizer Signal noggin Binds and Inactivates Bone Morphogenetic Protein 4." Cell 86: 599-606.

## TABLAS

**Tabla 1 .** Variantes analizadas en este estudio.

<b>Gen</b>	<b>Variante</b>	<b>Población</b>	<b>Referencia</b>
<i>ABCA4</i>	rs481931	Mex. de Texas	Yuan, 2011
<i>ABCA4</i>	rs560426	Honduras y Colombia	Lennon 2012
<i>FOXE1</i>	rs1443434	Honduras y Colombia	Lennon 2012
<i>FOXE1</i>	rs6478391	Multiétnico	Beaty 2013
<i>PAX7</i>	rs6659735	Iowa	Butali 2013
<i>PAX7</i>	rs742071	Alemanes y asiáticos	Ludwing 2012
<i>BMP4</i>	rs2738265	Asia	Chen 2012
<i>THADA</i>	rs4372955	Multiétnico	Beaty 2013
<i>THADA</i>	rs7590268	Alemanes y asiáticos	Ludwing 2012
<i>DVL2</i>	rs2074222	Polonia	Motowska 2012
<i>DVL2</i>	rs35594616	Polonia	Motowska 2012
<i>MAFB</i>	rs11696257	Mex. de Texas	Yuan, 2011
<i>NOG</i>	rs227731	Honduras y Colombia	Lennon 2012
<i>VAX1</i>	rs7078160	Asia	Butali 2013
<i>VAX1</i>	rs4752028	Asia	Butali 2013
<i>COL8A1</i>	rs793464	Multiétnico	Beaty 2013
<i>NTN1</i>	rs1880646	Multiétnico	Beaty 2013
<i>EPHA3</i>	rs7632427	Alemanes y asiáticos	Ludwing 2012
<i>RBFOX3</i>	rs2612753	Multiétnico	Beaty 2013
<i>ARGHGAP29</i>	rs10874840	Multiétnico	Beaty 2013
<i>ARGHGAP29</i>	rs11577575	Multiétnico	Beaty 2013
<i>GADD45G</i>	rs1007966	Multiétnico	Beaty 2013
<i>SPRY2</i>	rs8001641	Alemanes y asiáticos	Ludwing 2012

8q21.3	rs12543318	Alemanes y asiáticos	Ludwing 2012
TPM1	rs1873147	Alemanes y asiáticos	Ludwing 2012

**Tabla 2.** Características de la muestra de casos y controles analizados.

	Controles (n=263)	Casos (n=133)
Edad promedio (años)	1.33	5.5
Género	Varones 51% Mujeres 49%	Varones 68% Mujeres 32%
Consumo de ácido fólico (peri- pre o post- concepcional)	75.3%	47.3%
Historia familiar de LPHA (primer y segundo grado)	2%	16%
Lateralidad del defecto		44% Izquierdo 24% Derecho 31% Bilateral

**Tabla 3.** Variantes con asociación a LPHA.

Gen	Variante	Alelos	MAF control	MAF casos	OR, (p) Armitage	Corrección de Bonferroni
<i>PAX7</i>	rs742071	G/T	0.12 (T)	0.23 (T)	1.88 (0.00011)	0.0027
<i>BMP4</i>	rs2738265	C/G	0.43 (G)	0.51 (G)	1.36 (0.037)	0.61
<i>VAX1</i>	rs7078160	G/A	0.24 (A)	0.34 (A)	1.49 (0.004)	0.095
<i>VAX1</i>	rs4752028	T/C	0.25 (C)	0.35 (C)	1.52 (0.004)	0.095
<i>TPM1</i>	rs1873147	T/C	0.38 (C)	0.47 (C)	1.48 (0.013)	0.27
<i>SPRY2</i>	rs8001641	G/A	0.26 (A)	0.33 (A)	1.35 (0.042)	0.95
<i>NTN1</i>	rs1880646	T/C	0.25 (C)	0.18 (C)	0.67 (0.013)	0.27
<i>MAFB</i>	rs11696257	C/T	0.38 (T)	0.3 (T)	0.71 (0.032)	0.53

En negro se presentan las variantes asociadas a riesgo y en azul las variantes asociadas a protección

**Tabla 4.** Variantes con tendencia a la asociación con LPHA

Gen	Variante	Alelos	MAF control	MAF casos	OR, (p) prueba de Armitage
<i>ABCA4</i>	rs560426	A/G	0.47 (G)	0.55 (G)	1.25 (0.056)
<i>NOG</i>	rs227731	A/C	0.24 (C)	0.3 (C)	1.2 (0.073)

**Tabla 5.** Interacciones gen-gen y gen-ambiente detectadas por MDR.

Interacción	TA	CV	OR (CI 95%)	valor de p (100, 000 permutaciones)
Fólico-rs560426 ( <i>ABCA4</i> )	0.6441	10/10	3.36 (2.2-5.4)	p< 0.0001*
rs560426( <i>ABCA4</i> )- rs11696257( <i>MAFB</i> )	0.6101	10/10	2.73 (1.76-4.23)	p= 0.0006*
rs742071( <i>PAX7</i> )- rs10874840( <i>ARHGAP29</i> )	0.6056	10/10	3.14 (2.01-4.23)	p= 0.0004*
rs742071( <i>PAX7</i> )- rs1873147( <i>TPM1</i> )	0.6007	10/10	4.53 (2.69-7.60)	p= 0.0011*
rs2738265( <i>BMP4</i> )- rs4752028( <i>VAX1</i> )	0.6063	10/10	2.66 (1.70-4.15)	p= 0.001*
rs151873147 ( <i>TMP1</i> )- rs2235371 ( <i>IRF6</i> )	0.6363	10/10	3.27 (2.01-5.33)	p= 0.0001*
rs1880646 ( <i>NTN1</i> )- rs2235375 ( <i>IRF6</i> )	0.6535	10/10	3.74 (2.34-5.99)	p= 0.0002

\*Interacciones no descritas previamente en la literatura

**Tabla 6.** Comparación de variantes asociadas en este estudio con resultados en la literatura

Variante	Alelos MAYOR/menor	OR y p en nuestro estudio	Otros estudios	Población	OR, valor de p
<i>PAX7</i> rs742071	G/t	OR 1.88 p= 0.00011	Beaty, 2010	1908 tríos de Europa, US, China, Taiwan, Singapur, Corea y Filipinas.	OR 1.449 (95% CI; 1.261-1.666, p=1.84X10 <sup>-7</sup> ).
			Ludwig, 2012	Población Europea y Europea + Asiática. Meta-análisis de GWAS	p=7.02x10 <sup>-9</sup>
			Beaty, 2013	1108 tríos de Europa y Filipinas.	OR 1.43 (95%CI=1.21-1.66; p=1.59 x10 <sup>-7</sup> )
			Böhmer, 2013	Muestra de 1,108 tríos de ascendencia europea.	OR <sub>net</sub> 1.36 (95% CI:0.96-1.91 OR <sub>hom</sub> 2.08 (95% CI: 1.36-3.17)
			de Aquino, 2013	Población brasileña, 505 pacientes y 594 controles.	OR 1.29(95% CI=1.09-1.53) p=0.005
			Aldharae, 2014	Población árabe de Yemen, 242 NSCLP casos y 429 controles	p=0.08. OR <sub>net</sub> :0.78 (95% CI; 0.54-1.12), OR <sub>hom</sub> :0.68 (95% CI; 0.43-1.07)
<i>BMP4</i> rs2738265	C/g	OR 1.36 p= 0.037	Beaty, 2010	1908 tríos de Europa, US, China, Taiwan, Singapur, Corea y Filipinas	No asoció en este estudio.
			Chen, 2012	297 tríos de Taiwan, Singapur, Corea y Maryland (EUA)	OR 1.33(95% CI; 1.01-1.77) p=0.04521
<i>VAX1</i> rs7078160	G/a	OR 1.49 p= 0.004	Rojas-Martínez, 2010	149 pacientes y 303 controles de origen maya	p=0.0198 OR <sub>net</sub> 1.43 (95% CI, 0.94-2.17) y OR <sub>hom</sub> 2 (95% CI, 1.03-3.89).
			Mangold, 2010	401 casos y 1,323 controles de origen de Europa Central	OR <sub>net</sub> 1.32(95%CI, 1.05-1.65) OR <sub>hom</sub> 2.17 (95% CI 1.32-3.56)
			Beaty, 2010	1908 tríos de Europa, US, China, Taiwan, Singapur, Corea y Filipinas.	OR:1.342(95% CI; 1.204-1.495, p=1.07X10 <sup>-7</sup> )
			Nikopensius, 2010	101 pacientes y 254 controles de Estonia.	P=0.008, RR <sub>net</sub> 1.64 (95% CI: 0.97-2.75) RR <sub>hom</sub> 4.68 (95% CI: 1.60-13.69).

			Pan, 2011	199 pacientes chinos y 210 controles.	No asoció en este estudio.
			Mostowska, 2011	206 casos de población polaca y 466 controles.	OR=4.536; (95% CI, 1.678-12.265) p=0.0012
			Nasser, 2012	384 pacientes y 384 controles, ascendencia Europa Central.	p=0.66.
			Ludwig 2012	Población Europea y Europea+Asiática. Primer meta-análisis.	p=2.81x10 <sup>-8</sup> , RR <sub>het</sub> : 1.459 (95% CI; 1.238-1.719), RR <sub>hom</sub> : 2.214 (95% CI; 1.555-3.153).
			Lennon, 2012	90 familias y 99 controles de Honduras y 26 trios de Colombia.	No asoció en este estudio.
			Butali, 2013	206 trios de Mongolia, 98 de Japón, 157 de Iowa y 190 familias múltiples de Filipinas.	rs7078160 p=7.4 X 10 <sup>-9</sup>
			Aldharae, 2014	Población árabe de Yemen, 242 NSCLP casos y 429 controles	p=0.03
VAX1 rs4752028	T/c	OR 1.52 p= 0.004	Mangold, 2010	401 casos y 1,323 controles de origen de Europa Central	p=2.67x10 <sup>-6</sup> , OR <sub>het</sub> :1.46 (95% CI; 1.14-1.87), OR <sub>hom</sub> :2.94 (95% CI; 1.76-4.9)
			Beaty, 2010	1908 trios de Europa, US, China, Taiwan, Singapore, Korea y Filipinas.	OR:1.284 (95% CI; 1.151-1.434, p=7.98E-06)
			Butali, 2013	206 trios de Mongolia, 98 de Japón, 157 de Iowa y 190 familias múltiples de Filipinas.	rs4752028 p=9.8 X10 <sup>-6</sup>
			Aldharae, 2014	Población árabe de Yemen, 242 NSCLP casos y 429 controles	p=0.033 OR <sub>het</sub> :1.84 (95% CI;1.28-2.66)
TPM1 rs1873147	T/c	OR 1.48 p=0.013	Pan, 2013	602 casos, 605 controles	OR 1.25 p=0.033
			Mangold, 2010	401 casos y 1,323 controles de origen de Europa Central	p=7.04x10 <sup>-7</sup> , OR <sub>het</sub> = 1.59, (95% CI 1.26-2.02) OR <sub>hom</sub> = 2.33, (95% CI: 1.53-3.54)
			Ludwig 2012	Población Europea y Europea+Asiática. Primer meta-análisis.	p=2.81x10 <sup>-8</sup> , RR <sub>het</sub> 1.467(CI, 95%; 1.25-1.71), RR <sub>hom</sub> 1.89(CI, 95%; 1.44-2.47).
			Aldharae, 2014	Población árabe de Yemen, 242 NSCLP casos y 429 controles	p=0.44 y OR <sub>het</sub> :1.24 (95% CI; 0.88-1.76), OR <sub>hom</sub> :0.97 (95% CI; 0.47-2.01)
			de Aquino, 2014	Población brasileña, 505 pacientes y 594 controles.	OR 1.27 (1.07-1.52) p=0. 027
SPRY2 rs8001641	G/a	OR 1.35 p= 0.042	Mangold, 2010	401 casos y 1,323 controles de origen de Europa Central	p=2.83x10 <sup>-7</sup> , OR <sub>het</sub> = 1.78, (95% CI 1.3-2.43) OR <sub>hom</sub> = 2.39 (95% CI: 1.71-3.34)
			Ludwig 2012	Población Europea y Europea+Asiática. Primer meta-análisis.	p=6.51x10 <sup>-11</sup> RR <sub>hom</sub> 2.41 (95%, CI; 1.84-3.16)
			de Aquino, 2014	Población brasileña, 505 pacientes y 594 controles.	OR 1.09 (95% CI 0.92-1.30) p= 0.048.

			Aldh3a2, 2014	Población árabe de Yemen, 242 NSCLP casos y 429 controles	$p=0.077$ OR <sub>het</sub> : 1.22 (95% CI;0.87-1.71), OR <sub>hom</sub> :2.99 (95% CI;1.72-5.2).
NTN1 rs1880646	T/c	OR 0.67 $p=0.013$	Beaty, 2010	1908 tríos de Europa, US, China, Taiwan, Singapur, Corea y Filipinas	OR 0.795 (95% CI 0.716-0.883) $p=1.90 \times 10^{-5}$
			Ludwig 2012	Población Europea y Europea+Asiática. Primer meta-análisis.	$p=3.96 \times 10^{-06}$
			Beaty,2013	1108 tríos de Europa y Filipinas.	OR 0.75 (95% CI 0.66-0.86) $p=2.23 \times 10^{-5}$
MAFB rs11696257	C/t	OR 0.71 $p=0.032$	Beaty, 2010	1908 tríos de Europa, US, China, Taiwan, Singapur, Corea y Filipinas	OR 0.705 (95% CI 0.636-0.781) $p=1.75 \times 10^{-11}$
			Yuan, 2010	170 tríos hispanos	$p=0.027$
			Fontoura, 2012	Brasil (caucásicos) 400 casos, 412 controles	$p=0.21$
			Lennon, 2012	90 familias y 99 controles de Honduras y 26 tríos de Colombia.	$p=0.3428$
			Ludwig 2012	Población Europea y Europea+Asiática. Primer meta-análisis.	$p=8.02 \times 10^{-06}$