



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN**

**HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"**

**"INTERACCIÓN GEN-AMBIENTE EN EL DESARROLLO DE LABIO Y PALADAR  
HENDIDO EN PACIENTES MEXICANOS. UN ESTUDIO DE FAMILIAS"**

**TESIS:**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN  
CIRUGIA PLÁSTICA Y RECONSTRUCTIVA**

**PRESENTA:**

**DR. RIGOBERTO ARÁMBURO GARCÍA**

**ASESORES:**

**DR. MATEO YUSEF JIMENEZ MURAT**

**MÉDICO ADSCRITO DE LA DIVISIÓN DE CIRUGÍA PLÁSTICA Y RECONSTRUCTIVA**

**M EN C. PAOLA VÁZQUEZ CÁRDENAS**

**INVESTIGADORA EN CIENCIAS MÉDICAS A**

**CIUDAD DE MÉXICO A FEBRERO DEL 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

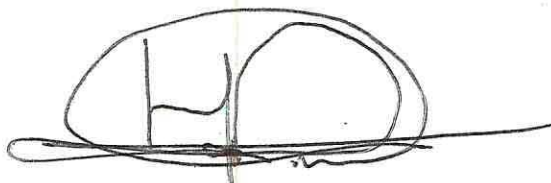
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

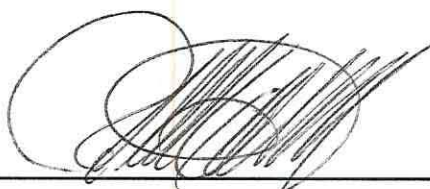
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"

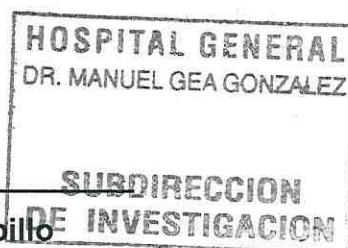
AUTORIZACIONES



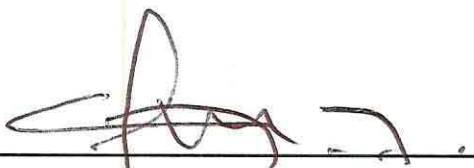
**Dr. Héctor Manuel Prado Calleros.**  
Director de Enseñanza e Investigación.



**Dr. José Pablo Maravilla Campillo**  
Subdirector de Investigación Biomédica

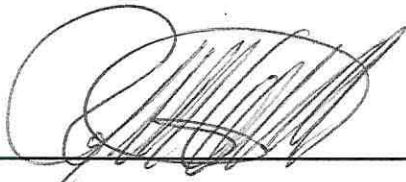


**Dra. Laura Andrade Delgado**  
Jefe de la División de Cirugía Plástica y Reconstructiva



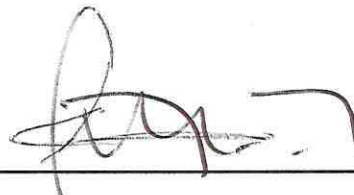
**Dr. Yusef Mateo Jimenez Murat**  
Asesor Metodológico y Adscrito de la División de Cirugía Plástica y Reconstructiva.

Este trabajo de tesis con número de registro: **05-97-2016** presentado por el Dr. Rigoberto Arámburo García se presenta en forma con visto bueno por los tutores principales de la tesis Dr. Mateo Yusef Jiménez Murat y la M en C. Paola Vázquez Cárdenas con fecha de febrero del 2019 para su impresión final.



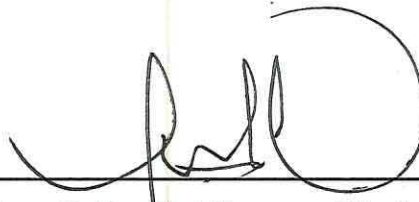
---

**Dr. José Pablo Maravilla Campillo**  
**Subdirector de Investigación**  
**Biomédica**



---

**Dr. Mateo Yusef Jiménez Murat**  
**Investigador principal**



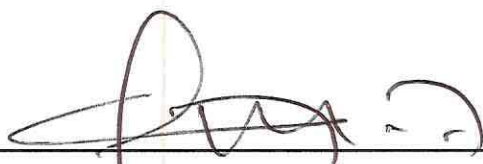
---

**M en C. Paola Vázquez Cárdenas**  
**Investigador asociado**

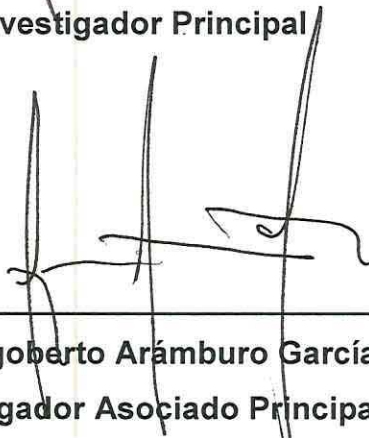
**“INTERACCIÓN GEN-AMBIENTE EN EL DESARROLLO DE LABIO Y  
PALADAR HENDIDO EN PACIENTES MEXICANOS: UN ESTUDIO DE  
FAMILIAS”**

Este trabajo fue realizado en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” en la División de Cirugía Plástica y Reconstructiva bajo la dirección de Dr. Mateo Yusef Jiménez Murat y de la M en C. Paola Vázquez Cárdenas con el apoyo de adscritos de la División quienes orientaron y aportaron a la conclusión de este trabajo.

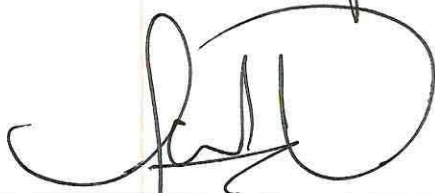
**COLABORADORES:**



**Dr. Mateo Yusef Jiménez Murat**  
**Investigador Principal**



**Dr. Rigoberto Arámburo García**  
**Investigador Asociado Principal**



**M en C. Paola Vázquez Cárdenas**  
**Investigador Asociado**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres este triunfo, fruto de su tenacidad, coraje y amor. Después de 12 años de formación me siento muy orgulloso de obtener el título de especialista.

Este trabajo fue posible por la valiosa colaboración de la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, a las doctoras Teresa Tusié y Hortensia Moreno. Asimismo, agradezco a la M. En C. Paola Vazquez Cardenas por su asesoría metodológica por 3 años.

A la Dra. Araceli Pérez González por motivarme a desarrollar esta línea de investigación y por sus diversos apoyos para que este proyecto sea una realidad.

Al Dr. Mateo Yusef Jimenez Murat y al Dr. Rogelio Martínez Wagner por su asesoría en el desarrollo del proyecto y por la captación constante de pacientes candidatos al protocolo.

Este proyecto se realizó con recursos otorgados por CONACyT. Financiamiento FOSSIS-1-2017-289947.

## INDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>2. INTRODUCCION</b>	<b>8</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>11</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>12</b>
<b>5. DISCUSION</b>	<b>14</b>
<b>6. CONCLUSION</b>	<b>18</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>20</b>
<b>8. TABLAS</b>	<b>25</b>

## 1. RESUMEN

**PALABRAS CLAVE:** labio hendido; paladar hendido; variantes genéticas, interacción gen-ambiente; malformaciones congénitas

**INTRODUCCION.** La malformación craneofacial más común es el labio y paladar hendido (LPH). La etiología de este padecimiento es multifactorial, resultado de la interacción de factores ambientales y genéticos. Se han descrito variantes genéticas relacionados con LPH, pero existen pocos estudios en población mexicana, en particular analizando familias.

**OBJETIVO.** Identificar los factores ambientales de riesgo y su interacción con las variantes genéticas en la población mexicana implicadas en el desarrollo de LPH.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** Se incluyeron pacientes con LPH no sindrómicos y con un familiar de primer grado afectado. Estudio observacional, ambispectivo y transversal con un diseño de análisis de asociación intrafamiliar con familias extendidas. La asociación genética se evaluó usando la prueba de desequilibrio de transmisión (TDT) basada en familias. La interacción gen-ambiente se evaluó usando regresión logística condicional con pseudocontroles genéticos. Ambos métodos son robustos ante la estratificación poblacional derivada de la reciente mezcla de grupos ancestrales característico de la población mestiza mexicana.

**RESULTADOS.** Se incluyeron 27 familias, éstas al menos incluyen al probando y la madre. Identificamos una asociación estadísticamente significativa entre la variante rs642961 del gen *IRF6*, donde el alelo G de esta variante mostró una transmisión excedida incrementando el riesgo de LPH 3.3 veces (OR=3.3; p=0.05). Entre los factores ambientales de importancia, las madres estuvieron expuestas a tabaquismo pasivo en 11.1% durante el embarazo, el 70% de las ellas tomaron ácido fólico durante el embarazo y únicamente el 11% previo al embarazo. En el análisis de interacción gen-ambiente, se identificó una tendencia protectora del SNP rs1546124 en el gen *CRISPDL2* en interacción con la edad avanzada del padre y de la madre (OR=0.85, 0.71-1.01 ; p=0.075 y OR=0.86, 0.69-1.05; p=0.15, respectivamente).

**CONCLUSIONES.** Las variantes genéticas de *IRF6* se asocian con LPH no sindrómico. Identificamos una posible interacción gen-ambiente entre la variante rs1546124 del gen *CRISPDL2*, donde el riesgo de edad avanzada de ambos padres parece atenuarse con la presencia de esta variante. Sin embargo, se requiere una muestra mayor para confirmar estos hallazgos.



## 2. INTRODUCCIÓN

Las hendiduras orofaciales son la malformación craneofacial más común en recién nacidos (1). Este padecimiento es un defecto congénito originado por una falla en la fusión de las prominencia fronto-nasal y las prominencias maxilares entre la 4ta y 12va semanas de gestación. El espectro incluye pacientes con labio hendido aislado, labio y paladar hendido y el paladar hendido aislado; cada uno difiere con respecto a la embriología, etiología, genes causantes, anomalías asociadas y el riesgo de recurrencia.

La prevalencia de hendiduras orofaciales varía entre países de acuerdo al método de determinación y clasificación. En los Estados Unidos, la Red Nacional de Defectos al Nacimiento del 2007 al 2011 reportó una prevalencia general de 14.5 casos por cada 10,000 nacidos vivos, la prevalencia de labio hendido aislado reportada es de 3.1 casos en 10,000 nacidos vivos, 5.6 por 10,000 nacidos vivos en labio y paladar hendido, y de 5.9 por 10,000 nacidos vivos para paladar hendido aislado (2).

La menor prevalencia del padecimiento se ha encontrado en población afroamericana (10.2/10,000 nacidos vivos) y la más alta en indios americanos o nativos de Alaska (20.5/10,000 nacidos vivos) (3).

En México, el labio y paladar hendido no sindrómico ocupa el primer lugar entre todas las malformaciones congénitas. La tasa de prevalencia es de 1/500 a 1/2500 y la tasa de incidencia es de 1 a 1.1 casos por cada 1000 recién nacidos vivos, particularmente en los Estados del centro y sureste del país (4). De acuerdo al género, la mayor prevalencia se observa en hombres (2).

En cuanto a su presentación clínica, según lo reportado por Fraser y Calnan, 21% de los casos corresponden a labio hendido aislado; 46% labio y paladar asociados y 33% como paladar hendido aislado (5).

Se ha determinado mediante estudios genéticos y epidemiológicos que la etiología del labio y paladar hendido es multifactorial, resultado de una combinación de genes (e.g variantes genéticas) y factores ambientales (6).

El proceso del desarrollo del tercio medio de la cara es regulado por genes que controlan el patrón celular, la proliferación, la comunicación extracelular y la diferenciación (7). Se estima que entre 2-20 genes interactúan en el proceso de una hendidura facial (8).

Los procesos de desarrollo frontonasal y maxilar están influenciadas por una variedad de señales que incluyen a los factores de crecimiento pertenecientes a cuatro familias de factores protéicos: 1) la familia del factor de crecimiento fibroblástico (*FGF*)(9), 2) la familia Hedghog (HH), 3) la familia Wingless (WNT) y 4) la familia del factor de crecimiento transformante beta 3 (*FCT $\beta$ 3*) (10), que incluye las proteínas morfogenéticas del hueso (*BMPs*) y las activinas (11). Las alteraciones en estas proteínas y sus vías de señalización pueden dar origen a defectos disruptivos de diversa complejidad en la formación del labio y paladar primario. El *FCT $\beta$ 3* participa en la formación del paladar secundario, mientras que el factor de transcripción *MSX-1* participa en la fusión del labio y paladar (12).

Se han realizado diversos estudios que han permitido identificar genes o *loci* de susceptibilidad para la presencia de labio y/o paladar hendido (13-19), entre estos se encuentran *ABCA4*(20), *IRF6* (21), la región codificante *8q24*(22), *VAX1* (23), *CRISPLD2*(24), *MAFB*(25) y el polimorfismo de *MTHFR*(26). Estas regiones han demostrado significancia a escala genómica mediante estudios de ligamento y/o estudios de asociación.

A su vez, distintos agentes se han relacionado con un aumento en la frecuencia de malformaciones en el tercio medio facial. La toma de medicamentos no prescritos que incrementan el riesgo de fisuras orofaciales incluyen algunos corticosteroides y anticonvulsivos, tomados 1 mes antes de la concepción hasta los 3 meses después de la concepción (27). Entre ellos, se ha descrito que la prednisona aumenta el riesgo de fisura de paladar en 3.4 veces (28).

Los anticonvulsivos (fenitoína/hidantoína, oxazolidinonas y el ácido valproico) son agentes que pueden producir fisuras de labio y paladar, aunque su asociación es inconsistente (29). En este sentido, se ha propuesto que el efecto teratogénico de los medicamentos anticonvulsivos es mediado por la interferencia con el metabolismo del ácido fólico (30).

El tabaquismo materno se ha asociado también con un aumento en labio y paladar hendido. Los meta-análisis muestran que el riesgo relativo para el desarrollo de labio y paladar hendido es de 1.3 a 1.5 entre madres que fuman (31). Se ha reportado que el hábito de fumar tiene un efecto aditivo con algunas variantes genéticas en *MSX1*, incrementando el riesgo 7.16 veces en pacientes portadores de la variante de riesgo y con exposición a tabaco durante el embarazo (32).

Además, el consumo de alcohol materno aumenta el riesgo de fisura labio palatina entre 1.5 y 4.7 veces (33). Las madres que consumen más de 5 tragos por ocasión tienen 3.4 veces más riesgo de dar a luz un niño con fisura labio palatina (18). El riesgo asociado al consumo de alcohol en altas dosis en periodo cortos de tiempo se incrementa con la presencia de una variante en el gen de la enzima alcohol deshidrogenasa *ADH1C* (34).

Adicionalmente, la deficiencia de folatos durante el embarazo ha sido descrita en estudios observacionales y ensayos clínicos como un factor de riesgo importante para defectos congénitos (35). Otros factores de riesgo maternos durante el embarazo son la obesidad materna, la hipoxia durante la gestación, factores ocupacionales de los padres, contracciones uterinas y exposición a humo de leña (36).

El objetivo del presente estudio es identificar las variantes genéticas implicadas en el desarrollo de labio y paladar hendido y su interacción con distintos factores ambientales a través del estudio de familias.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, ambispectivo y transversal con un diseño de análisis de asociación intrafamiliar. Se incluyeron pacientes tratados en la clínica de labio y paladar hendido de la División de Cirugía Plástica y Reconstructiva del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" que tuvieran un familiar de primer grado (padre, madre o hermano) afectado.

Se tomaron dos muestras sanguíneas a cada miembro de la familia para el estudio genético. Además, se realizó un cuestionario que incluía información perinatal y la potencial exposición a factores de riesgo durante el embarazo.

Una vez obtenida la muestra para estudio genético, se realizó la extracción de DNA genómico con un kit comercial (Qlamp 96 DNA Bood Kit-12, Qiagen) en la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del INCMNSZ, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se evaluó la concentración y pureza del DNA por medio de cuantificación mediante espectrofotometría por Nanodrop.

Para estimar la pureza del DNA se consideró la proporción de la absorbancia a 260 y 280 nm. Además, de conocer la concentración y pureza del DNA, se evaluó la integridad del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

La genotipificación se realizó utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por medio de la plataforma de genotipificación de QuantStudio en el INCMNSZ. Se utilizó el ensayo TaqMan® con sondas etiquetadas con para detectar objetivos específicos de secuencia, diseñadas para las variantes de interés. La discriminación alélica se realizó por medio del sistema StepOne.

Se analizaron ocho variantes genéticas de tipo SNP en genes candidatos previamente vinculados al desarrollo de LPH, los cuales se seleccionaron por haber sido asociados previamente con LPH en al menos un estudio previo en población Europea, asiática o americana, que hayan sido confirmadas por replicación, secuenciación, análisis funcional y/o estudios de expresión o que

contribuyan en un síndrome mendeliano con labio o paladar hendido como una de sus características.

### *Análisis estadístico*

Se hizo un control de calidad para identificar potenciales errores mendelianos. Para evaluar la asociación genética de cada variante con LPH, se aplicó la prueba de desequilibrio de transmisión en familias: TDT por sus siglas en inglés (*Transmission Disequilibrium Test*). Esta prueba permite evaluar el exceso de transmisión de un alelo de padres heterocigotos a un hijo afectado (37). Se usó el paquete PLINK ([zzz.bwh.harvard.edu/plink/](http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/))

Para evaluar la interacción gen-ambiente se utilizaron únicamente aquellas familias que contaban con genotipos en ambos padres. Primero se construyeron pseudo-hermanos para cada hijo afectado, asignando un genotipo condicionado a los genotipos de los padres. Esto es, a cada pseudo-hermano se le asigna un genotipo que depende de los genotipos de los padres pero que no fue heredado por el caso. De esta manera a cada caso se le parea 3 controles y se usan modelos de regresión logística condicional(38).

El TDT y la regresión logística condicional usando pseudo-contrroles genéticos son métodos basados en diseños familiares. Es decir, son métodos robustos a la estratificación poblacional originada por la mezcla reciente entre grupos étnicos con diferentes frecuencias alélicas. El uso de estos diseños es una alternativa al estudio de casos y controles con modelos ajustados por un índice de ancestría.

Para estos análisis se utilizó el paquete estadístico Stata v12.

## **3. RESULTADOS**

Se captaron 52 familias durante el estudio. Dos familias fueron excluidas por no haber concordancia en la consanguinidad y 23 familias no fueron incluidas por no contar con la muestra de todos los integrantes de la familia nuclear (e.g no se contaba con muestra y datos de alguno de los padres) Por lo tanto, se analizaron 27 familias, las cuales están integradas por al menos 2 personas y como máximo 5 personas. 12 familias (44.4%) estaban conformadas por 4 personas, 8 familias

(29.63%) por 3 personas, 4 familias (14.81%) por 5 personas y 3 familias (11.11%) por 2 personas. (Tabla 1).

Se analizaron factores perinatales frecuentemente asociados con LPH. Se identificó que las madres de los productos afectados tuvieron un IMC promedio de 26.5 kg/m<sup>2</sup> (18.6 - 35.0) antes del embarazo correspondiente al producto con diagnóstico de LPH (Tabla 2). En cuanto a la exposición a factores de riesgo durante el embarazo, ninguna madre refirió haber fumado en el primer trimestre del embarazo, sin embargo, 11 madres de los casos afectados (40.7%) estuvieron expuestas al humo del tabaco de forma pasiva, por tabaquismo del padre. Se identificó que 19 madres (70.4%) tomaron ácido fólico durante el primer trimestre del embarazo y de estas, únicamente 5 (20.8%) lo tomaron antes del embarazo; en todos los casos el consumo fue de 400 ug cada 24 horas. El suplemento en presentación de multivitamínico fue consumido por 10 madres (37.04%). Otras exposiciones como alcoholismo, toma de medicamentos, uso de drogas, exposición a humo de leña, así como complicaciones durante el embarazo no se presentaron en nuestra población o, bien la frecuencia fue muy baja. (Tabla 3).

A través del análisis TDT, identificamos una asociación nominalmente significativa entre la variante rs642961 del gen *IRF6*, donde el alelo G mostró una transmisión excedida mientras el alelo A fue transmitido raramente. Se estima que por cada alelo G transmitido, el riesgo de LPH incrementa 3.3 veces (OR=3.3; p=0.05). (Tabla 4).

Se exploraron asimismo, potenciales interacciones entre las variantes genéticas analizadas y los factores ambientales perinatales de riesgo. La variante rs13041247 del gen *MAFB* en interacción con la suplementación con ácido fólico durante el embarazo evidenció un posible efecto de riesgo, aunque esta observación no alcanzó significancia estadística (OR=8, p=0.10, IC95% 0.65-97.31). (Tabla 5)

Por su parte, en el análisis de interacción gen-ambiente, identificamos una tendencia protectora del SNP rs1546124 en el gen *CRISPD2* en interacción con la edad avanzada del padre y de la madre (OR=0.85, p=0.075, IC 95% 0.71-1.01 y

OR=0.86,  $p=0.15$ , IC 0.69-1.05; respectivamente) con significancia marginal en ambos análisis. (Tabla 5)

Adicionalmente, encontramos que la variante rs1801131 del gen *MTHFR* en interacción con la ingesta del multivitamínico en el primer trimestre del embarazo parece ser un factor de riesgo para el desarrollo de LPH (OR=8,  $p=0.054$ , IC 95% 0.96-66.44). (Tabla 5)

#### 4. DISCUSIÓN

El labio y paladar hendido tiene una etiología multifactorial dada por una combinación de variantes genéticas y factores ambientales (6). Las implicaciones a largo plazo de este padecimiento tienen enorme impacto tanto para la salud, como en la adaptación social de los pacientes y sus familias. Se han descrito distintas variantes genéticas en asociación con LPH, tanto a través de estudios de ligamiento (21), estudios de genes candidatos (13) o de análisis de asociación al genoma completo (16).

El gen candidato para LPH más estudiado y ampliamente replicado es *IRF6* (1q32.3-q41). Inicialmente, una mutación en este gen había sido identificada como el factor etiológico del síndrome de Van der Woude, el más común de los síndromes con LPH como uno de sus rasgos, y que se presenta con un patrón de herencia autosómico dominante (39). Las variantes alélicas frecuentes en *IRF6* se han asociado con labio y paladar hendido en diversas poblaciones, y se ha documentado al menos una variante con amplia evidencia confirmatoria para su asociación con LPH, incluyendo evidencia en modelos animales (40).

En un estudio publicado por Ibarra y colaboradores, quienes analizaron 292 pacientes y se encontró asociación con el genotipo rs1319435-C ( $P=0.02$ ) en 73 pacientes en comparación con 219 pseudocontroles, mientras que el genotipo rs1319435-T está relacionada con la protección ( $P = 0.041$ ) en un diseño de tríada (41)

En nuestro estudio, se confirma la asociación de otra variante en *IRF6*, la variante rs642961 con la presencia de LPH en las familias estudiadas. La asociación de esta variante, no se modula por la exposición a factores ambientales de riesgo, por lo que es posible que su efecto sea independiente de estas exposiciones. La variante rs642961 tiene un importante rol funcional a nivel molecular, ya que co-localiza con un elemento de respuesta a para el factor de transcripción AP-2a en la región promotora del gen *IRF6*. La presencia del alelo G disminuye la afinidad del factor de transcripción a su elemento de respuesta alterando la función de *IRF6* en el desarrollo de las estructuras orofaciales. Dos meta-análisis han evaluado la contribución de la variante rs642961 con LPH(21, 42).

El primer metanálisis se realizó incorporando un análisis de subgrupos por etnia y tipo de hendidura, los cuales revelaron mayores ORs (razón de momios) entre caucásicos y asiáticos y entre todos los tipos de hendidura(42). El segundo estudio encontró también que el alelo rs642961 A tiene efecto sobre el riesgo para LPH en poblaciones asiáticas y caucásicas (21). En ambos meta análisis el alelo asociado al riesgo es el A, mismo que se asocia en nuestra muestra, sin embargo, cabe señalar que en estos meta-análisis se incluyen estudios con diseño de casos y controles realizados en poblaciones latinoamericanas como la brasileña y la mexicana, considerándolas en conjunto con muestras de población caucásica. Por lo tanto, estudios con diseños de familias, que permiten disminuir la variabilidad dada por la mezcla étnica, aportan al conocimiento sobre la etiología del LPH en nuestra población.

Las otras regiones y genes candidatos analizados tienen menos evidencia confirmatoria que *IRF6* y y múltiples líneas de investigación están actualmente en curso para entender el papel de otros genes en el desarrollo de LPH. En nuestra población no se identificaron asociaciones genéticas con los demás genes evaluados.

La región 16q24 donde se ubica el gen *CRISPLD2* es una región candidata por estudios de ligamento en poblaciones africanas, brasileñas y chinas, en las que se ha asociado con LPH. En nuestra población se identificó una interacción gen-ambiente con el incremento de la edad del padre y de la madre donde el ser



portador del alelo menor de esta variante parece proteger del riesgo conferido por la edad. En este sentido, es interesante que a través de meta-análisis de miles de casos (44) reportaron riesgo incrementado de un producto con LPH en padres mayores de 40 años y de madres entre 35-39 años. Es de interés que nuestro estudio señala por primera vez, la interacción entre la edad de ambos padres y la variante rs1546124 del gen *CRISPLD2*. Este hallazgo es valioso y debe confirmarse con una muestra mayor.

Por su parte, la variante rs13041247 en el gen *MAFB* (20q12), se ha identificado como una variante asociada con el riesgo a LPH mediante estudios recientes de asociación al genoma completo (GWAS). Hasta el momento, no se han reportado en la literatura interacciones gen-ambiente. En nuestro estudio identificamos que el término de interacción entre esta variante y la suplementación con ácido fólico, tanto preconcepcional como durante el embarazo, confiere un efecto de riesgo en nuestra población.

Adicionalmente, se ha determinado que existe una asociación entre pacientes con labio y paladar hendido y el polimorfismo C677T del gen *MTHFR* (metileno-tetrahidrofolato reductasa) que regula el metabolismo de folatos y la conversión de metionina a homocisteína (45, 46). La deficiencia de folatos resulta en niveles elevados de homocisteína en sangre materna lo que tiene un potencial efecto teratogénico en las células de la cresta neural y en el desarrollo de las estructuras faciales (47, 48).

En este sentido, Weisberg y Shotelersuk demostraron que los individuos heterocigotos para la variante C677T, tienen una reducción en la actividad *in vitro* de la *MTHFR* del 40-50% y un perfil bioquímico similar al observado en individuos homocigotos para el alelo C677T, con incremento en los niveles de homocisteína y disminución de los niveles de folatos (48-50).

La prevalencia del polimorfismo varía dependiendo de la población estudiada, se ha encontrado con mayor frecuencia en población italiana (44%); en hispanos de California (42%) y en 34% en población japonesa (48). En la población mexicana el polimorfismo C667T del gen *MTHFR* es el más frecuente ya que en mestizos se

presenta entre el 50 y el 58.5% (51). Estudios de la población en Guadalajara, Jalisco, México reportan una frecuencia del 44% y en población Tarahumaras (Sierra de Chihuahua, México) del 34% (51).

De forma interesante. en nuestro estudio, identificamos que la presencia de la variante C667T de *MTHFR* se asocia con la presencia de LPH en interacción con la suplementación con multivitaminico durante el embarazo. Se reconoce que las variantes genéticas en el gen *MTHFR* modifican los requerimientos de folatos. Ashfield-Want, et al. (52) demostraron que los sujetos heterocigotos para la variante C677T responden satisfactoriamente a intervenciones con folatos naturales o con suplementación de ácido fólico pero requieren de una mayor ingesta para alcanzar la misma concentración plasmática de folatos y homocisteína que los sujetos homocigotos para el alelo C. Con base en este y otros estudios, se reconoce que el metabolismo de folatos está bajo control genético y que la heterogeneidad genética explica un porcentaje importante (mayor a 40%) de la variación en la bioeficacia (fracción del nutrimento absorbido que es convertido a la forma bioactiva) de los folatos (53).

El conocimiento de la frecuencia de esta variante genética en nuestra población, su efecto sobre el metabolismo de folatos, su modulación por la dosis de ácido fólico suplementado y su contribución para el desarrollo de diversas enfermedades relacionadas con el ambiente intrauterino podría contribuir al establecimiento de valores de referencia para la ingesta de folatos específicos para poblaciones en riesgo como la analizada en este estudio.

El presente trabajo es el primer estudio que realiza un análisis de asociación intrafamiliar en la población mexicana, para identificar posibles interacciones gen-ambiente. El enfoque de asociación intrafamiliar utilizado en este proyecto tiene la ventaja de no requerir del ajuste por estratificación poblacional, una de las principales limitaciones de los estudios publicados al momento para la población mestiza mexicana.

En el presente trabajo la principal limitación al momento es el tamaño de muestra, en donde por distintas condiciones socioeconómicas de las familias involucradas

no fue posible analizar las muestras de ambos padres, ya sea porque el padre estaba ausente o porque no se contaba con los recursos económicos para el traslado del padre a la CdMx. El efecto del limitado tamaño de muestra se puede evidenciar por la amplitud del intervalo de confianza para las asociaciones de la variante rs1801131 de *MTHFR* con la suplementación con multivitamínico (OR 8, IC95% 0.96-66.4), y de la variante rs13041247 del gen *MAFB* con la suplementación de ácido fólico (OR 8, IC95% 0.66-97.30). Por lo tanto, la confirmación de las observaciones derivadas de este trabajo requiere del análisis de una muestra mayor de familias, particularmente para evidenciar posibles interacciones gen-ambiente de forma robusta, lo cual permitiría emitir recomendaciones específicas respecto a factores de riesgo potencialmente modificables.

En este sentido, se continuará con el reclutamiento de familias a partir de muestreos en campo en distintas localidades con alta prevalencia de LPH en el país. Este trabajo cuenta con financiamiento vigente del Fondo Sectorial de Investigación en Salud (CONACyT FOSISS-2017-289947) para este propósito.

## **5. CONCLUSIONES.**

Las variantes genéticas de IRF6 se asocian con LPH no sindrómico en familias mexicanas afectadas con al menos dos miembros. Identificamos una posible interacción gen-ambiente entre la variante rs1546124 del gen *CRISPD2*, donde el riesgo de edad avanzada de ambos padres parece atenuarse con la presencia de esta variante. Sin embargo, se requiere una muestra mayor para confirmar estos hallazgos.

## **6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.**

1. Spira M. Anastomosis of masseteric nerve to lower division of facial nerve for correction of lower facial paralysis. Preliminary report. *Plast Reconstr Surg.* 1978;61(3):330-4.
2. Mai CT, Cassell CH, Meyer RE, Isenburg J, Canfield MA, Rickard R, et al. Birth defects data from population-based birth defects surveillance programs in the United States, 2007 to 2011: highlighting orofacial clefts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2014;100(11):895-904.

3. Lowry RB, Johnson CY, Gagnon F, Little J. Segregation analysis of cleft lip with or without cleft palate in the First Nations (Amerindian) people of British Columbia and review of isolated cleft palate etiologies. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2009;85(6):568-73.
4. Tanaka SA, Mahabir RC, Jupiter DC, Menezes JM. Updating the epidemiology of cleft lip with or without cleft palate. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129(3):511e-8e.
5. van Aalst JA, Kolappa KK, Sadove M. MOC-PSSM CME article: Nonsyndromic cleft palate. *Plast Reconstr Surg.* 2008;121(1 Suppl):1-14.
6. Regezi JA, Zarbo RJ, Regev E, Pisanty S, Silverman S, Gazit D. p53 protein expression in sequential biopsies of oral dysplasias and in situ carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1995;24(1):18-22.
7. Young DL, Schneider RA, Hu D, Helms JA. Genetic and teratogenic approaches to craniofacial development. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(3):304-17.
8. Christensen K, Fogh-Andersen P. Cleft-twin sets in Finland 1948-1987. *Cleft Palate Craniofac J.* 1996;33(6):530.
9. Shen L, Cong W, Wang R, Xiao J. [Dynamic expression of wnt and fibroblast growth factor ligands in cleft palate induced by retinoic acid]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2011;29(1):62-5.
10. Everson JL, Fink DM, Yoon JW, Leslie EJ, Kietzman HW, Ansen-Wilson LJ, et al. Sonic hedgehog regulation of *Foxf2* promotes cranial neural crest mesenchyme proliferation and is disrupted in cleft lip morphogenesis. *Development.* 2017;144(11):2082-91.
11. Zhang Z, Song Y, Zhao X, Zhang X, Fermin C, Chen Y. Rescue of cleft palate in *Msx1*-deficient mice by transgenic *Bmp4* reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis. *Development.* 2002;129(17):4135-46.
12. Kumari P, Singh SK, Raman R. TGFbeta3, MSX1, and MMP3 as Candidates for NSCL+/-P in an Indian Population. *Cleft Palate Craniofac J.* 2018:1055665618775727.
13. Beaty TH, Murray JC, Marazita ML, Munger RG, Ruczinski I, Hetmanski JB, et al. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet.* 2010;42(6):525-9.

14. Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC, Taylor JA, Saugstad OD, et al. Variants of developmental genes (TGFA, TGFB3, and MSX1) and their associations with orofacial clefts: a case-parent triad analysis. *Genet Epidemiol.* 2003;24(3):230-9.
15. Leslie EJ, Taub MA, Liu H, Steinberg KM, Koboldt DC, Zhang Q, et al. Identification of functional variants for cleft lip with or without cleft palate in or near PAX7, FGFR2, and NOG by targeted sequencing of GWAS loci. *Am J Hum Genet.* 2015;96(3):397-411.
16. Marazita ML. The evolution of human genetic studies of cleft lip and cleft palate. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012;13:263-83.
17. Mi N, Hao Y, Jiao X, Zheng X, Shi J, Chen Y. A polymorphic marker associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in a population in Heilongjiang Province, northern China. *Arch Oral Biol.* 2015;60(2):357-61.
18. Rahimov F, Jugessur A, Murray JC. Genetics of nonsyndromic orofacial clefts. *Cleft Palate Craniofac J.* 2012;49(1):73-91.
19. Seto-Salvia N, Stanier P. Genetics of cleft lip and/or cleft palate: association with other common anomalies. *Eur J Med Genet.* 2014;57(8):381-93.
20. Peng HH, Chang NC, Chen KT, Lu JJ, Chang PY, Chang SC, et al. Nonsynonymous variants in MYH9 and ABCA4 are the most frequent risk loci associated with nonsyndromic orofacial cleft in Taiwanese population. *BMC Med Genet.* 2016;17(1):59.
21. Wattanawong K, Rattanasiri S, McEvoy M, Attia J, Thakkestian A. Association between IRF6 and 8q24 polymorphisms and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: Systematic review and meta-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2016;106(9):773-88.
22. Murray T, Taub MA, Ruczinski I, Scott AF, Hetmanski JB, Schwender H, et al. Examining markers in 8q24 to explain differences in evidence for association with cleft lip with/without cleft palate between Asians and Europeans. *Genet Epidemiol.* 2012;36(4):392-9.
23. Li D, Liu T, Meng X, Guo Q, Shi J, Hao Y, et al. Polymorphic variants in VAX1 and the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a population from northern China. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(14):e6550.
24. Mijiti A, Ling W, Maimaiti A, Tuerdi M, Tuerxun J, Moming A. Preliminary evidence of an interaction between the CRISPLD2 gene and non-syndromic cleft

lip with or without cleft palate (nsCL/P) in Xinjiang Uyghur population, China. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2015;79(2):94-100.

25. Mi N, Hao Y, Jiao X, Zheng X, Song T, Shi J, et al. Association study of single nucleotide polymorphisms of MAFB with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in a population in Heilongjiang Province, northern China. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2014;52(8):746-50.

26. Wang W, Jiao XH, Wang XP, Sun XY, Dong C. MTR, MTRR, and MTHFR Gene Polymorphisms and Susceptibility to Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2016;20(6):297-303.

27. Carmichael SL, Shaw GM. Maternal corticosteroid use and risk of selected congenital anomalies. *Am J Med Genet.* 1999;86(3):242-4.

28. Park-Wyllie L, Mazzotta P, Pastuszak A, Moretti ME, Beique L, Hunnisett L, et al. Birth defects after maternal exposure to corticosteroids: prospective cohort study and meta-analysis of epidemiological studies. *Teratology.* 2000;62(6):385-92.

29. Biale Y, Lewenthal H, Aderet NB. Congenital malformations due to anticonvulsive drugs. *Obstet Gynecol.* 1975;45(4):439-42.

30. Biale Y, Lewenthal H. Effect of folic acid supplementation on congenital malformations due to anticonvulsive drugs. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1984;18(4):211-6.

31. Wyszynski DF, Wu T. Use of US birth certificate data to estimate the risk of maternal cigarette smoking for oral clefting. *Cleft Palate Craniofac J.* 2002;39(2):188-92.

32. Beaty TH, Hetmanski JB, Zeiger JS, Fan YT, Liang KY, VanderKolk CA, et al. Testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design. *Genet Epidemiol.* 2002;22(1):1-11.

33. Munger RG, Romitti PA, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC, Hanson J. Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects. *Teratology.* 1996;54(1):27-33.

34. DeRoo LA, Wilcox AJ, Drevon CA, Lie RT. First-trimester maternal alcohol consumption and the risk of infant oral clefts in Norway: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol.* 2008;168(6):638-46.

35. Meethal SV, Hogan KJ, Mayanil CS, Iskandar BJ. Folate and epigenetic mechanisms in neural tube development and defects. *Childs Nerv Syst.* 2013;29(9):1427-33.
36. Fu MH, Chen W, Huang MZ, Wu XY. [Association between environmental risk factor exposure in the first trimester and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a case-control study]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2007;27(4):436-8.
37. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet.* 1993;52(3):506-16.
38. Schaid DJ. General score tests for associations of genetic markers with disease using cases and their parents. *Genet Epidemiol.* 1996;13(5):423-49.
39. Blanton SH, Cortez A, Stal S, Mulliken JB, Finnell RH, Hecht JT. Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A.* 2005;137A(3):259-62.
40. Letra A, Fakhouri W, Fonseca RF, Menezes R, Kempa I, Prasad JL, et al. Interaction between IRF6 and TGFA genes contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. *PLoS One.* 2012;7(9):e45441.
41. Ibarra-Arce A, Garcia-Alvarez M, Cortes-Gonzalez D, Ortiz de Zarate-Alarcon G, Flores-Pena L, Sanchez-Camacho S, et al. IRF6 polymorphisms in Mexican patients with non-syndromic cleft lip. *Meta Gene.* 2015;4:8-16.
42. Wang M, Pan Y, Zhang Z, Wang L. Three polymorphisms in IRF6 and 8q24 are associated with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: evidence from 20 studies. *Am J Med Genet A.* 2012;158A(12):3080-6.
43. Mangold E, Ludwig KU, Nothen MM. Breakthroughs in the genetics of orofacial clefting. *Trends Mol Med.* 2011;17(12):725-33.
44. Herkrath AP, Herkrath FJ, Rebelo MA, Vettore MV. Parental age as a risk factor for non-syndromic oral clefts: a meta-analysis. *J Dent.* 2012;40(1):3-14.
45. Goyette P, Rosenblatt D, Rozen R. Homocystinuria (methylenetetrahydrofolate reductase deficiency) and mutation of factor V gene. *J Inherit Metab Dis.* 1998;21(6):690-1.
46. Gaughan DJ, Barbaux S, Kluijtmans LA, Whitehead AS. The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic

organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene*. 2000;257(2):279-89.

47. Tolarova M, Harris J. Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology*. 1995;51(2):71-8.

48. Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD. Neural-tube defects. *N Engl J Med*. 1999;341(20):1509-19.

49. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*. 1998;64(3):169-72.

50. Shotelersuk V, Ittiwut C, Siriwan P, Angspatt A. Maternal 677CT/1298AC genotype of the MTHFR gene as a risk factor for cleft lip. *J Med Genet*. 2003;40(5):e64.

51. Davalos IP, Olivares N, Castillo MT, Cantu JM, Ibarra B, Sandoval L, et al. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Ann Genet*. 2000;43(2):89-92.

52. Ashfield-Watt PA, Pullin CH, Whiting JM, Clark ZE, Moat SJ, Newcombe RG, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T genotype modulates homocysteine responses to a folate-rich diet or a low-dose folic acid supplement: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(1):180-6.

53. West AA, Caudill MA. Genetic variation: impact on folate (and choline) bioefficacy. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernährungsforschung Journal international de vitaminologie et de nutrition*. 2010;80(4-5):319-29.



## 7. TABLAS

**Tabla 1. Composición familiar**

Individuos analizados por familia	n (%)
2	3 (11.11%)
3	8 (29.63%)
4	12 (44.4%)
5	4 (14.81%)

**Tabla 2. Características perinatales**

Características	
Sexo (masculino)	13 (48%)
Peso al nacer (gramos)	2950 (2030-3900)
Talla al nacer (cm)	50 (41-58)
Apgar al nacer	9/9 (8/8-9/9)
Duración del embarazo (semanas)	38 (36-41)
IMC madre	26.5 (18.6-35)
Diabetes gestacional	1 (3.7%)
Infección vías urinarias	5 (18.5%)
Amenaza de aborto	5 (18.5%)
Edad de la madre	25 (16-40)
Edad del padre	28 (17-48)

Se muestran frecuencias absolutas y relativas como n(%) para las variables categóricas y la mediana y valores intercuantiles como p50 (p25-75), para las variables continuas y las ordinales.

**Tabla 3. Factores de riesgo ambientales en el primer trimestre del embarazo**

Factor de riesgo	Frecuencias n (%)
Tabaquismo	0
Alcoholismo	0
Suplemento de ácido fólico prenatal	5 (20.8%)
Suplemento de ácido fólico	19 (70.4%)
Suplemento con multivitamínico	10 (37.04%)
Mariguana	0
Cocaína	0
Heroína	0
Tóxicos	1 (3.7%)
Exposición a humo de leña	1 (3.7%)
Tabaquismo del padre	11(40.7%)
Alcoholismo del padre	12(44.4%)

**Tabla 4. Asociaciones genéticas intrafamiliares.**

Crom	Gen	SNP	A1	A2	Transmitido	No transmitido	OR	p
1	<i>ABCA4</i>	rs560426	T	C	17	23	0.74	0.34
1	<i>IRF6</i>	rs642961	A	G	10	3	3.33	0.05
2	<i>TGFA</i>	rs3771475	C	T	13	15	0.87	0.70
8	---	rs987525	A	C	11	6	1.83	0.23
10	<i>VAX1</i>	rs7078160	A	G	18	10	1.8	0.13
16	<i>CRISPLD2</i>	rs1546124	G	C	7	13	0.53	0.18
20	<i>MAFB</i>	rs13041247	C	T	10	15	0.67	0.32
1	<i>MTHFR</i>	rs180131	G	A	11	15	0.73	0.43

**Crom:** Cromosoma, **SNP:** polimorfismo de nucleótido único, **A1:** alelo 1, **A2:** alelo 2 (alelo menos frecuente), **transmitido/no transmitido:** conteo de los alelos transmitidos y no transmitidos por los padres heterocigotos hacia sus hijos afectados, **OR:** odds ratio (razón de momios), **p:** p-value para la prueba de TDT

**Tabla 5. Interacción gen-ambiente en pacientes con labio y paladar hendido**

FACTOR DE RIESGO	ABCA4 rs560426	IRF6 rs642961	TGFA rs3771475	8q24 rs987525	VAX1 rs7078160	CRISPLD2 rs1546124	MAFB rs13041247	MTHFR rs180131
Tabaquismo pasivo	1	0.79	0.83	1	1	1	0.76	0.10
Ingesta de ácido fólico durante el embarazo	0.8	0.62	0.74	1	0.38	0.54	0.86	0.33
Ingesta de ácido fólico pregestacional	0.23	0.48	0.85	0.28	1	0.96	0.33	0.49
Ingesta de multivitamínico	0.91	0.62	0.7	0.56	0.97	0.29	0.22	0.11
IMC Madre	0.32	0.74	0.78	0.28	0.6	0.45	0.2	0.51
Edad Madre	0.59	0.5	0.18	0.68	0.93	0.09	0.1	0.43
Edad Padre	0.61	0.18	0.1	0.68	0.61	0.01	0.68	0.54
Tabaquismo padre	1	0.42	0.18	0.26	0.69	0.68	0.98	0.41
Alcoholismo padre	1	0.78	0.33	0.36	0.46	1	0.98	0.98

Los valores expresados son los p-value, obtenidos a través de pruebas de interacción entre los SNPs más representativos de cada región codificante en el caso índice con factores de riesgo prenatales.