



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Especialidad en Ortodoncia

*VALIDACIÓN DE LOS GENES IRF6 Y SUMO1 COMO MARCADORES
GENÉTICOS PARA LA PRESENCIA DE LABIO Y PALÁDAR HENDIDO NO
SINDRÓMICO EN LA POBLACIÓN DE LA CIUDAD DE QUERÉTARO.*

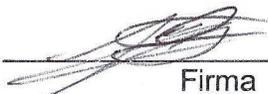
Opción de titulación
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Diploma de
Especialidad en Ortodoncia

Presenta:
M. E. ROBERTO VALENZUELA MARTÍNEZ

Dirigido por:
DRA AIDÉ TERÁN ALCOCER

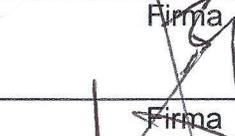
Dr. Alejandro Lloret Sandoval
Presidente


Firma

Dra. en C. Aidé Terán Alcocer
Secretario


Firma

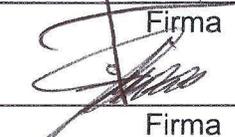
Dr. Miguel Francisco Javier Lloret Rivas
Vocal


Firma

C. D. E. O. Óscar Gabriel Lozano Torres
Suplente


Firma

C. D. E. O. Juan Barrera Rico
Suplente


Firma

Dr. Javier Ávila Morales
Director de la Facultad de Medicina

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado


Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Junio 2016

RESUMEN

Antecedentes: Las malformaciones congénitas son alteraciones anatómicas que ocurren en la etapa intrauterina y que pueden ser alteraciones de órganos, extremidades o sistemas, debido a factores medioambientales, genéticos, deficiencias en la captación de nutrientes, o bien consumo de sustancias nocivas. Aquí se hablará de Labio y Paladar Hendido (LPH). **Objetivo:** Definir y validar la heterogeneidad de marcadores genéticos de los genes IRF6 y SUMO1 en 94 muestras de epitelio bucal de población sin LPH en la ciudad de Querétaro. **Metodología:** Toma de muestras de epitelio bucal de 94 pacientes sin Labio y Paladar Hendido en la ciudad de Querétaro. Con la obtención de ADN epitelial se procedió a validar los marcadores genéticos de los genes IRF6 (Interferon Regulatory Factor 6) y SUMO1 (Small Ubiquitin-like Modifier 1). **Resultados:** Se obtiene un banco genético sin precedente en la ciudad de Querétaro. Se realizó la validación genética y como no se cumplió con la ley del equilibrio genético de Hardy-Weinberg, dio como resultado una población mestiza homogénea. **Conclusiones:** la población mestiza de la ciudad de Querétaro no resultó heterogénea, no se realizó una mezcla realmente al azar, lo cual no cumple con uno de los principios de la Ley de Hardy-Weinberg. Esto servirá para futuras investigaciones ahora tomando en cuenta otros marcadores genéticos.

SUMMARY

Background: Congenital malformations are anatomical changes occurring in the intrauterine stage and can be altered organs, limbs or systems due to environmental factors, genetic deficiencies in nutrient uptake or substance abuse. Here you will be discussed Cleft Lip and Palate (LPH). **Objective:** To define and validate the heterogeneity of genetic markers and genes IRF6 SUMO1 in 94 samples of oral epithelium in population without LPH in Queretaro city. **Methodology:** Sampling of oral epithelium of 94 patients without cleft lip and palate in the city of Queretaro. By obtaining DNA epithelial procesed to validate genetic markers IRF6 (Interferon Regulatory Factor 6) and SUMO1 (Small Ubiquitin-like Modifier 1) genes. **Results:** A gene bank is obtained unprecedented in the Queretaro city. Genetic validation was performed and as not complied with the law of genetic Hardy-Weinberg resulted in a homogeneous mestizo population. **Conclusions:** mixed population of Queretaro city was not heterogeneous, a mixed did not really random, which does not meet one of the principles of Hardy-Weinberg principle. This will serve for future research now taking into account other genetic markers.

A mis padres por su gran ejemplo y valioso apoyo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a CONACYT por su gran apoyo a la investigación y a la ciencia.

Al programa FOPER UAQ 2015 por su valioso interés en apoyar a la investigación.

Mil gracias a la Dra. en C. Aidé Terán Alcocer y M en E. Óscar G. Lozano Torres por su gran dedicación y empeño para nuestro aprendizaje, conocimiento y bienestar.

Le agradezco a mi director de proyecto, el Dr. Alejandro Lloret Sandoval, por su gran sacrificio en enseñarnos más acerca de estos temas.

Agradezco a mis maestras y maestros de la especialidad, las Dras. Elía Irene Núñez, Verónica Reyes, Gissela Serrano, Claudia Álvarez, Lucero Rivera, Lourdes Arvizu, Adriana Medina y Rosy Vargas, además de los Drs. Omar Amador, Luis Anguiano, Édgar Mandujano, Alfonso Vera y Julio Rodríguez por compartir sus conocimientos con nosotros.

A mis compañeros y amigos: Nívea, Mariana, María José, Belem, Jimena, Carlos, Gabriela, Blanca, Javier e Ileana, ustedes me hicieron sentir lo que es querer a alguien como un hermano.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE IMÁGENES	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
INTRODUCCIÓN	9
MARCO TEÓRICO	11
JUSTIFICACIÓN	21
OBJETIVOS	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
METODOLOGÍA	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	34
APÉNDICE	49

ÍNDICE DE IMÁGENES

1. Descripción Labio y Paladar Hendido	12
2. Esquema Procesos Maxilares y Arcos Faríngeos	13
3. Esquema Forma del ADN	15
4. Esquema 23 pares de cromosomas	16

ÍNDICE DE TABLAS

1. Ley del Equilibrio Genético de Hardy Weinberg	19
2. Definición de Variables	24
3. Descripción del presupuesto requerido para la investigación	24
4. Esquema de SNP´s empleados para la validación Genética.....	28
5. Porcentaje por género de muestras control	30
6. Porcentaje por parentesco de muestras control	31
7. Frecuencias alélicas de los genes IRF6 y SUMO1	31

INTRODUCCIÓN

A lo largo de los años el mundo entero se ha enfrentado a diferentes problemáticas, para este caso específico, se habla de las enfermedades y padecimientos que afectan la salud.

En este proyecto se aborda uno de los padecimientos que guarda mayor complejidad puesto que se trata de una enfermedad multifactorial.

Se ha informado que la prevalencia de labio paladar hendido es de 1:1000 en Estados Unidos y en Colombia en pacientes recién nacidos, por lo tanto ha sido objeto de innumerables estudios en todo el mundo. Es un defecto congénito frecuente que afecta a las estructuras maxilofaciales del hombre, cuya etiología es bastante compleja, involucrando tanto factores genéticos como ambientales; a pesar de la existencia de una gran cantidad de estudios e investigaciones sobre los eventos biológicos que regulan el desarrollo del labio y el paladar, siguen siendo pocos conocidos las variables que desencadenan la formación de labio paladar hendido.

El labio hendido con o sin paladar hendido (más común en sexo masculino) ocurre en 1:1,000 nacidos, mientras que el paladar hendido (más común en sexo femenino) sólo ocurre en aproximadamente 1:2,500 nacidos. En México ocurre 1 caso por cada 850 nacidos, 9.6 casos nuevos por día, y 3,521 casos al año. En México, 70% de los labios hendidos unilaterales se asocia con paladar hendido, 85% de los labios hendidos bilaterales se asocia con paladar hendido. Sólo se conoce la causa en el 25% de los casos, mientras que en el 75% restante la causa es multifactorial y en el 20 al 25% de los casos existe algún antecedente familiar. (Gómez y Gutiérrez, 2013)

En los últimos años y gracias al avance de la herramientas moleculares y de un mayor conocimiento de genética poblacional, se han podido identificar varios genes que están involucrados en la formación y desarrollo orofacial, evaluando a su vez el papel que podrían tener en la formación del labio paladar hendido sindrómico y no sindrómico.

El mundo avanza, y como tal, la ciencia e investigación deben realizar trabajos a marchas forzadas para conseguir mayores beneficios a la población. La población necesita de mayor investigación que trate de eliminar los problemas que la amenazan.

MARCO TEÓRICO

El estado de Querétaro se ubica en la porción central de la República Mexicana. Su capital es la ciudad de Querétaro que se localiza a 183 km al noroeste de la Ciudad de México. Limita al norte con el estado de San Luis Potosí, al oriente con el estado de Hidalgo, al suroriente con el Estado de México, al sur con el estado de Michoacán y al poniente con el estado de Guanajuato. Su extensión territorial comprende una superficie de 11270 km², por lo que se clasifica el vigésimo séptimo lugar de las entidades federativas del país.

En la ciudad de Querétaro corresponde un clima seco y semi seco, por estar a una altitud de 1800 m sobre el nivel del mar, La temperatura media anual es de 18° C, la lluvia anual es de 450 a 630 mm con precipitación máxima en los meses de julio y agosto.

La ciudad de Querétaro fue hasta el año 2010 donde se proyectó mayor crecimiento económico, trayendo como consecuencia, la mayor instalación de fábricas transnacionales de todo el mundo y esto desencadenó el arribo de trabajadores de diversas nacionalidades. Esto tendrá como consecuencia que en un futuro cercano, la convivencia entre razas, originará una población genéticamente heterogénea.

Las malformaciones congénitas son alteraciones anatómicas que ocurren en la etapa intrauterina y que pueden ser alteraciones de órganos, extremidades o sistemas, debido a factores medioambientales, genéticos, deficiencias en la captación de nutrientes, o bien consumo de sustancias nocivas.

Las malformaciones congénitas se conocen desde los albores de la humanidad, tal como lo muestran los grabados y figurillas testigos de pasadas civilizaciones, encontradas en diversas partes del mundo. Algunos consideran que las fisuras labiopalatinas datan del año 2000 a.n.e. (Lewin, 2001)

El nacimiento de un niño malformado siempre ha causado consternación, pero la explicación que de este fenómeno ha variado en las diferentes épocas, de acuerdo con los conceptos mágico-religioso o filosóficos prevalentes. Así, en

algunas culturas un niño malformado era considerado un ser impuro, que no debía vivir y entonces era destruido; mientras que en otras, por el contrario, era deificado y adorado.

En algunas religiones se considera como fruto del pecado, y por tanto como castigo divino; mientras que en otras era presagio de futuros acontecimientos, por desavenencias entre los dioses o por guerras cósmicas. A mediados del siglo XIX nace la teratología como la ciencia que trata las monstruosidades, y en las últimas décadas se ha acuñado el término de dismorfología para referirse a la ciencia que estudia las malformaciones congénitas. Se consideran malformaciones congénitas, aquellos defectos estructurales presentes en el nacimiento. (Lewin,2001)

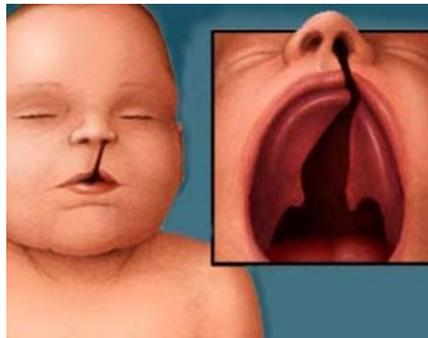


Fig. 1 Descripción labio y paladar hendido.

Para entender como las alteración genéticas conducen a la formación de CL/P (por sus siglas en inglés cleft lip and plate) es importante conocer cómo se lleva a cabo la formación del paladar y del labio superior en estado embrionario y condiciones normal. (Escobar, et al, 2013)

Durante las etapas iniciales de la formación del embrión, este presenta una depresión ectodérmica denominada estomodeo que está constituida por la cavidad bucal y la nasal aun sin separación entre ella. La palatogénesis permite que el paladar recién formado establezca una división entre las dos cavidades dando origen a la boca y la nariz.

Se sabe que el primer arco faríngeo comienza su desarrollo a partir de la tercera semana de gestación, este se divide en un proceso mandibular el cual es inferior y un proceso maxilar superior. El proceso mandibular se fusiona aproximadamente a las 4 semanas, formando así la mandíbula y el labio

inferior; el labio superior y el paladar involucran al proceso maxilar y nasales mediales donde se fusionan en la línea media, formando así el labio superior y el paladar primario. Así mismo se da la primera señal para el desarrollo del paladar secundario, con la extensión de los procesos maxilares de las crestas palatinas, las cuales se forman inicialmente a ambos lados de la lengua en desarrollo. Estos últimos, para la séptima semana, se elevan a una posición horizontal por encima de la lengua y se fusionan en la línea media, formando una sutura epitelial, la cual degenerará permitiendo la continuidad del mesénquima en el paladar, este mesénquima se diferencia luego en elementos musculares y óseos, los cuales correlacionan con los paladares blandos y duros. (Torres y Otero)

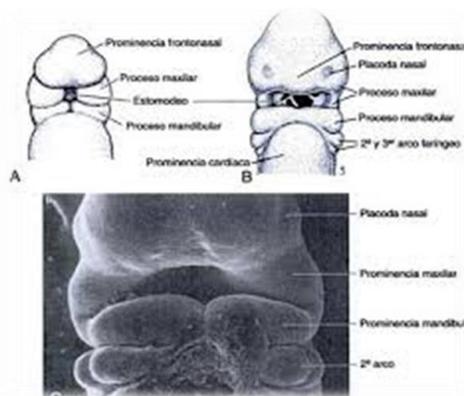


Fig. 2. Esquema procesos maxilar, mandibular y arcos faríngeos.

El labio y paladar hendido es una de las malformaciones congénitas más comunes, tiene una incidencia del 2-3% y se considera la anomalía craneofacial más frecuente. Se considera que las fisuras labio palatinas son el resultado de la no unión de los procesos centrales y laterales de la cara durante la 6ta. y 10ma. semanas de vida embrionaria. Las zonas comprometidas por las fisuras bucales comunes son: el labio superior, el reborde alveolar, el paladar duro y el paladar blando. (Gómez y Gutiérrez, 2013).

Cualquier falla en los pasos anteriormente mencionados conducirá a la formación de fisuras palatinas, labiales o la combinación de ambas. La variadísima morfología a que pueden dar lugar las fisuras labio-alveolopalatinas por implicar la deformidad de 4 estructuras diferentes: el labio, el proceso alveolar, el paladar duro y el paladar blando, unido a la posibilidad

de que la alteración sea unilateral o bilateral, ha sido siempre un desafío para que se adoptara universalmente una clasificación única; y si a esto se añade la moderna idea de que la clasificación debe estar basada no en los hechos anatómicos del feto a término, sino en los datos embriológicos que han dado lugar a la deformidad, resulta que prácticamente cada estudioso de este problema ha hecho su clasificación propia. (Pantoja, et al, 1997)

Las zonas comprometidas por las fisuras bucales comunes son el labio superior, el reborde alveolar, el paladar duro y el paladar blando. Ligeramente más del 50% son fisuras combinadas del labio y el paladar, y aproximadamente la cuarta parte de ellos es bilateral. Las fisuras aisladas del labio y el paladar constituyen el resto de las variedades que se ven. Se ha comprobado que las fisuras de labios son más frecuentes en los varones, mientras que las fisuras aisladas del paladar son más comunes en las mujeres. Igualmente, el compromiso del labio fisurado es más frecuente del lado izquierdo que el derecho. (Pantoja, et al, 1997)

Estos fenómenos carecen de explicación, y la causa subyacente de la deformidad se comprende sólo de una manera parcial. La falta de unión de las partes que normalmente forman el labio y el paladar, se produce en un momento temprano de la vida fetal.

Hace tiempo, los médicos sólo se preocupaban por lo que descubrían en la exploración física, auscultación e interrogatorio al paciente o en los estudios de laboratorio. En la jerga genética, los signos y síntomas del paciente corresponden al fenotipo. Hoy es posible definir el genotipo de la persona, que es la información real inscrita en 2 m de DNA enrollado y presente en cada célula del cuerpo, los espermatozoides y óvulos maduros contienen sólo la mitad de la cantidad total. (Lawrence, et al, 2006)

La importancia de la contribución genética varía en gran medida entre los fenotipos humanos, hay en desarrollo métodos para identificar el gen afectado en rasgos complejos y enfermedades más comunes, además de que no puede ignorarse la importancia de las interacciones entre ambiente y genotipo en la producción de fenotipos, a pesar de la falta de conocimiento sobre los mecanismos reales.

Los miles de millones de nucleótidos en el núcleo de una célula se organizan de modo lineal a lo largo de la doble hélice del DNA, en unidades funcionales llamadas genes. A cada uno de los 35000 genes humanos lo acompañan varios elementos reguladores que controlan la activación del gen para producir RNA mensajero por medio de un proceso llamado transcripción. En la mayoría de los casos, el RNAm es transportado del núcleo al citoplasma, donde su información genética se traduce en proteínas, las cuales realizan la función que a final determina el fenotipo. Por ejemplo, las proteínas sirven como enzimas que ayudan al metabolismo y a la síntesis celular, como elementos que se unen al DNA para regular la transcripción de otros genes; como elementos estructurales de las células y la matriz extracelular, y como moléculas receptoras para la comunicación intracelular e intercelular. Los cromosomas son los vehículos en que los genes se transportan de generación en generación. Cada cromosoma es un complejo de proteínas y ácidos nucleicos en el cual una doble hélice de DNA sin roturas se enrolla en un espacio mucho menor que la misma longitud extendida del mismo. Dentro del cromosoma ocurren procesos muy complicados, tales como: la replicación, recombinación y transcripción del DNA. En el núcleo de cada célula somática, los humanos normalmente tienen 46 cromosomas, dispuestos en 23 pares. (Lawrence, et al, 2006).



Fig. 3. Forma de doble hélice del ADN

La naturaleza básica de un gen fue definida por Mendel hace ya más de un siglo donde resume en 2 sus leyes, el gen fue identificado como un “factor

particulado” que se transmitía sin modificaciones de los padres a su descendencia. (García, et al, 2012)

En los organismos diploides que tienen dos series de cromosomas una copia de cada cromosoma es heredada por cada padre, siguiendo el mismo comportamiento que se evidencia en los genes, diciendo que son los cromosomas los que contienen los genes.

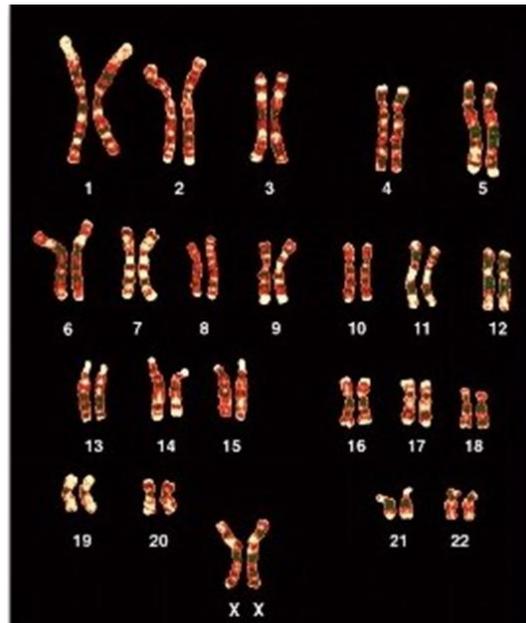


Fig. 4. 23 pares de cromosomas.

Los estudios genéticos han permitido construir un mapa de conexiones que enlaza todos los genes portados por un cromosoma, el mapa genético de un grupo de ligamiento se corresponde con su existencia física en el cromosoma.

La cifra y disposición de los genes en cromosomas homólogos son idénticos, aunque las secuencias reales codificadoras de genes homólogos no lo sean. Las copias homólogas de un gen se llaman alelos. Cuando se comparan alelos, debe especificarse el grado de análisis en que se realiza dicha comparación. Cuando los alelos son idénticos, porque sus secuencias codificadoras no tienen variantes, el individuo es homocigoto para ese locus. A un nivel más burdo, los alelos pueden ser idénticos en el aspecto funcional, a pesar de variaciones sutiles en la secuencia de nucleótidos. Esto origina que sean idénticas las proteínas que se producen de los dos alelos o que cualquier diferencia que haya en la secuencia de aminoácidos no modifique la función de

éstas. Si se analiza al paciente al nivel del fenotipo proteínico, otra vez se puede hablar de alelos homocigotos. En cambio si el análisis implica el estudio de ADN, como ocurre en el análisis con enzimas de restricción o en la secuencia de nucleótidos, entonces, y a pesar de la identidad funcional, los alelos se consideran diferentes y el individuo es heterocigoto para ese locus.

La coordinación, especificidad anatómica y la precisión de tiempo molecular que se requiere en la patogénesis va a determinar la correcta señalización para el desarrollo normal, entre las múltiples vías de señalización se incluye Shh, FGF, y el factor de crecimiento transformante (TGF), éste está asociado con las hendiduras craneofaciales en humanos los cambios en el TGF-3. Si existe alguna falla en este gen es probable que el origen de la patogénesis del paladar se dé, usualmente llamado fisura del paladar, así como también se ha relacionado la señalización de las proteínas del Wnt. (García, et al, 2012)

Por análisis de ligamentos en familias con más de un individuo afectado, se han podido relacionar algunos *loci* con mayor susceptibilidad a la aparición de labio paladar hendido, se ha reportado la asociación con el gen de endotelina-1 localizado en el cromosoma 6, el cual codifica para un péptido vaso activo expresado en las células endoteliales vasculares. Se han realizado estudios en ratones donde muestra hipertensión y defectos craneofaciales como la reducción en tamaño de lengua y fisura palatina.

Estudios genético-familiares en humanos de casos de labio paladar hendido han mostrado que no hay un solo locus implicado en estas alteraciones, sin embargo se han realizado estudios en ratones donde han mostrado que la función anormal de un gen particular puede tener un papel importante en la etiología de las fisuras orales. Como promedio la frecuencia de las malformaciones congénitas "mayores" presentes al nacimiento, es de aproximadamente el 3 % si consideramos solo a recién nacidos vivos, naturalmente esta frecuencia aumenta si se tienen en cuenta los óbitos y los abortos. (Torres y Otero)

La naturaleza de la contribución genética en la etiología del labio/paladar no sindrómico sigue siendo hoy en día muy discutida, algunos investigadores han sugerido un modelo de herencia multifactorial, mientras que otros sugieren un

modelo autosómico dominante con o sin contribuciones multifactoriales y de asociación en casos de labio paladar hendido no sindrómico han sugerido diferentes locus para fisuras sobre diferentes regiones cromosómicas tales como 2p, 4q, 6p, 17q y 19q. (Dávalos, et al, 2009)

Los genes *SUMO1* e *IRF6* han sido identificados en varios desórdenes, tales como: labio y paladar hendido no sindrómico, cáncer labial, etc. (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SUMO1#diseases> =[IRF6#diseases](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IRF6#diseases))

LEY DEL EQUILIBRIO GENÉTICO DE HARDY-WEINBERG

El equilibrio de Hardy-Weinberg, es también conocido como equilibrio panmítico, fue estudiado a principios del siglo XX por diferentes autores, pero fueron Hardy, un matemático y Weinberg, un físico quienes lo establecieron.

La ley de Hardy-Weinberg establece que en una población suficientemente grande, en la que los apareamientos se producen al azar y que no se encuentra sometida a mutación, selección o migración, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de una generación a otra, una vez alcanzado un estado de equilibrio que en loci autosómicos se alcanza tras una generación.

El equilibrio de Hardy-Weinberg es un modelo teórico para genética de poblaciones. El concepto de equilibrio en el modelo de Hardy-Weinberg se basa en las siguientes hipótesis:

1. La población es panmítica (todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y el apareamiento es al azar, panmixia).
2. La población es suficientemente grande (para minimizar las diferencias existentes entre los individuos).
3. La población no está sometida a migración, mutación o selección (no hay pérdida ni ganancia de alelos).

4. Las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación.

Bajo estas circunstancias las poblaciones genéticas se mantienen en equilibrio.

GAMETOS	p (A)	q (a)
p (A)	p ² (AA)	pq (Aa)
q (a)	pq (Aa)	q ² (aa)

Tabla No. 1 Descripción de la Ley del Equilibrio Genético de Hardy-Weinberg.

Las condiciones de base para la aplicación de la ley de Hardy-Weinberg rara vez se dan en una población natural:

- Se dan fluctuaciones aleatorias en las frecuencias génicas dado el tamaño finito de una población. A este error de muestreo intergeneracional se le llama deriva génica.
- Rara vez se cumple el requisito de panmixia, ya sea por cruzamiento preferencial (puede ser endogamia, o sea, cruzamiento preferencial dentro de un grupo definido, o exogamia, es decir, cruzamiento fuera de dicho grupo) o selección sexual.
- En muchos casos, existe una tasa de éxito diferencial en la perpetuación de ciertos alelos. Esta diferencia constituye la selección natural.
- Las mutaciones ocurren a menudo con mayor frecuencia en cierta dirección.
- La migración da lugar a la introducción de nuevas variedades génicas en una población.

El labio y paladar hendido es una de las malformaciones congénitas más comunes, representa el 2-3%. Es considerada la anomalía craneofacial más frecuente. El labio y paladar hendido pueden ocurrir juntos o separados. El labio hendido con o sin paladar hendido ocurre en 1:1,000 nacidos. El paladar

hendido sólo ocurre en aproximadamente 1:2,500 nacidos. El labio hendido (con o sin paladar hendido) es más común en el sexo masculino mientras el paladar hendido es más común en el sexo femenino. En México ocurre 1 caso por cada 850 nacidos, 9.6 casos nuevos por día, y 3,521 casos al año. Los mexicanos afectados de labio y paladar hendido son 139,000. 70% de los labios hendidos unilaterales se asocia con paladar hendido. 85% de los labios hendidos bilaterales se asocia con paladar hendido (Alarcón, 2010)

De los pacientes que padecen labio y paladar hendido en el 25% de los casos, se conoce la causa. En el 75% de los casos la causa es multifactorial y en el 20 al 25% de los casos existe algún antecedente familiar (Alarcón, 2010)

La literatura coincide en que la reparación quirúrgica de un paciente con labio hendido no es una urgencia. En la actualidad la reparación primaria de labio hendido se realiza alrededor de los 3 meses de edad. Se recomienda que los niños sean mayores de 10 semanas de edad, peso de por lo menos 4.5 kg (10 lb) y valores de hemoglobina mayor a 10 g/dL (Alarcón, 2010)

JUSTIFICACIÓN

Pese a la cantidad de estudios de asociación genética a nivel mundial, en México se carece de información sobre este tema, así como tampoco se cuenta con una base de datos que permita establecer políticas de salubridad orientadas a la prevención temprana de esta condición mediante el conocimiento previo de factores que predispongan a sufrir este padecimiento.

La población mexicana en su gran mayoría es de composición genética mixta, por lo que la extrapolación de los estudios en poblaciones con un trasfondo genético homogéneo no es fácilmente extrapolable a las características y necesidades de la población mexicana.

La identificación y posible asociación de los genes *IRF6* (Beaty *et al.* 2010) y *SUMO1* (Suzuki *et al.* 2009) en pacientes queretanos es de importancia crucial por ser un problema de salud pública dada su elevada frecuencia, pudiendo ayudar al personal de salud a un posible diagnóstico temprano de la patología. Esto también esperamos que contribuya al establecimiento de programas de consejo genético dirigidos los padres de los pacientes afectado por LPH y que les permita tomar decisiones informadas ante la existencia del riesgo. Asimismo, esperamos efectuar análisis posteriores que permitirán establecer la relación entre la frecuencia de este padecimiento y su relación con otras enfermedades, como el cáncer de mama, cerebral y de próstata, así como también con padecimientos mentales de alta incidencia en la población mexicana.

HIPÓTESIS

Los genes *IRF6* y *SUMO1* están asociados a la patología de labio paladar hendido.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar si los genes *IRF6* y *SUMO1* están asociados a la patología de labio paladar hendido.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir y validar la heterogeneidad de marcadores genéticos de los genes *IRF6* y *SUMO1* en la población sana en la ciudad de Querétaro.
- Determinar la frecuencia de marcadores genéticos previamente validados de los genes *IRF6* y *SUMO1* en poblaciones sanas y que presenten la patología del labio y paladar hendido en la ciudad de Querétaro.

METODOLOGÍA

Se trata de un estudio observacional descriptivo. Encuesta transversal

DEFINICIÓN DEL UNIVERSO

Las poblaciones control y que presentan la patología del LPH a estudiar fueron seleccionadas a partir de los pacientes atendidos en la Clínica Odontológica de la FMUAQ. Las muestras, datos clínicos, personales y derivados de este estudio serán tratados según los lineamientos internacionales de ética para el uso de material e información genética (McGuire y Beskow. 2010).

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se tomaron muestras de 26 pacientes con Labio Paladar Hendido y 94 provenientes de pacientes sin dicha patología siendo estos sus familiares directos, llámese padres, hermanos y/o hijos.

Estos pacientes fueron seleccionados basándose en tres criterios de inclusión:

- Obtención del consentimiento informado.
- Diagnóstico o ausencia del padecimiento.
- Posibilidad de atender a una segunda cita para colecta de muestra de sus familiares más cercanos.

Se excluyeron a los pacientes que presentaban LPH sindrómico

Los criterios de eliminación fueron:

- Que el paciente decidiera ya no participar en la investigación.
- Que el paciente presentara anomalías cromosómicas en el locus de interés.
- Que fuera incapaz de atender a la toma de muestra.

DEFINICIÓN DE VARIABLES Y UNIDADES DE MEDIDA

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDAD	DEFINICION
Determinación del Alelo	Experimental		%	Frecuencia de homocigotos para uno u otro alelo y heterocigoto en la población
Lugar de residencia	Cualitativa	Razón	Rural o Urbana	Exposición a agentes mutagénicos
Tabaquismo	Cuantitativa	Razón	Si/No	Se busca el factor ambiental que incida en la enfermedad.
Bebidas alcohólicas	Cuantitativa	Razón	Si/No	Se busca el factor ambiental que incida en la enfermedad.
Servicios básicos	Cuantitativa	Razón	Si/No	Se busca el factor ambiental que incida en la enfermedad.

Tabla No. 2 Definición de variables

RECURSOS MATERIALES

- DNA de pacientes
- Historias Clínicas de los pacientes
- Laboratorio equipado para análisis genéticos
- Computadora

PRESUPUESTO

1KG	SODIUM CHLORIDE ACS REAGENT GRADE CRYSTALLINE POWDER	\$1,591.84
500 ML	20% SODIUM DODECYL SULFATE LIQUID	\$1,445.34
10X500 ML	DISTILLED WATER (ULTRAPURE)	\$2,708.05
500 GM	EDTA	\$2,016.61
500 GM	TRIS HYDROCHLORIDE HIGH PURITY	\$1,566.98

	CRYSTALLINE POWDER	
1KG	SUCROSE MB GRADE CRYSTALLINE POWDER	\$929.82
15ML	CONICAL TUBE PP RACKED-500 UN. (CAJA)	\$3,055.00
50ML	CONICAL TUBE PP BULK PACKAGED-500 UN.	\$3,119.91
1KG	ACETATO DE AMONIO CRIST. RA ACS J.T.BAKER	\$588.98
1LT	ALCOHOL ETILICO ABSOLUTO, ANH. RA ACS MARCA J.T.BAKER	\$482.84
500 GM	FENOL CRIST. RA ACS MARCA J.T.BAKER	\$819.42
1LT	CLOROFORMO RA ACS MARCA J.T.BAKER	\$557.10
1L	2-PROPANOLOL RA ACS MARCA: J.T.BAKER	\$335.94
25000 Units	Enzima Msp I	\$8,268.00
5000 Units	Enzima TSPR I	\$9,468.00
2500 Units	Enzima Bfa I	\$9,790.00
2500 Units	Enzima Mnl I	\$8,687.00

Tabla No. 3 Descripción del presupuesto requerido para la investigación

Debido a que el presupuesto fue muy elevado se fue apoyado por el programa FOPER UAQ 2015.

MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

- Revisión de expedientes.
- Responder a un cuestionario donde se abordan las variables
- Colecta de muestras: Se recolectaron muestras de epitelio bucal por enjuague con una solución de 5 ml al 3% de sucralosa en un tubo de ensaye estéril a temperatura ambiente.
- Procesamiento de muestras

EXTRACCIÓN DEL DNA

Se colocaron 3 ml de solución TNE (17 mM milimolar Tris/Hcl (pH 8.0), 50mM NaCl y 7 mM de EDTA) en el tubo de ensaye diluida en una solución al 66% de etanol.

Los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm a temperatura ambiente.

El sobrenadante se eliminó, se lavó y se resuspendió el pelet en 1ml de una solución de TNE

Se volvió a centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos y se eliminó nuevamente el sobrenadante.

El pelet se vortexeó durante 5 segundos y posteriormente se agregó una solución de 1.3 ml de solución de Lisis que contiene (10mM tris (pH 8.0), 5% SDS, 5mM EDTA) y después se le agregó 10 microlitros de proteinasa K (20mg por ml).

La mezcla se vortexeó por 5 segundos a velocidad media seguida por una incubación durante toda la noche a 55°C.

Después de la incubación se colocó 1.4mL de la mezcla y se transfirió a un tubo de 2mL.

Para eliminar la proteína se agregaron 50 microlitros de una solución que contiene 8 M de acetato de amonio y 1 mM de EDTA seguido de un vortexeo a velocidad alta por 5 segundos y centrifugación a 17 000 g por 10 minutos.

900 micro litros del sobrenadante se transfirieron a tubos de 1.75 microlitros que tienen 540 microlitros de isopropanol.

La solución se mezcló por inversión 20 veces y se centrifugó a 17000 g por 5 minutos.

El sobrenadante se eliminó por decantación y el remanente por absorción en hoja de papel.

Se agregaron 2 mililitros de una solución de etanol al 70% y se lavó el pelet por inversión, se centrifugó nuevamente a 17000 g por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante por decantación, el remanente se eliminó por absorción en toallas de papel y se dejó secar de 45 a 60 minutos.

El DNA se resuspendió en 100 microlitros de buffer TE (10 mM de Tris (ph 7.8) y 1 mM de EDTA.

La concentración y pureza se determina por espectrofotometría a 260/280 Nanómetros.

PROCESO DE SELECCIÓN DE SNP

Se hizo una búsqueda de polimorfismos únicos de nucleótidos (SNP's) contenidos en los genes de interés mediante la información contenida en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>. Los SNP's contenidos en dichos genes fueron seleccionados como marcadores moleculares de acuerdo a cualquiera de los siguientes criterios:

- Causen un cambio en el marco de lectura.
- No tengan un efecto en el marco de lectura.
- Se encuentren localizados en zonas regulatorias (i.e splicing, 3'UTR, 5'UTR).

En todos los casos, se seleccionaron aquellos SNP's que causan la creación o deleción de un sitio reconocido por enzimas de restricción. Este análisis se hará mediante el programa nebcutter disponible de manera gratuita en el sitio <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>.

AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA ZONA DE INTERÉS

Una vez seleccionados los SNP's a utilizarse, se diseñaron un par de "primers" para amplificar la zona alrededor del SNP (un par de primers por SNP) mediante la técnica de PCR ("Polimerase Chain Reaction" o Reacción en

Cadena de la Polimerasa) utilizando como templado en ADN colectado de pacientes y controles. El diseño de estos primers fue mediante el programa Primer3 del Massachusetts Institute of Technology, localizado en el sitio http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi. Toda vez diseñados, se ordenó su síntesis a la compañía IDT technologies.

La longitud del fragmento a amplificarse dependió de:

1. La presencia de sitios óptimos para el diseño de los primers
2. El número de veces que aparezca el sitio de restricción en la totalidad del fragmento respecto al producido por el SNP.

En cada caso se optimizaron independientemente las condiciones para la amplificación de cada uno de los SNP's escogidos.

ANÁLISIS POR RESTRICCIÓN

El mapeo mediante RFLP (o polimorfismos que afectan la longitud de un fragmento mediante restricción enzimática) es una técnica utilizada para identificar diferencias en secuencias homólogas de ADN que pueden ser detectadas por la presencia de fragmentos de distinto tamaño después de una reacción de restricción con endonucleasas específicas.

Los SNP's y las enzimas seleccionadas se encuentran resumidas en la siguiente tabla:

Gen	SNP	Cambio		Enzima
GEN SUMO1	rs143825095	A/G	H [His] ⇒ H [His]	Mnl I
GEN IRF6	rs377332433	A/G	P [Pro] ⇒ L [Leu]	Bfal

Tabla No. 4 Esquema de SNP's empleados para la validación genética.

ANÁLISIS DE VARIACIÓN ALÉLICA

Para determinar la frecuencia alélica de cada uno de los marcadores moleculares se utilizó el programa de análisis estadístico PLINK 1.06 con un nivel de confianza del 95%. Al mismo tiempo se realizó un análisis estratificado basado en edad, género, diagnóstico de la fisura, y una historia física completa del paciente. También fueron estudiados en los padres factores referidos por la literatura de tipo ambiental como tabaquismo, alcoholismo, uso de ácido fólico y multivitamínicos, esteroides, anticonvulsivantes y exposición a tóxicos.

DEFINICIÓN DEL PLAN DE PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE LA INFORMACIÓN.

Para conocer la frecuencia y la asociación entre la presencia de LPH y los genes *IRF6* Y *SUMO1* se pretendió obtenerlas mediante una tabla de dos por dos en la que se incluirían 4 grupos: enfermos expuestos, enfermos no expuestos, sanos expuestos y sanos no expuestos. La asociación entre la ocurrencia de la enfermedad y se realizaría a través del cálculo de medidas de asociación.

Para presentar la información se realizarían cuadros en donde se mostrarían la frecuencia de la presencia de la enfermedad (LPH) y su asociación con los genes *IRF6* y *SUMO1*, pero dado el resultado, no se realizaron dichos cuadros de asociación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al finalizar este estudio se dio como resultado la obtención de un banco genético con un tamaño de 94 muestras de epitelio bucal de pacientes sin LPH no sindrómico, 39 hombres y 55 mujeres, todos ellos en triadas, esto quiere decir, que se obtuvieron las muestras del paciente afectado más sus padres, hermanos y/o hijos, si por alguna razón no está presente el padre o la madre se obtuvieron muestras de los hermanos también.

Se analizaron 94 muestras de epitelio bucal de pacientes sin LPH para validar la presencia de los genes IRF6 y SUMO1. Dichas muestras fueron obtenidas de hermanos y padres de pacientes con presencia de LPH; 39 hombres y 55 mujeres, los hermanos mostraron un rango de edad entre 18 años y 26 años, los padres entre 35 y 57 años.

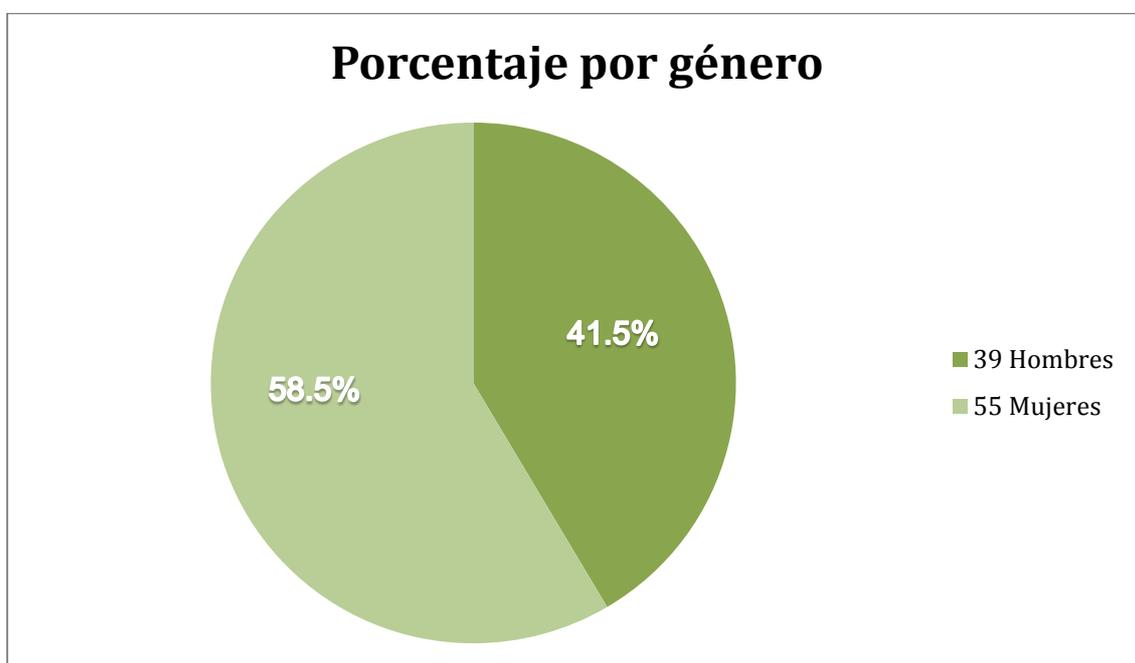


Tabla No. 5 Gráfica de porcentaje por género de muestras control.

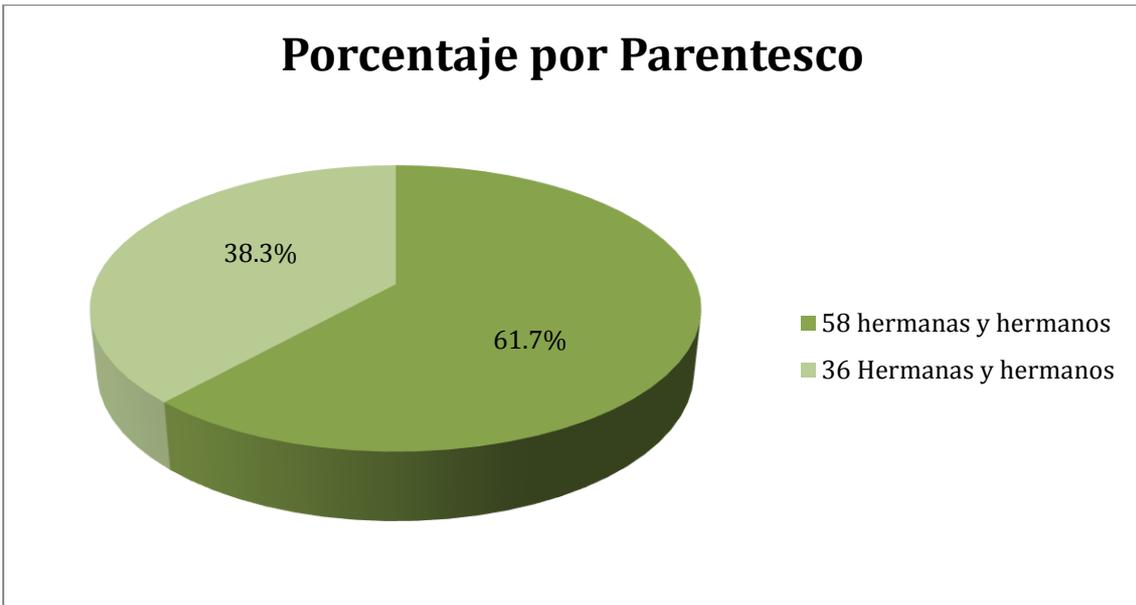


Tabla No. 6 Gráfica de porcentaje por parentesco de muestras control.

En la siguiente tabla se muestran los resultados de los genes IRF6 y SUMO1 con sus SNP's ya validados. Para el gen SUMO1 fue rs143825095 y para IRF6 fue rs377332433. Con esta tabla se comprueba la variación alélica no cumplió con la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg, demostrando que las frecuencias permanecen constantes de generación en generación sin cambio evolutivo.

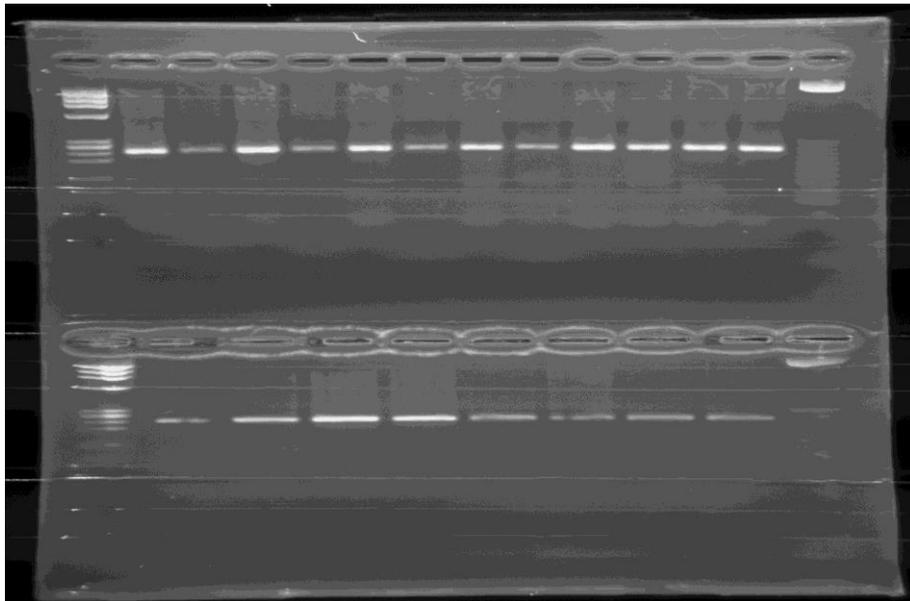


Tabla No. 7 Frecuencias alélicas de los genes SUMO1 e IRF6.

Siendo que la variación alélica fue constante, los alelos dominantes, los cuales fueron igual a 1 es como sigue: para rs143825095 fue A con la endonucleasa Mnl I y para rs377332433 fue G con la endonucleasa Bfal.

Debido a que la variación alélica no cumplió con la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg se decidió no realizar la prueba en los pacientes con presencia de LPH ya que se consideraba que en la ciudad de Querétaro se contaba con una población mestiza de contenido genético heterogéneo, lo cual fue refutado con este estudio, concluyendo que se tiene una población mestiza pero contenido genético homogéneo.

En comparación al estudio realizado por Tang (2014), con un total de 1381 pacientes de Labio y Paladar Hendido no sindrómico y 2054 pacientes control que fueron incluidos, veintisiete SNP's fueron evaluados. Sus estudios indican que los polimorfismos genéticos de SUMO 1, mayormente correlacionados al riesgo de LPH fueron: rs12470401, rs16838917, rs12470529 y rs7572505. Por otra parte, el análisis étnico demostró que los polimorfismos genéticos SUMO1 estaban estrechamente relacionados con un mayor riesgo de LPH entre asiáticos y caucásicos.

Por otra parte Mijiti (2015) encontró en un grupo de 100 afectados con LPH no sindrómico y 60 pacientes control que los marcadores genéticos rs7545538, rs2235373, rs223537 y rs2235377 se asocian con mayor riesgo a LPH no sindrómico en la población de Xinjiang Uygur, China.

En población de Brasil, Brito (2012), respecto al gen IRF6 encontró una alta asociación para el marcador genético rs642961, mientras que para rs590223 no se detectó ninguna asociación.

Nuestro estudio detectó que las frecuencias de los genes SUMO1 e IRF6 no nos sirvieron como marcadores genéticos para realizar una asociación con la presencia de LPH no sindrómico, sin embargo, es posible ir en busca de nuevos marcadores genéticos.

CONCLUSIONES

Al realizar este estudio se puede concluir, que por los resultados obtenidos, la población que no presenta Labio y Paladar Hendido muestra homogeneidad, por esta razón los SNP's: rs143825095 del gen SUMO1 y rs369802663, rs375673997, rs550521875, rs377332433 y rs200714160 del gen IRF6, no funcionan como marcadores genéticos por no cumplir con la ley del equilibrio genético de Hardy-Weinberg y por esta razón no se pudo realizar la asociación genética. Sin embargo, es de gran relevancia tener estos resultados para poder constituir un banco genético propio de la Cd de Querétaro, del cual no hay precedentes, sin duda, esto ayudará a continuar la investigación, pero ahora buscando con nuevos marcadores genéticos, con lo cual podremos ayudar más adelante a la prevención o detección temprana de LPH.

Fortalezas y Limitaciones

Dentro de las fortalezas encontramos que este estudio es el punto de partida en la búsqueda de nuevos marcadores genéticos. Por otro lado la obtención de muestras para la conformación de este banco genético, se realizó con un método no invasivo, mediante enjuagues bucales con una solución de sucralosa y así obtener epitelio bucal que posteriormente se procesó y se obtuvo ADN. Dentro de las limitaciones podemos observar el tamaño de muestra el cual se considera debe ser mayor y abarcar los diferentes municipios del estado, para lo cual se requiere un mayor recurso económico mucho mayor.

BIBLIOGRAFIA:

1. Escobar LM, Prada-Arismendy J, Tellez C, Castellanos J. Bases Genéticas de la formación de fisuras labiales y/o palatinas en humanos. Revista CES Odontología ISSN 0120-971X Volumen 26 No.1 Primer semestre de 2013 56-67.
2. Ethman Ariel Torres, Liliana Otero M., Factores etiológicos asociados con la fisura labio palatina no sindrómica.
3. Maria del Mar García Zúñiga, María Laura Monge, Gravan Picado, Keyllin Porras Calvo. Presentación de caso y revisión bibliografía Ancefalia y labio paladar hendido Medicina legal de costa rica Vol.29 (2) Septiembre 2012 ISSN 1409-0015 121-137
4. Ingrid Patricia Dávalos, Ernesto J Ramírez, Juan p. Mena. Variante C677T del gen metileno-tetrahidrofolato reductada en niños mexicanos con labio/paladar hendido no sindrómico Rev. Méd. IMSS 2009;47549-552
5. Benjamín Lewin. Genes VII editorial Marban España 2001 pág. 3-31
6. Hoffman F. Texto de cirugía plástica, reconstructiva y estética. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1986.
7. Pantoja R, Cauvi D, Cortes J, Argandoña J. Cirugía ortognática en fisurados. Rev. Esp Cir. Oral Maxilofac 1997; 19(2):100-4.
8. Alkuraya FS, Saadi I, Lund JJ, Turbe-Doan A, Morton CC, Maas RL. SUMO1 haploinsufficiency leads to cleft lip and palate. Science. 2006; 313(5794):1751.
9. Beaty TH, Murray JC, Marazita ML, Munger RG, Ruczinski I, Hetmanski JB, Liang KY, Wu T, Murray T, Fallin MD, Redett RA, Raymond G, Schwender H, Jin SC, Cooper ME, Dunnwald M, Mansilla MA, Leslie E, Bullard S, Lidral AC, Moreno LM, Menezes R, Vieira AR, Petrin A, Wilcox AJ, Lie RT, Jabs EW, Wu-Chou YH, Chen PK, Wang H, Ye X, Huang S, Yeow V, Chong SS, Jee SH, Shi B, Christensen K, Melbye M, Doheny KF, Pugh EW, Ling H, Castilla EE, Czeizel AE, Ma L, Field LL, Brody L, Pangilinan F, Mills JL, Molloy AM, Kirke PN, Scott JM, Arcos-Burgos M, Scott AF. 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):525–529.

10. Berk NW, Marazita ML. The Costs of Cleft Lip and Palate: Personal and Societal Implications. In: Wyszynski DF, editor. *Cleft Lip and Palate: From Origin to Treatment*. Oxford: Oxford University Press; 2002.
11. Bille C, Knudsen LB, Christensen K. Changing lifestyles and oral clefts occurrence in Denmark. *Cleft Palate Craniofacial Journal*. 2005; 42(3):255–259.
12. Christensen K, Juel K, Herskind AM, Murray JC. Long term follow up study of survival associated with cleft lip and palate at birth. *BMJ*. 2004; 328(7453):1405.
13. Dietz A, Pedersen DA, Jacobsen R, Wehby GL, Murray JC, Christensen K. Risk of breast cancer in families with cleft lip and palate. *Ann Epidemiol*. 2012; 22(1):37–42.
14. Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, *et al*. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*. 1994; 372(6506):525–530.
15. Jiang R, Bush JO, Lidral AC. Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. *Dev Dyn*. 2006; 235(5):1152–1166.
16. Jugessur A, Farlie PG, Kilpatrick N. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Dis*. 2009a; 15(7):437–453.
17. Jugessur A, Shi M, Gjessing HK, Lie RT, Wilcox AJ, Weinberg CR, Christensen K, Boyles AL, Daack-Hirsch S, Trung TN, Bille C, Lidral AC, Murray JC. Genetic determinants of facial clefting: analysis of 357 candidate genes using two national cleft studies from Scandinavia. *PLoS ONE*. 2009b; 4(4):e5385.
18. Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, Watanabe Y, Howard E, de Lima RL, Daack-Hirsch S, Sander A, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Lammer EJ, Aylsworth AS, Ardinger HH, Lidral AC, Pober BR, Moreno L, Arcos-Burgos M, Valencia C, Houdayer C, Bahuau M, Moretti-Ferreira D, Richieri-Costa A, Dixon MJ, Murray JC. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet*. 2002; 32(2):285–289.

19. Mangold E, Ludwig KU, Birnbaum S, Baluardo C, Ferrian M, Herms S, Reutter H, de Assis NA, Chawa TA, Mattheisen M, Steffens M, Barth S, Kluck N, Paul A, Becker J, Lauster C, Schmidt G, Braumann B, Scheer M, Reich RH, Hemprich A, Potzsch S, Blaumeiser B, Moebus S, Krawczak M, Schreiber S, Meitinger T, Wichmann HE, Steegers-Theunissen RP, Kramer FJ, Cichon S, Propping P, Wienker TF, Knapp M, Rubini M, Mossey PA, Hoffmann P, Nothen MM. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet.* 2010; 42(1):24–26
20. Marazita ML, Spence MA, Melnick M. Genetic analysis of cleft lip with or without cleft palate in Danish kindreds. *Am J Med Genet.* 1984; 19(1):9–18.
21. McGuire AL, Beskow LM. Informed consent in genomics and genetic research. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2010;11:361-81
22. Menezes R, Marazita ML, Goldstein McHenry T, Cooper ME, Bardi K, Brandon C, Letra A, Martin RA, Vieira AR. AXIS inhibition protein 2, orofacial clefts and a family history of cancer. *J Am Dent Assoc.* 2009; 140(1):80–84.
23. Mitchell LE. Mode of inheritance of oral clefts. In: Wyszyski DF, editor. *Cleft Lip and Palate: From Origin to Treatment.* Oxford University Press; 2002. pp. 234–239.
24. Mostowska AHK, Wojcicki P, Biedziak B, Paradowska P, Jagodzinski PP. Association between genetic variants of reported candidate genes or regions and risk of cleft lip with or without cleft palate in the polish population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010; 88(7):538–545.
25. Rahimov F, Jugessur A, Murray JC. Genetics of nonsyndromic orofacial clefts. *Cleft Palate Craniofacial Journal.* 2012; 49(1):73–91.
26. Shi M, Mostowska A, Jugessur A, Johnson MK, Mansilla MA, Christensen K, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC. Identification of microdeletions in candidate genes for cleft lip and/or palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2009; 85(1):42–51.
27. Sivertsen A, Wilcox AJ, Skjaerven R, Vindenes HA, Abyholm F, Harville E, Lie RT. Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population based cohort study of first degree relatives. *BMJ.* 2008;

- 336(7641):432–434.
28. Suzuki S, Marazita ML, Cooper ME, Miwa N, Hing A, Jugessur A, Natsume N, Shimozato K, Ohbayashi N, Suzuki Y, Niimi T, Minami K, Yamamoto M, Altannamar TJ, Erkhembaatar T, Furukawa H, Daack-Hirsch S, L'heureux J, Brandon CA, Weinberg SM, Neiswanger K, Deleyiannis FW, de Salamanca JE, Vieira AR, Lidral AC, Martin JF, Murray JC. Mutations in BMP4 are associated with subepithelial microform, and overt cleft lip. *Am J Hum Genet.* 2009; 84(3):406–411.
 29. Van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, van Amstel HK. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet.* 2000; 24(4):342–343.
 30. Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantés J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell.* 1994; 79(6):1111–1120.
 31. Wehby GL, Cassell CH. The impact of orofacial clefts on quality of life and healthcare use and costs. *Oral Dis.* 2010; 16(1):3–10.
 32. Wehby GL, Murray JC. Folic acid and orofacial clefts: a review of the evidence. *Oral Dis.* 2010;16(1):11–19.
 33. Wilkie AO, Slaney SF, Oldridge M, Poole MD, Ashworth GJ, Hockley AD, Hayward RD, David DJ, Pulleyn LJ, Rutland P, *et al.* Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. *Nat Genet.* 1995; 9(2):165–172.
 34. Yang J, Carmichael SL, Canfield M, Song J, Shaw GM, National Birth Defects Prevention Study. *Am J Epidemiol.* 2008 Jan 15; 167(2):145-54.
 35. Zhu JL, Basso O, Hasle H, Winther JF, Olsen JH, Olsen J. Do parents of children with congenital malformations have a higher cancer risk? A nationwide study in Denmark. *Br J Cancer.* 2002; 87(5):524–528.
 36. Gómez Joel, Gutiérrez Elizabeth, Labio y paladar hendido, *Revista Universitaria de Ciencias de la Salud*, Vol. 3 Num1, 2013, pp8.
 37. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SUMO1#diseases> y <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IRF6#diseases>

38. Alarcón, Juan Manuel, Revista Mexicana de Anestesiología, 2010, Pág. 76-78, Vol. 33, No. S1.
39. <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/HardySp.html>
40. <http://uvigen.fcien.edu.uy/utem/Popgen/popeq.html>
41. Monografía Geológico-Minera del estado de Querétaro, 1ra Ed, 1992.
42. Tang, MR, et al, SUMO1 genetic polymorphisms may contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip with or without palate: a meta-analysis. Genet Test Mol Biomarkers. 2014 Sep; 18(9):616-24.
43. Mijiti, A, et al, Association of single-nucleotide polymorphisms in the IRF6 gene with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in the Xinjiang Uyghur population. British Journal Oral Maxillofacial Surgery. 2015 Mar; 53(3):268-74.
44. Brito, LA, et al, IRF6 is a risk factor for nonsyndromic cleft lip in the Brazilian population, American Journal Med Genet A 2012 Sep;158A(9):2170-5

APÉNDICE

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

NOMBRE DEL PACIENTE _____
NÚMERO DE AFILIACIÓN _____ DE _____ AÑOS, CON DOMICILIO
EN _____
EN CALIDAD _____

DECLARO
QUE EL DOCTOR _____ ME HA EXPLICADO QUE ES
CONVENIENTE PROCEDER _____

Y QUE TODO ACTO MÉDICO, DIAGNÓSTICO O TERAPÉUTICO, SEA QUIRÚRGICO O NO QUIRÚRGICO LLEVA IMPLÍCITO UNA SERIE DE COMPLICACIONES MAYORES O MENORES, A VECES POTENCIALMENTE SERIAS, INCLUYENDO CIERTO RIESGO DE MORTALIDAD Y QUE PUEDEN REQUERIR TRATAMIENTOS COMPLEMENTARIOS MÉDICOS O QUIRÚRGICOS QUE AUMENTAN SU ESTANCIA HOSPITALARIA.

DICHAS COMPLICACIONES UNAS VECES SON DERIVADAS DIRECTAMENTE DE LA PROPIA TÉCNICA, PERO OTRAS DEPENDEN DEL PROCEDIMIENTO, DEL ESTADO PREVIO DEL PACIENTE Y DE LOS TRATAMIENTOS QUE ESTAN RECIBIENDO O DE LAS POSIBLES ANOMALÍAS ANATÓMICAS Y/O DE LA UTILIZACIÓN DE LOS EQUIPOS MÉDICOS.

ENTRE LAS COMPLICACIONES QUE PUEDEN SURGIR EN _____
SE ENCUENTRAN _____

POR LO QUE HE COMPRENDIDO LAS EXPLICACIONES QUE SE ME HAN FACILITADO EN EL LENGUAJE CLARO Y SENCILLO Y EL MÉDICO QUE ME HA ATENDIDO ME REALIZÓ TODAS LAS OBSERVACIONES Y ACLARÓ TODAS LAS DUDAS QUE LE HE PLANTEADO.

TAMBIÉN COMPRENDO QUE EN CUALQUIER MOMENTO Y SIN DAR NINGUNA EXPLICACIÓN, PUEDO REVOCAR EL CONSENTIMIENTO QUE AHORA PRESTO.

POR ELLO MANIFIESTO QUE ESTOY SATISFECHO (A) CON LA INFORMACIÓN RECIBIDA Y QUE COMPRENDO EL ALCANCE DE LOS RIESGOS DEL TRATAMIENTO O PROCEDIMIENTO.

DEL MISMO MODO DESIGNO A _____

PARA QUE EXCLUSIVAMENTE EL (ELLA) RECIBA INFORMACIÓN SOBRE MI ESTADO DE SALUD, DIAGNOSTICANDO, TRATAMIENTO Y/O PRONÓSTICO.

Y EN TALES CONDICIONES.

CONSIENTO

EN QUE SE ME REALICEN LOS PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO QUE ME FUERON EXPLICADOS Y QUE ME DOY POR ENTERADO EN MI DECLARACIÓN.

ASI COMO ME RESERVO EXPRESAMENTE EL DERECHO A REVOCAR MI CONSENTIMIENTO EN CUALQUIER MOMENTO ANTES DE QUE EL Y/O LOS PROCEDIMIENTOS OBJETO DE ESTE DOCUMENTO SEAN UNA REALIDAD.

QUERÉTARO, QRO. A _____ DE _____ DEL 200 _____

NOMBRE DEL MÉDICO

NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE

NOMBRE Y FIRMA DEL FAMILIAR

NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO