

Asociación entre marcadores moleculares localizados en 4q y fisura labiopalatina no sindrómica en población chilena.

Mónica Paredes Anaya¹, Rafael Blanco Castillo²

Resumen

El objetivo de la presente investigación fue probar la posible asociación de uno o más microsatélites localizados en 4q25-4q33 y FLPNS. Se analizó una muestra de 51 genealogías extensas. A partir de estas genealogías se obtuvieron 51 trios caso-progenitores, que se estudiaron con el programa extended transmission disequilibrium test (ETDT). Además se colectó a 51 probandos y 94 controles para un estudio caso-control en población chilena y se postuló comprobar las diferencias entre ambos estudios de asociación. Se analizaron los microsatélites D4S1570, D4S1615, FGA, UCP1 y D4S1597 ubicados en 4q, utilizándose la técnica de la polimerasa en cadena (PCR) para el análisis de ADN, marcándose la hebra líder con un fluorocromo. Los resultados electroforéticos fueron analizados en un secuenciador automático ABI PRISM 377. Observándose que FGA en el grupo control y FGA, D4S1570 y D4S1597 en los pacientes estaban en equilibrio de H-W. Estos resultados implican que un estudio caso-control no es adecuado para el estudio de estos marcadores. Para obviar este pro-

blema se utilizó el programa ETDT, observándose que los microsatélites D4S1570, UCP1 y D4S1597 presentaron una asociación tipo alélica en familias multiplex. Estos resultados sugieren que estos microsatélites se encontrarían cerca de 1 o más genes candidatos de esta malformación en la región 4q24-4q31.

Palabras claves: fisura labio palatina no sindrómica (FLPNS), estudio de asociación, extended transmission disequilibrium test (ETDT), microsatélites

Abstract

The objective of this investigation is to test the hypothesis of the possible association of one or more microsatellites located on 4q25-4q33 with NSCLP. In this study a sample of 51 extended pedigrees were analyzed. From these pedigrees a sample of 51 case-parents trios was obtained. A novel genetic analysis was carried out using the Extended Transmission Disequilibrium Test (ETDT). Also a case control study was carried out with the 51 probands of the case-parents trios plus a sample of 94 controls of the

1 Docente investigador, Instituto de Genética y Biología Molecular, Facultad de Medicina Humana, USMP.

2 Profesor Principal, Programa de Genética Humana, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, U. de Chile.

Chilean population to test if differences were observed resulting from the methods used for the association studies. Microsatellites D4S1570, D4S1615, FGA, UCP1 and D4S1597 located in 4q were analyzed. The polymerase chain reaction (PCR) was used for analysis of DNA. Forward primers were marked with fluorescent-dye-label. Electrophoresis and analyses were carried out in an ABI PRISM 377 automatic sequencer. In the case-control study, only FGA was in H-W equilibrium in controls, whereas FGA, D4S1570 y D4S1597 were in H-W equilibrium in cases. These results imply that a case control study does not represent an adequate procedure to carry out an association study between the aforementioned microsatellites and NSCLP. In order to obviate this problem the ETDT program was used. From all of the analyzed microsatellites, D4S1570, UCP1 and D4S1597 presented significant allele wise association in those case-parents trios to multiplex families. This result suggests that these microsatellites would be located close to one or more candidate genes for this malformation in 4q24-4q31.

Key words: Nonsyndromic cleft lip palate, association study, extended transmission disequilibrium test, microsatellites.

Introducción

La fisura labiopalatina no sindrómica (FLPNS) es una malformación congénita cuya tasa de incidencia es variable y depende del origen étnico de la población en estudio. Estas tasas van desde 1.7/1000 nacidos vivos en asiáticos, 1/1000 en caucásicos y 0.6/1000 en poblaciones de origen negroide (1).

Los primeros estudios de la FLPNS comenzaron analizando genealogías de familias afectadas con esta malformación, observando que había una tendencia a encontrar más de un afectado en ciertas familias (familias multiplex) en comparación a otras que tenían solo un afectado (familia simplex). Formalmente, estos estudios comenzaron en 1942 con Fogh Andersen (2), quien propuso un modo de herencia autosómico dominante con baja penetración. Posteriormente, diversos investigadores estudiaron el modo de herencia de esta malformación. Carter et al., (3) y Fraser FC (4) postularon el modelo multifactorial con umbral de expresión. A mediados de la década del ochenta, otros estudios sobre el modo de herencia postulan el modelo de gen mayor (5,6). En Chile, los estudios realizados por Palomino et al., (7)

y Blanco et al., (8) proponen el modelo de herencia de gen mayor autonómico dominante con baja penetración. Aunque el modo de herencia aún no está claramente determinado, en la actualidad, el modelo más aceptado es el de oligogenes (varios genes interactuando entre sí) (9), (10).

Con el propósito de identificar y ubicar a estos genes mayores del cual se tenía conocimiento por los estudios de modelo de herencia, es que se han utilizado las herramientas que brinda la genética molecular. Marcadores moleculares como RFLP's (*restriction fragment length polymorphism*), microsatélites o SNP's (*single nucleotide polymorphism*) han permitido la búsqueda de este gen candidato en las regiones cromosómicas 1q41, 2p13, 4p16, 4q25-31, 5q11, 6p13, 7p13 y 7q36, 17q21, 18q21 y 19q13 (11), (12), (13), (14), (15), (16).

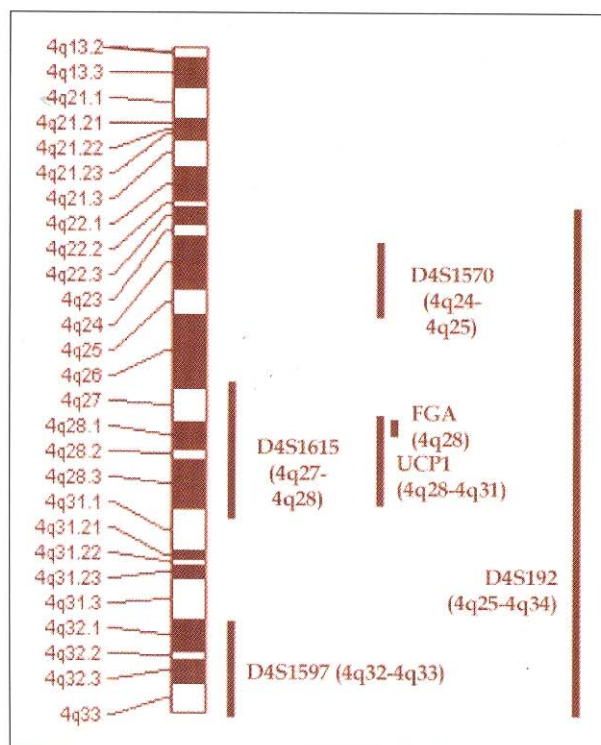
Algunos de estos estudios han propuesto que un locus para FLPNS estaría localizado en el brazo q del cromosoma 4 (17), (18). Considerando estos antecedentes, el objetivo de la presente tesis es investigar la posible asociación de uno o más microsatélites localizados en la región cromosómica 4q25-q33 con FLPNS.

Materiales y métodos

Con este fin se analizó una muestra de 51 genealogías con FLPNS a partir de las cuales se obtuvo una muestra de 51 trios caso-progenitores. Este análisis genético que evita los problemas de estratificación poblacional de los estudios caso-control es llevado a cabo aplicando el programa *Extended Transmission Disequilibrium Test* (ETDT) que fue desarrollado por Sham et al. (19). Además se analizó 51 probandos con FLPNS provenientes del diseño caso-progenitores y 94 individuos control de la población chilena para realizar un estudio caso-control, esto permitió comparar si existían diferencias en los resultados de asociación utilizando el estudio caso-control y el diseño de trios caso-progenitores.

Se utilizaron los microsatélites D4S1570, D4S1615, FGA, UCP1 y D4S1597 empleando los protocolos indicados por Dib et al., (20), Mill et al (21), Gyapay G. (22) comprendidos en la región anteriormente mencionada del cromosoma 4 (Figura N° 1).

Figura N° 1



Ideograma adaptado del www.gdb.org

En las muestras de ADN se analizaron los marcadores genéticos indicados mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este estudio se introdujo el uso de fluorocromos para marcar el partidor directo (*forward primer*), esto permitió cargar en un mismo carril de la electroforesis el producto de los diferentes microsatélites junto a un estándar de peso molecular también marcado con fluorocromo. La electroforesis y su lectura se llevaron a cabo en un secuenciador automático ABI-PRISM 377, equipo que capta las emisiones fluorescentes de los productos de PCR (Laboratorio de Síntesis y Análisis de Biomoléculas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile).

Resultados

Los resultados del análisis molecular fueron ingresados a bases de datos para el estudio caso-control y el diseño de tríos caso-progenitores. Previamente se determinó si la población chilena se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) en la población control chilena y en los probandos con FLPNS,

encontrándose que sólo FGA está en equilibrio de H-W ($p=0.577$; 0.925 , respectivamente) para la población control chilena (Tabla N° 1). En tanto que FGA ($p=0.953$; 0.904), D4S1570 (0.953 ; 0.217) y D4S1597 (0.747 ; 0.999) estaban en equilibrio de H-W en el grupo de fisurados (Tabla N° 2).

Estos resultados implicarían, que bajo las condiciones antes mencionadas y al efectuar un estudio de asociación con el diseño caso-control, este podría conducir fácilmente a lo que se denomina falsos positivos, razón por la cual esta metodología no parece adecuada para llevar a cabo el análisis de asociación propuesto entre los microsatélites antes mencionados y FLPNS.

Para obviar los problemas planteados en el párrafo anterior se utilizó el programa Extended Transmission Disequilibrium Test (ETDT) de Sham and Curtis, 1995. Este programa efectúa los análisis mediante la utilización de los tríos formados por los progenitores heterocigotos y el afectado.

Aplicando esta metodología, ETDT entrega tres resultados: la asociación tipo alélica, razón de alelos transmitidos vs no transmitidos y asociación tipo genotípica. Del total de microsatélites analizados sólo D4S1570 ($p=0.031$), UCP1 ($p=0.059$) y D4S1597 ($p=0.040$) presentaron asociación tipo alélica en tríos caso-progenitores provenientes de familias multiplex (tríos multiplex) (Tabla N° 3). La concordancia del resultado anteriormente mencionado y el antecedente de asociación caso-control del microsatélite D4S192 en población chilena (Paredes et al., 1999), sugieren que los tres microsatélites presentarían una asociación atribuible a la cercanía con un gen o genes candidatos para esta patología. Al subdividirse a los tríos en ascendiente con FLPNS por vía materna ($n=22$) o por vía paterna ($n=24$) se observó que sólo UCP1 presentó una asociación alélica en tríos multiplex por ascendiente materno ($p=0.041$).

El análisis de la razón entre los alelos transmitidos vs. los no transmitidos para cada microsatélite, no presentó una transmisión preferencial de alguno de los alelos con la malformación. Del mismo modo, los resultados obtenidos por la asociación tipo genotípica permiten deducir que sólo 3 de los 5 microsatélites presentaron una asociación para la forma genotípica. A pesar de las limitaciones que tiene ambos análisis, los resultados serían concordantes con las observaciones obtenidas en la asociación tipo alélica, es decir, que la región comprendida en este estudio contendría a uno o más genes candidatos para FLPNS.

Tabla N° 1

Equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) en controles para los microsatélites D4S1570, D4S1615, FGA, UCP1 y D4S1597.

Microsatélites	Equilibrio de Hardy - Weinberg	
	χ^2 de Pearson	Razón de Verosimilitud*
D4S1570	58.604 (p=0.000)	48.517 (p=0.009)
D4S1615	41.864 (p=0.004)	20.304 (p=0.502)
FGA	63.141 (p=0.577)	50.11 (p=0.925)
UCP1	89.065 (p=0.003)	69.997 (p=0.345)
D4S1597	55.276 (p=0.002)	42.452 (p=0.212)

* Versión STATA 7.0
 χ^2 significado (p<0.05)

Tabla N° 2

Equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) en FLPNS para los microsatélites D4S1570, D4S1615, FGA, UCP1 y D4S1597.

Microsatélites	Equilibrio de Hardy - Weinberg	
	χ^2 de Pearson	Razón de Verosimilitud*
D4S1570	30.343 (p=0.953)	42.301 (p=0.217)
D4S1615	30.969 (p=0.008)	34.091 (p=0.003)
FGA	30.343 (p=0.953)	33.16 (p=0.904)
UCP1	89.065 (p=0.030)	69.997 (p=0.345)
D4S1597	47.697 (p=0.747)	27.379 (p=0.999)

* Versión STATA 7.0
 χ^2 significado (p<0.05)

Tabla N° 3

Asociación para el total de alelos (allele-wise) de los microsatélites D4S1570, D4S1615, FGA, UCP1 y FLPNS utilizando el programa ETDT

	D4S170	D4S1615	FGA	UCP1	D4S1597
	A	A	A	A	A
Total de Tríos n=51	0.101	0.061	0.196	0.087	0.546
Tríos Mx n=23	0.031 ^B	0.108	0.790	0.059 ^B	0.040 ^B
Tríos Sx n=28	0.178	0.404	0.016	0.683	0.350
Tríos Mx origen materno* n=11	0.203	0.196	0.999	0.041 ^B	0.318
Tríos Mx origen paterno** n=12	0.265	0.999	0.459	0.243	0.095

A= probabilidad de la prueba de cociente de verosimilitud basado en distribuciones chi-cuadrado.

B= probabilidad estadísticamente significativa de la prueba de bondad de ajuste del modelo alélico.

*= Origen materno: factores genéticos que dan origen al probando y que se explican por vía materna.

**= Origen paterno: factores genéticos que dan origen al probando y que se explican por vía paterna.

Mx= Multiplex

Sx= Simplex

n= Número de tríos

Discusión

En resumen, el análisis utilizando el programa ETDT sugiere que la región cromosómica donde sería adecuado continuar con la búsqueda del gen candidato es donde se ubicarían los marcadores D4S1570, UCP1, y D4S1597 debido a la asociación tipo alélica encontrada al analizar a los tríos multiplex.

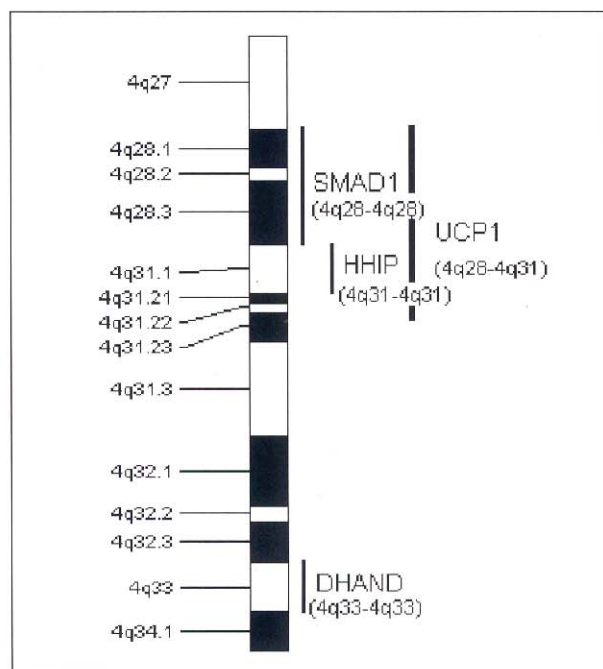
Considerando estos resultados, ha sido posible delimitar la región de búsqueda de genes candidatos de FLPNS a la región 4q24-4q31, quedando excluida la región 4q32-4q33 que es una región cromosómica que se hallaba asociada al llamado síndrome de 4q. La exclusión se fundamenta en el hecho que en dicha región se encontrarían genes involucrados en el desarrollo medio del cuerpo, en que se incluirían algunos

genes de desarrollo cráneo-maxilofacial (26,27). En este caso, la fisura estaría asociada a otras malformaciones y, por lo tanto, el gen o genes que están en esta región no serían sólo de fisura, sino probablemente genes de efecto pleiotrópico.

Los análisis que se realizaron en esta tesis se llevaron a cabo bajo este supuesto y se procedió a buscar a los posibles genes candidatos de FLPNS en la región 4q24-4q31 y de la delección de novo en 4q32-34. Se comenzó la búsqueda de genes en la página Web del Genome Data Base, luego se comparó esta información con antecedentes experimentales de estos genes candidatos y su posible función en el desarrollo cráneo-maxilo-facial. Se encontró que los genes (SMAD1) *mothers against decapentaplegic-mad* e (HHIP) *interacting hedgehog protein*, parecieran ser

los genes más probables de esa región cromosómica que estarían involucrados en la etiología de la FLPNS, ya que los resultados de trabajos experimentales demuestran fehacientemente que estos genes están involucrados en las vías metabólicas que conducen el desarrollo normal maxilofacial (23), (24), (25). En tanto que (DHAND) *Helix-loop-Helix Transcription Factor Derived of Neural Crest* sería un gen asociado a la delección de novo 4q32-q34 (26), (27) (Figura N° 2).

Figura N° 2



Conclusiones

Por lo expuesto, un aporte de esta investigación es la postulación de SMAD1 y HHIP como genes candidatos de FLPNS y, por lo tanto, la continuación a esta tesis sería realizar un análisis de "ligamiento en presencia de desequilibrio de ligamiento" de los genes candidatos antes mencionados en familias multiplex. Sin embargo, el aporte más interesante es la aplicación de dos metodologías diferentes en la búsqueda de genes candidatos en enfermedades complejas. Considerando que estas enfermedades representan aproximadamente el 90% de las enfermedades genéticas humanas, es importante el conocimiento de nue-

vas herramientas que permitan delimitar regiones cromosómicas y buscar los genes que darían cuenta del fenotipo en estudio.

De los resultados observados, el estudio de asociación utilizando el diseño de tríos caso-progenitores ha constituido una apropiada alternativa a los estudios caso-control para el estudio de enfermedades complejas como es el caso de esta malformación.

Mónica Paredes Anaya
Facultad de Medicina Humana
Universidad de San Martín de Porres

Referencia bibliográfica

1. VANDERAS, A.P.
Incidence of cleft lip, cleft palate and cleft lip and palate among races: a review. *Cleft Palate J.* 24: 216-225; 1987.
2. FOGH-AANDERSEN, P.
Inheritance of hare and palate an palate. Copenhagen, Nyt Nordish Forlag. Arnold Busck; 1942.
3. CARTER, C.O.
Genetics of common disorders. *Br Med Bull* 25:52-57; 1969.
4. FRASER, F.C.
Genetics of cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 22:336-352; 1970.
5. MARAZITA, M.L.; GOLKSTEIN, A.M.; SMA-LLEY, S.L. and SPENCE, M.A.
Cleft lip with or without cleft palate: reanalysis of a three-generation family study from England. *Genet epidemiol* 3: 335-342; 1986.
6. CHUNG, C.S.
Segregation analysis of cleft lip with or without cleft palate: a comparison of Danish and Japanese data. *Am J Hum Genet* 39: 603-611; 1986.

7. PALOMINO, H.; CAUVI, D.; BARTON, S. and CHAKRABORTY, R.
Facial clefting and amerindian admixture in populations of Santiago, Chile. *Am. J. Hum. Biol.* 225-232; 1997a.
8. BLANCO, R.; ARCOS-BURGOS, M.; PAREDES, M.; PALOMINO, H.; JARA, L.; CARREÑO, H.; OBREQUE, V. and MUÑOZ, M.A.
Complex segregation analysis of nonsyndromic cleft lip/palate in a Chilean population *Genetics and Molecular Biology* 21(1):139-141; 1998.
9. FARRAL, M. and HOLDER, S.
Familial recurrence-pattern analysis of cleft lip with or without cleft palate. *Am J Hum Genet* 50:270-277; 1992.
10. MITCHELL, L. and RISCH, N.
Mode of inheritance of non-syndromic cleft lip or without cleft palate: a reanalysis. *Am J Hum Genet* 51:323-332; 1992.
11. ARDINGER, H.H.; BURTON, K.H.; BELL, G.L.; BARDACH, J.; VAN-DEMARK, D.R.; MURRAY, J.C.
Association of genetic variation of the transforming growth factor alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 45: 348-353; 1989.
12. BEIRAGHI, S.; FOROUD, T.; DIOUHY, S.; BIXLER, D.; CONNEALLY, P.M.; DELOZIER-BLANCHET, D. and HODES, M.S.
Possible localization of a major gene for cleft lip and palate to 4q". *Clin Genet* 46:255-256; 1994.
13. CARINCI, F.; PEZZETTI, F.; SCAPOLI, L.; PADULA, E.; BACILEIRO, U.; CURIONI, C. and TOGNON, M.
Nonsyndromic cleft lip and palate: Evidence of linkage to microsatellite marker on 6p23. *Am J Hum Genet* 56: 337-339; 1995.
14. CARINCI, F.
Genetics of nonsyndromic cleft lip and palate: a review of international studies and data regarding the Italian population. *Cleft Palate Craniofac J* 37(1):33-40; 2000.
15. GASPAR, D.A.; MATIOLI, S.R.; PAVANELLO, R.C.; ARAUJO, B.C.; ANDRE, M.; STEMAN, S.; OTTO, P.A.; PASOS-BUENO, M.R.
Evidence that BCL3 plays a role in the etiology of nonsyndromic oral clefts in brazilian families. *Gen Epidemiol.* 23: 364-374; 2002.
16. MARTINELLI, M.; SCAPOLI, L.; PEZZETTI, F.; CARINICI, F.; CARINCI, P.; BACILIERO, U.; PADULA, E. and TOGNON, M.
Suggestive linkage between markers on chromosome 19q13.2 and nonsyndromic orofacial cleft malformation. *Genomics* 51(2):177-81; 1998.
17. PEZZETTI, F.; SCAPOLI, L.; MARTINELLI, M.; CARINCI, F.; BODO, M.; CARINCI, P. and TOGNON, M.
A locus in 2p13-p14 (OFC2), in addition to that mapped in 6p23, is involved in nonsyndromic familial orofacial cleft malformation. *Genomics* 50(3):299-305; 1998.
18. PAREDES, M.; CARREÑO, H.; SOLÁ, J.A.; SEGÚ, J.; PALOMINO, H. y BLANCO, R.
Asociación entre el fenotipo fisura labiopalatina no síndrómica y marcadores de microsatélite ubicados en 4q. *Rev Med Chile* 127: 1431-1438; 1999.
19. PAREDES, M.; SUAZO, J.; SANTOS, J.L.; CARREÑO, H.; JARA, L. y BLANCO, R.
Evidence of association between microsatellite located on 4q (4q24-4q33) and nonsyndromic cleft lip and palate in the Chilean population. *Genet Epidemiol* (submitted); 2003.
20. SHAM, P.C. and CURTIS, D.
An extended transmission disequilibrium test for multi-allele marker loci. *Ann Hum Genet*, 59: 323-336; 1995.
21. DIB, C.; FAURE, S.; FIZAMES, C.; SAMSON, D.; DROUOT, N.; VIGNAL, A.; MILLASSEAU, P.; MARC, S.; HAZAN, J.; SEBOUN, E.; LATHROP, M.; GYAPAY, G.; MORISSETTE, J.; WEISSENBAUGH, J.
A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellite. *Nature* 380: 152-154; 1996.
22. MILLS, K.A.; EVEN, D.; MURRAY, J.C.
Tetra-nucleotide repeat polymorphism at the alpha fibrinogen locus (FGA). *Hum Molec Genet* 1: 779; 1992.

23. CHUANG, P.T.; MCMAHON, A.P.
Vertebrate hedgehog signalling modulated by induction of a hedgehog-binding protein. *Nature* 397: 617-621; 1999.
24. DIJKE, P.T.; GOUMANS, M.J.; ITOH, F.; SUSUMO, M.J.
Regulation of cell proliferation by Smads proteins. *J Cell Physiol.* 191: 1-16; 2002.
25. HELMS, J.A.; KIM, C.H.; HU, D.; MINKOFF, R.; THALLER, C. and EICHELE, G.
Sonic hedgehog participates in craniofacial morphogenesis and is down-regulated by teratogenic doses of retinoic acid. *Dev Biol* 187: 25-35; 1997.
26. KEELING, S.L.; LEE-JONES, L.; THOMPSON, P.
Interstitial deletion 4q32-34 with ulnar deficiency: 4q33 may be the critical region in 4q terminal deletion syndrome. *Am J Med Genet* 99(1): 94-8; 2001.
27. HUANG, T.; LIN, A.E.; COX, G.F.; GOLDEN, W.L.; FELDMAN, G.L.; UTE, M.; SCHARANDER-STUMPEL, C.; KAMISAGO, M.; VERMEULEN, S.J.
Cardiac phenotypes in chromosome 4q-syndrome with and without deletion of the dHAND gene. *Genet. Med* (6): 464-7; 2002.