



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES,
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Análisis de asimetría bilateral en el estudio de fisuras orales en Patagonia

Tesis presentada para optar el título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Julia Ratowiecki

Directores de tesis: Dr. Fernando A. Poletta
Codirector de tesis: Dr. Jorge S. López Camelo

Consejero de Estudios: Dr. Hernán Dopazo

Lugar de trabajo: Laboratorio de Epidemiología Genética, UE CEMIC-CONICET

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 22 de Agosto 2024

Análisis de asimetría bilateral en el estudio de fisuras orales en Patagonia

Resumen

Las fisuras orales son un conjunto de malformaciones congénitas ocasionadas por disturbios durante el desarrollo craneofacial y presentan una etiología compleja, heterogénea y multifactorial. Dentro de estas, el labio leporino con o sin paladar hendido (LL/PH) tiene gran relevancia en salud pública por su frecuencia a nivel mundial y por las consecuencias en la morbilidad de los afectados y el impacto en la calidad de vida de los pacientes y sus familias. Existe evidencia previa de que en la población de la Patagonia argentina hay una mayor frecuencia de la esperada de casos no sindrómicos de LL/PH (LL/PHns), posiblemente debido a una única o unas pocas causas aumentadas en esta población.

El objetivo del presente trabajo de tesis doctoral es dilucidar los factores genéticos involucrados en el nivel de asimetría bilateral, como manifestación de una menor capacidad de canalización, y su interacción con genes de susceptibilidad para el LL/PHns en esta población. Para este fin, se obtuvieron datos clínicos y genealógicos, medidas antropométricas y muestras biológicas de más de 300 individuos que dieron su consentimiento informado para participar del estudio, incluyendo pacientes con LL/PHns, sus familiares no afectados y controles no relacionados de la misma región. Se aplicó un abordaje innovador que combina la cuantificación de asimetría bilateral (AB) a partir de dermatoglifos y de morfometría geométrica utilizando landmarks sobre imágenes faciales 3D y un barrido amplio del genoma utilizando un *microarray* genómico de más de 500.000 SNPs.

Se comparó el nivel de AB entre subgrupos según la lateralidad de la fisura labial y según la recurrencia familiar. Para los indicadores generados a partir de los dermatoglifos, el IDPF y el IAD, los casos pertenecientes a familias con alta recurrencia presentaron mayores niveles de AB diferenciándose de los controles y de los casos de familias con baja recurrencia. Lo cual indicaría que los casos de familias con alta recurrencia se diferencian de aquellos esporádicos. En el caso de la asimetría bilateral facial en individuos no afectados, los

parientes de primer grado de pacientes mostraron mayor AB que los controles no relacionados.

En conjunto, estas observaciones podrían sugerir la existencia en estas familias de una mayor susceptibilidad ante disturbios durante el desarrollo embrionario, posiblemente con un *background* multifactorial. Lo cual incrementaría el riesgo basal sobre el que podrían actuar genes principales segregando en las familias de mayor recurrencia.

Se estudió cuáles eran los factores genéticos relacionados con el nivel de asimetría y se encontraron genes que cumplen importantes funciones biológicas relacionadas con la diferenciación, la proliferación, la adhesión, la comunicación, factores involucrados con la vía de WNT importante en el desarrollo embrionario, y ARN no codificantes que principalmente regulan la expresión de múltiples genes. Además se realizó un análisis de asociación basado en familias con el foco en identificar los factores relacionados con el LL/PHns en esta población. Los SNPs seleccionados en ambos análisis de asociación se utilizaron en el análisis caso-control integrador. Este abordaje concluyó con unas redes bayesianas que sintetizan las interacciones génicas sobre la ocurrencia de LL/PHns en esta población. En este estudio exploratorio se obtuvieron interesantes relaciones entre genes: NOTCH1-BAHCC1-COL6A2 un trío cuyo efecto sobre el LL/PHns pareciera estar mediado por una zona intergénica ubicada en el locus 1q23.1, y la relación entre MUC5B/MUC5B-AS1 y sexo. Por último, se encontró un SNP en el gen VANGL1 relacionado con la recurrencia familiar, el cual podría estar involucrado en los casos con alta recurrencia y relacionado con la alta frecuencia observada en esta población. Son hallazgos muy interesantes sobre el efecto de factores genéticos asociados a la inestabilidad embrionaria y a la mayor susceptibilidad al LL/PHns existente en Patagonia.

Palabras clave: *Fisuras orales, labio leporino con o sin paladar hendido, asimetría bilateral, canalización, (in)estabilidad embrionaria, genes, Patagonia*

Analysis of bilateral asymmetry in the study of oral clefts in Patagonia

Abstract

Oral clefts are a group of congenital malformations caused by disturbances during craniofacial development and present a complex, heterogeneous and multifactorial etiology. Within these, cleft lip with or without cleft palate (CL/P) has great relevance in public health because of its frequency worldwide and the consequences on the morbidity of those affected and the impact on the quality of life of patients and their families. There is previous evidence that in the population of Argentine Patagonia there is a higher frequency than expected of nonsyndromic cases of CL/P (nsCL/P), possibly due to a single or a few increased causes in this population.

The final aim of this doctoral thesis is to elucidate the genetic factors associated with nsCL/P in this population. For this purpose, clinical and genealogical data, anthropometric measurements and biological samples were obtained from more than 300 individuals who gave their informed consent to participate in the study, including patients with nsCL/P, their unaffected relatives and unrelated controls from the same region. An innovative approach was applied that combines the quantification of bilateral asymmetry (BA) from dermatoglyphics and geometric morphometry using landmarks on 3D facial images and a genome wide association study using a genomic microarray of more than 500,000 SNPs.

The level of BA was compared between subgroups according to laterality of the labial fissure and family recurrence. For the indicators generated from dermatoglyphics, IDPF and IAD, cases from families with high recurrence presented higher levels of BA, differing from controls and from cases from families with low recurrence. Which would indicate that the cases of families with high recurrence differ from those sporadic. In the case of bilateral facial asymmetry in unaffected individuals, first-degree relatives of patients showed higher BA than unrelated controls.

Taken together, these observations could suggest the existence in these families of a greater susceptibility to disturbances during embryonic development, possibly with a multifactorial background. This would increase the baseline risk on which main genes could act by segregating in families with greater recurrence.

We studied the genetic factors related to the level of asymmetry and found genes that fulfill important biological functions related to differentiation, proliferation, adhesion, communication, factors involved with the WNT pathway important in embryonic development, and various ncRNA that primarily regulate the expression of multiple genes. In addition, a family-based association analysis was performed with the focus on identifying factors related to nsCL/P in this population. The SNPs selected in both association analyses were used in the integrative case-control analysis. This approach concluded with Bayesian networks that simplify possible junctions between genes related to increased susceptibility and how they relate to the pathology. In this exploratory study interesting gene relationships were obtained: NOTCH1-BAHCC1-COL6A2 a trio that appears to be mediated by an intergenic zone located at the locus 1q23.1, and the relationship between MUC5B/MUC5B-AS1 and sex. Finally, a SNP was found in the VANGL1 gene related to family recurrence, which could be involved in cases with high recurrence and related to the high frequency observed in this population. They are very interesting findings on the effect of genetic factors associated with embryonic instability and the greater susceptibility to nsCL/P existing in Patagonia.

Key words: Oral clefts, cleft lip and palate, bilateral asymmetry, canalization, development (in)stability, genes, Patagonia

Reconocimientos

A CONICET por otorgar la Beca Interna Doctoral y a la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (AGENCIA I+D+i) por los PICT que dieron los recursos económicos necesarios para el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Universidad pública, laica y gratuita, donde desarrollé todos mis estudios universitarios y de posgrado. Gracias a los docentes de quienes aprendí mucho. A Hernán Dopazo quien me aconsejó y guió mi plan de estudios.

A las autoridades del Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas “Norberto Quirno” CEMIC, Presidente Acad. Roberto Arana; Director de la Unidad Académica del Instituto de Investigaciones CEMIC-IUC, Acad. Enrique Gadow; Director de la Unidad Ejecutora CEMIC-CONICET, Dr Jorge López Camelo y a la Coordinación del ECLAMC en Buenos Aires con sede en la Unidad de Epidemiología Genética de la Dirección de Investigación.

A las familias que participaron en el proyecto, por su disposición, por brindar su tiempo e información indispensable para que esta investigación pueda llevarse a cabo. A los médicos del ECLAMC en la Patagonia por contactar a las familias. A los grupos colaboradores del proyecto Patagonia que diseñaron y llevaron a cabo las campañas en las cuales se registraron los casos, se obtuvieron las muestras biológicas y la información genealógica.

Agradecimientos

A la familia ECLAMC. Gracias al equipo, Maru, Lucas, Ale, Rita, Sil, Moni, Hebe, Darío, Rocío, Marie, Elenita, Hugo, Ana, Juan, Fer y Jorge. Gracias por la buena compañía, la ayuda, la escucha, los consejos y la buena onda. Gracias por hacer de un equipo de trabajo, una familia. Por enseñar con el ejemplo. Por acompañarme en mi crecimiento profesional y personal. Por las ideas, por la humanidad y el cariño que comparten. A Jorge por abrirme las puertas a este grupo, a la familia ECLAMC. A Jor y Fer, gracias por guiarme en este proceso de tesis, por escucharme y enseñarme. Gracias por su paciencia y su confianza. Los quiero ECLAMC!

A mis amigas y a mis amigos. Gracias por bancarme en este trayecto, alentarme y hacer mi vida mucho más divertida! Los quiero mucho!

A mi familia. En particular a mi núcleo familiar: Lu, Ma y Pa. Son incondicionales. Gracias por ayudarme a no bajar los brazos, por siempre escucharme, ayudarme y acompañarme en todo lo que me propongo. Gracias por ser mi familia, los amo.

¡GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS!

Abreviaturas

AB: asimetría bilateral
AC: anomalía(s) congénita(s)
AD: asimetría direccional
AF: asimetría fluctuante
AS: antisimetría
CCN: células de la cresta neural
cAD: componente de asimetría direccional
cAF: componente de asimetría fluctuante
IAD: índice de asimetría direccional
IDPF: índice de disimilitud en el patrón de figuras
IHS: índice de historia familiar
LL: labio leporino
LLP: labio leporino con paladar hendido
LL/PH: labio leporino con o sin paladar hendido
LL/PHns: labio leporino con o sin paladar hendido no sindrómico
LMK: landmark(s)
MC: morfometría clásica
MG: morfometría geométrica
miRNA: micro ARN
ncRNA: ARN no codificante
lncRNA: ARN largo no codificante
lincRNA: ARN largo intergénico no codificante
pi-RNA: ARN no codificante que interactúa con Piwi
PH: paladar hendido
PCA: análisis de componentes principales
qassoc: Análisis de asociación cuantitativo
SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms
TDT: Test de Desequilibrio de Transmisión

Índice

Resumen.....	2
Abstract.....	4
Reconocimientos.....	6
Agradecimientos.....	7
Abreviaturas.....	7
Índice.....	9
Introducción.....	11
Epidemiología de las fisuras orales.....	11
Embriología de las fisuras orales.....	12
Etiología multifactorial de la fisuras orales.....	14
Asimetría bilateral como indicador de (in)estabilidad embrionaria.....	15
Extensión del análisis fenotípico.....	18
Objetivo General.....	21
Hipótesis.....	21
Material.....	22
Población de estudio.....	22
Muestra.....	23
Definición de Caso.....	25
Capítulo I: Asimetría bilateral a partir del estudio de los dermatoglifos.....	26
Antecedentes.....	26
Objetivos específicos.....	27
Metodología.....	27
Resultados.....	32
Capítulo II: Asimetría bilateral a partir de morfometría geométrica sobre imágenes faciales 3D.....	40
Antecedentes.....	40
Objetivos específicos.....	41
Metodología.....	42
Resultados.....	47
Capítulo III: Análisis de asociación génica.....	51
Antecedentes.....	51
Objetivos específicos.....	52
Metodología.....	53
Resultados.....	59
Discusión.....	67
Conclusión.....	88

Bibliografía.....	89
Anexo I.....	102
Anexo II. Tablas suplementarias.....	103
Capítulo I.....	103
Capítulo II.....	109

Introducción

Epidemiología de las fisuras orales

Las fisuras orales (FOs) son anomalías congénitas resultado de disrupciones en los mecanismos embriológicos del desarrollo craneofacial. Las FOs tienen importantes consecuencias sobre la morbilidad, mortalidad y la calidad de vida de los afectados y sus familias. Los pacientes suelen requerir numerosas intervenciones quirúrgicas, médicas, nutricionales, odontológicas, fonoaudiológicas y psicológicas, representando una carga económica, psicológica y social importante para el paciente, su familia y el sistema regional de salud [Wehby & Cassell, 2010; Leslie & Marazita, 2013].

Entre las manifestaciones más frecuentes de FOs se encuentran el labio leporino (LL), el labio leporino con paladar hendido (LLPH) y el paladar hendido (PH). Hay extensa literatura que a partir de las características etiológicas y epidemiológicas, discrimina al PH del labio leporino con o sin paladar hendido (LL/PH), en los que consideran que LL y LLPH corresponden a una misma entidad cuya diferencia se centra en la severidad y su expresión heterogénea [Fogh-Andersen 1942; Mossey et al., 2002, 2009, 2012; Sivertsen et al. 2008; Marazita, 2012]. Sin embargo, otros autores defienden que LL y LLPH corresponden a entidades diferentes [Harville et al., 2005]. Además de la presencia o ausencia de la fisura palatina, la fisura labial puede estar completa o incompleta (extensión desde labio-alveolo-paladar) y ser unilateral o bilateral. Mundialmente, existe mayor prevalencia de fisura labial unilateral izquierda que unilateral derecha y bilateral [Mossey et al., 2002, 2009, 2012; Gundlach & Maus, 2006; Poletta et al. 2007].

Las FOs pueden dividirse en aisladas y asociadas, según presenten o no alguna otra anomalía relacionada con el desarrollo [Dixon et al. 2011]. Algunos síndromes que incluyen FOs en su manifestación son el de Van der Woude y el de Wolf-Hirschhorn, entre otros [OMIM, 2024]. El LL/PH ocurre mayoritariamente en forma aislada (cerca del 70%) y es más frecuente en hombres que en mujeres. En contraposición, el 50% de los casos de paladar hendido son sindrómicos, con múltiples malformaciones y causa conocida, y es más frecuente en mujeres que en hombres [Mossey et al., 2002, 2009, 2012].

Los casos de LL/PH aislados sin diagnóstico definido se conocen como no sindrómicos (LL/PHns). El LL/PHns afecta cerca de 1/1000 recién nacidos a nivel mundial y su frecuencia varía de acuerdo al origen étnico y geográfico [Vanderas, 1987; Mossey et al., 2001, 2002, 2009, 2012; Poletta et al. 2007; Brito et al., 2011].

En Sudamérica la prevalencia de LL/PH al nacimiento observada por el grupo ECLAMC (Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas) entre los años 1967-2004 fue de 12,2/10000, con variaciones según el origen geográfico, la etnicidad, y las condiciones socioeconómicas [Poletta et al., 2007; Pawluk et al., 2018]. En particular, se halló una región de alta frecuencia (*cluster*) de LL/PHns en la Patagonia Argentina con una prevalencia observada de 17,6 por 10.000 nacimientos. A partir de eso, se inició una línea de investigación sobre FOs en esta población. En la cual, mediante un abordaje caso-control, dicho *cluster* mostró una asociación estadísticamente significativa con ascendencia nativa/americana, con variables asociadas al bajo nivel socioeconómico como baja educación materna y los extremos de edad parental [Poletta et al. 2007].

Embriología de las fisuras orales

El desarrollo orofacial abarca procesos complejos, dinámicos y coordinados de migración, diferenciación, crecimiento y apoptosis celular [Dixon et al., 2011; Mossey et al., 2009]. Cualquier defecto en estos procesos puede resultar en una fisura labial o palatina. Ambas pueden presentarse en conjunto pero los orígenes embrionarios son diferentes [Compagnucci et al., 2021].

Comienza el día 14 de gestación cuando aparece la placa precordial en el extremo craneal del disco embrionario determinando el lugar de formación del estomodeo (o boca) [Sperber, 2002]. Durante esta etapa temprana embrionaria, las células de la cresta neural (CCN) cumplen un rol fundamental. Las CCN se originan en el ectodermo, en los márgenes del tubo neural, y migran en un estado transformado de “epitelio-mesenquimáticas” a la región craneofacial en desarrollo. La migración y proliferación mitótica de las CCN y su interacción con la matriz extracelular determinan la formación de tejido neural, muscular, esquelético y conectivo [Sarkar., 2001]. Junto con células ectodérmicas y mesodérmicas, las CCN forman

los arcos faríngeos de los cuales se originan los cinco procesos fundamentales del desarrollo orofacial: el frontonasal y los pares bilaterales mandibulares y maxilares [Compagnucci et al., 2021]. La migración de las CCN está principalmente controlada por los genes regulatorios como los de la familia HOX, sonic hedgehog (*SHH*), el segmento muscular 1 (*MSX1*), el factor de transcripción goosecoid (*GSC*), el factor morfogenético del hueso 4 (*BMP4*) y el factor de crecimiento de fibroblastos (*FGF*), entre otros. También intervienen nectinas y caderinas, entre otras proteínas involucradas en la adhesión celular [Ji et al., 2020].

Alrededor de la cuarta semana las prominencias frontonasal, maxilares y mandibulares se acercan y como consecuencia se forma la cavidad oral. La formación de la placa nasal divide la prominencia frontonasal en procesos nasales mediales y laterales pareados, cuya fusión con los procesos maxilares durante la sexta semana determina la formación del labio superior [Hammond & Dixon, 2022]. Los procesos mediales nasales se fusionan y determinan la formación del segmento intermaxilar que luego deriva en el filtrum y el paladar primario. Posteriormente, los procesos laterales nasales forman las alas nasales mientras que los mediales y el maxilar desarrollan el labio superior. El labio y la mandíbula inferior se forman por la fusión entre el proceso medial y los mandibulares [Hammond & Dixon, 2022]. Cualquier falla en la fusión de las estructuras faciales durante estos procesos puede derivar en una fisura labial.

El paladar secundario comienza hacia el final de la sexta semana y surge del crecimiento de los procesos laterales maxilares [Burdi & Faist, 1967]. En un principio las placas palatinas crecen de forma vertical detrás del paladar primario y lateral a la lengua en desarrollo. En la octava semana del desarrollo, hay una reorientación, y consiguiente contacto entre las placas. Durante la novena semana hay una fusión de las mismas primero en la zona anterior y luego en la posterior. Como consecuencia el paladar secundario se fusiona con el primario, y el mesénquima que lo forma se diferencia en tejido muscular y óseo determinando el paladar blando y duro, respectivamente. Estos procesos terminan durante la décima semana de gestación con la separación de las cavidades oral y nasal [Gritli-Linde, 2007]. Existe una diferencia temporal entre los sexos, la fusión y el cierre del paladar comienza unos días antes en los embriones masculinos que en los femeninos [Burdi & Faist., 1967]. Algunos elementos extracelulares como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), las metaloproteasas y sus reguladores, y los Factores Transformadores de Crecimiento alfa y beta ($TGF\alpha$, $TGF\beta1$,

TGF β 3) influyen en la regulación de los procesos de cierre del paladar [Li et al., 2018]. Las fallas durante estos procesos pueden derivar en una fisura palatina.

Etiología multifactorial de la fisuras orales

Está descrito que la etiología del LL/PHns es compleja, heterogénea y multifactorial [Mossey et al., 2009; Dixon et al., 2011; Garland et al., 2020]. La heterogeneidad causal se ve en que muchos factores diferentes, y en distinta frecuencia, fueron relacionados con el LL/PHns. La combinación de genes, factores ambientales endógenos y exógenos, interacciones entre genes y/o con agentes ambientales, y se piensa que algunas modificaciones epigenéticas, pueden afectar los diferentes mecanismos biológicos del desarrollo craneofacial y así dar lugar a la formación de la fisura [Jiang et al., 2006].

Entre los factores de riesgo ambientales encontrados para el LL/PHns está el consumo materno de alcohol y de tabaco (activo y pasivo) [Little, Cardy & Munger, 2004; Mossey et al., 2009], la falta de oxígeno como mecanismo de acción del tabaco [Vieira & Dattilo., 2018], el consumo de drogas vasodilatadoras, antiepilépticas y de drogas para tratar el acné y la psoriasis [Palmieri et al., 2008]. En contraposición, el consumo de vitaminas como B6 y B12, una nutrición y atención médica adecuada, y el suplemento con ácido fólico reducirían el riesgo de LL/PHns [Munger et al., 2004; Badovinac et al., 2007; Mossey et al., 2009].

La recurrencia familiar observada y los análisis estadísticos correspondientes mostraron que la historia familiar positiva es un factor de riesgo para el LL/PHns [Mitchell & Risch, 1992, 1993; Acuña-González et al., 2011; Figueiredo et al., 2015; Jamilian et al., 2017]. Aunque la evidencia de agregación familiar de LL/PHns es anterior, en 1942 Fogh-Andersen ya había observado un patrón de herencia autosómica dominante con baja penetrancia en algunas familias.

En la década de 1960 Falconer propuso el modelo multifactorial aditivo del umbral conocido como *multifactorial threshold model (MFT model)* para enfermedades complejas y caracteres cuantitativos [Falconer., 1960]. En este modelo, cada factor sea de origen genético o

ambiental, tiene un efecto pequeño, y si la sumatoria de los mismos supera cierto umbral se manifiesta la patología (Figura 1). Los primeros en proponer este modelo de herencia para LL/PHns fueron Carter 1969 y Fraser 1970, y posteriormente en Grosen et al. 2010. Mientras que algunas observaciones epidemiológicas iban acordes a este modelo, a partir de los consecuentes análisis de segregación se evidenció que para la mayoría de las poblaciones estudiadas el modelo de herencia más aceptado para las FOs no sindrómicas consiste en la acción de unos pocos genes con mayor efecto (modelo oligogénico), y en algunos casos, junto con un *background* multifactorial [Marazita 1986; Mitchell & Risch 1992; Farral & Holder 1992; Mitchell & Christensen 1996; Palomino 2000; Sivertsen 2008; Marazita., 2012].

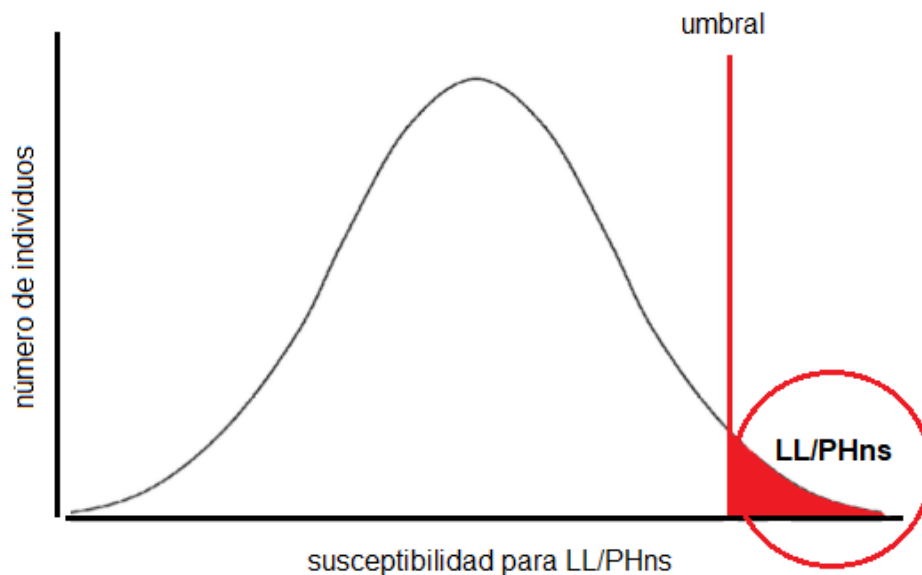


Figura 1. Ejemplo del modelo multifactorial del umbral para el LL/PHns. Cada individuo tiene un nivel de susceptibilidad generado por genes, factores ambientales y su interacción, que superado cierto umbral se manifiesta la fisura. Modificada de Howe et al., 2018.

Asimetría bilateral como indicador de (in)estabilidad embrionaria

La exposición a factores tanto ambientales como genéticos durante la embriogénesis puede distorsionar el desarrollo. La capacidad de continuar con el plan embrionario luego de que ha sido forzado a abandonarlo se conoce como canalización [Waddington, 1959]. Cuando el embrión tiene menos habilidad de amortiguar los efectos de las perturbaciones, se encuentra

en una situación de inestabilidad que repercute en un aumento de las desviaciones del plan ontogenético de desarrollo. Hay evidencia de que los embriones femeninos poseen mejor capacidad de *buffer* y mayor estabilidad, ligada a un origen probablemente genético, aunque los mecanismos aún no están dilucidados, y es posible que haya una regulación epigenética involucrada [Lejarraga, 2021].

Se dice que un organismo tiene simetría bilateral cuando el cuerpo presenta un plano medial que lo divide en dos mitades iguales. Existen dos manifestaciones posibles de simetría bilateral: *simetría de espejo*, cuando dos cuerpos son imágenes especulares entre sí y el eje o plano de simetría es externo, y *simetría de objeto*, cuando la configuración de un único cuerpo incluye la línea o plano de simetría [Klingenberg et al., 2002]. El cuerpo humano tiene simetría bilateral y se divide en lados derecho e izquierdo: las manos representan un ejemplo de *simetría de espejo* (Figura 2.A.), mientras que la cara presenta *simetría de objeto* (Figura 2.B).

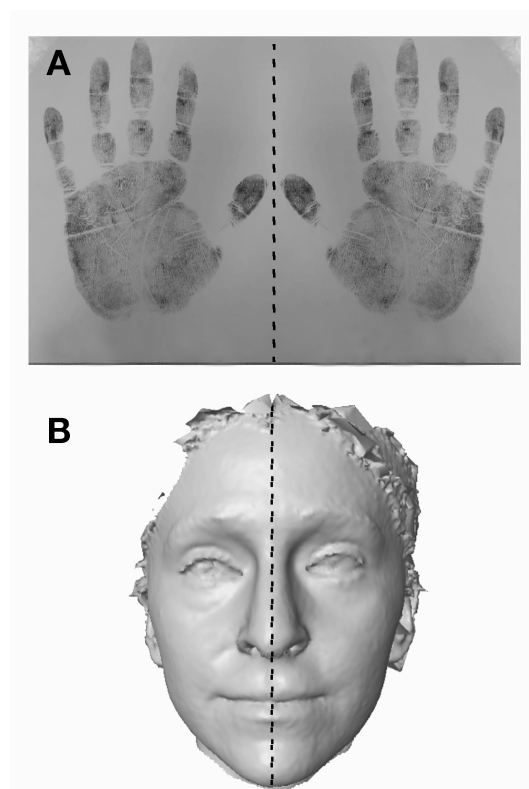


Figura 2: Explicación gráfica de los tipos de simetría: A. Dermatoglifos como ejemplo de simetría de espejo y B. Cara como ejemplo de simetría de objeto. Inspirada en Klingenberg et al., 2002.

Las desviaciones del patrón de simetría se conocen como asimetría bilateral (AB) y existen tres posibles patrones de asimetría a nivel poblacional para algún determinado carácter: asimetría direccional (AD), antisimetría (AS) y asimetría fluctuante (AF) [Van Valen, 1962]. Se entiende por AD cuando las diferencias bilaterales de un rasgo tienen *mayoritariamente* el mismo sentido en toda la población. Como ejemplo de AD en humanos: que en el lado izquierdo del cuerpo está presente el corazón y el pulmón tiene dos lóbulos, mientras que el pulmón derecho tiene tres. Esta disposición se encuentra extendida para toda la especie, sin embargo, existen individuos que nacen con todos los órganos y las asimetrías invertidas. Se conoce como *situs inversus* y es muy poco frecuente presentándose en el 0,01% de la población mundial [Grimes & Burdine., 2017]. Otros ejemplos son la predominancia de la mano diestra sobre la zurda como mano hábil, y, como se menciona anteriormente, la mayor frecuencia de la fisura labial unilateral del lado izquierdo sobre la del derecho. En los caracteres con este patrón de asimetría bilateral se estima que existe un factor crónico genético o ambiental presente en la población que regula este direccionamiento [Weinberg et al., 2006]. Cuando en una población existe agrupación para ambos sentidos, derecho e izquierdo, y en una frecuencia relevante (2 modas, estadísticamente hablando), se conoce como AS, y podría estar expresando una estructuración dentro de la población. Un ejemplo de AS en zoología es el caso cangrejos del género *Uca*, en el cual el macho tiene la pinza de un lado mayor que la del otro y aproximadamente con idéntica frecuencia en los dos lados en casi todas las especies del género [Ventura., 2004]. Las diferencias de algunos caracteres cuantitativos continuos entre ambos lados pueden ser sutiles, de pequeña magnitud y estar aleatoriamente distribuidas mostrando una distribución simétrica de las diferencias entre los lados con media en cero. Es decir, individualmente existen diferencias en el carácter entre ambos lados pero a nivel poblacional -o grupal- no se ve una dirección hacia uno de los lados. Cuando esto ocurre se entiende que el patrón de asimetría es fluctuante (AF).

La determinación del patrón de asimetría para un carácter cuantitativo se puede realizar gráficamente. Si el carácter es univariado, se hace un histograma de frecuencias, y, si en cambio, el carácter es multivariado, mediante un gráfico de los primeros componentes principales. En la Figura 3 se muestra la representación teórica de cada tipo de patrón: (A-C) para caracteres univariados, una campana centrada en cero para AF, una campana con media significativamente distinta de cero para AD y una distribución bimodal para el caso de AS; (D-F) vectores aleatoriamente distribuidos para AF, vectores con un 80% para uno de los lados en el caso de AD, y doble agrupamiento de vectores cuando el patrón es AS.

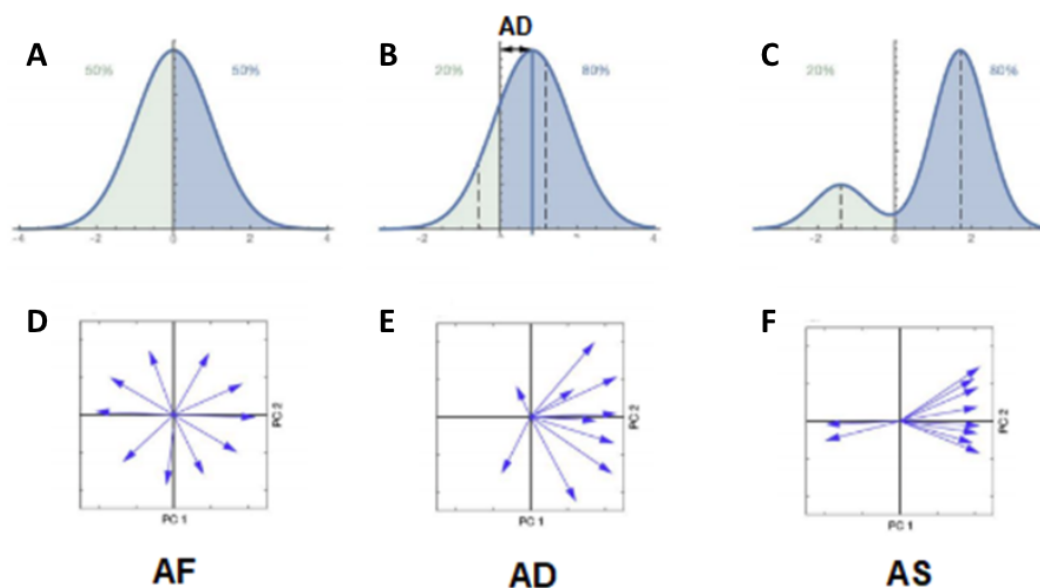


Figura 3. Patrones de asimetría bilateral para caracteres cuantitativos continuos univariados (fila arriba) y multivariados (fila abajo): asimetría fluctuante (AF), direccional (AD) y antisimetría (AS).
Modificada de Neubauer et al., 2020.

Comúnmente se entiende como asimetría fluctuante a las desviaciones individuales del carácter cuantitativo continuo evaluado. Estas desviaciones se deben a factores internos y externos, y el aumento de las mismas es considerado un buen indicador de inestabilidad embrionaria ya que los disturbios pueden manifestarse como errores y diferencias entre ambos lados del organismo [Babler, 1991; Graham & Özener., 2016]. Algunos rasgos comunes en humanos que se utilizan para cuantificar la AB son la distancia interpalpebral, la relación entre la longitud del dedo índice y anular -conocida como 2D:4D de las manos-, el recuento de crestas de los dermatoglifos, entre otros.

Extensión del análisis fenotípico

Dado que la variabilidad fenotípica del LL/PHns podría deberse a distintas entidades causales, analizar características morfológicas por fuera de la clasificación 'presencia o ausencia de fisura oral' ayudaría a encontrar casos más homogéneos entre sí que direccionen la búsqueda de agentes causales. Por otro lado, la agregación familiar de casos de LL/PHns observada deja implícito la posibilidad de un riesgo existente en individuos '*no afectados*' que

podrían estar presentando características distintivas subclínicas asociadas a la fisura. Por estos motivos, ampliar el espectro fenotípico del LL/PHns estudiando otras características morfológicas en las familias de forma cualitativa y cuantitativa aumentaría la posibilidad de hallar nuevos elementos en la etiología [Weinberg et al., 2006]. Bajo este principio distintas investigaciones centradas en la etiopatogénesis del LL/PHns incluyeron la evaluación del músculo Orbicularis Oris, la presencia de verticilos labiales, la caracterización cuantitativa de rasgos faciales como la longitud de la oreja, la distancia interpalpebral o la presencia de anomalías dentales, entre otros caracteres, analizando individuos afectados, parientes no afectados y controles [Weinberg et al., 2006, 2009; Vieira et al., 2008; Miller et al., 2014; Zhang et al., 2018; Indencleef et al., 2018, 2021].

Entre los rasgos más estudiados se encuentran los dermatoglifos, es decir, los patrones morfológicos de las huellas dactilares (ver Figura 2.A). Estos han sido utilizados en ciencias forenses, antropología y genética clásica para el estudio de varios síndromes. La configuración de las crestas epidérmicas, que derivan de la capa embrionaria ectodérmica, está precedida por la formación de las almohadillas volares ("volar pads" en inglés), que comienza a mediados de la sexta semana y se determina alrededor de la décima semana de gestación, siendo el período crítico de diferenciación de los dermatoglifos, entre la onceava y la decimoséptima semana de gestación [Penrose & Ohara, 1973]. Además, los patrones de los dermatoglifos permanecen sin cambios durante toda la ontogenia, tal cuestión ha sido demostrada por Galton en 1892 como se menciona en la revisión realizada por Babler (1991). En la misma, el autor recapitula los hitos relacionados con el uso de los dermatoglifos en el estudio clínico: primero en la relación con el síndrome de Down observada por Cummins en 1936; luego la asociación entre patrones inusuales y defectos congénitos de origen genético y ambiental en los trabajos de Schaumann & Alter, y posteriormente de Schaumann & Johnson. Además, Babler (1991) explicita que el nivel de asimetría en los dermatoglifos es una medida del ruido durante el desarrollo embrionario citando los trabajos, ambos en fisuras orales, de Adams & Niswander (1967) y el de Woolf & Gianas (1977) [Babler, 1991]. Teniendo en cuenta lo mencionado en la sección de embriología orofacial, existe un solapamiento temporal y una coincidencia del origen embrionario, entre la formación de las crestas epidérmicas y el cierre del paladar. Estas cuestiones refuerzan la importancia de analizar este rasgo fenotípico no sólo como un indicador de inestabilidad durante el desarrollo prenatal, sino que es de especial relevancia para el estudio sobre la etiopatogénesis de las fisuras orales.

Por otro lado, investigadores hallaron una asociación entre el incremento del ancho facial medial y superior como factor de riesgo para el LL/PH [Weinberg et al., 2006; McIntyre & Mossey., 2010]. Más adelante, en 2009, Weinberg et al., encontraron que una retrusión de la cara media, una reducción de la altura facial superior, una elevada altura facial inferior, un exceso del ancho interorbital y una amplitud alterada de estructuras nasolabiales estaban asociadas a la predisposición de LL/PHns. Luego, el mismo grupo de trabajo encontró diferencias entre parientes no afectados y controles en el tamaño y la forma de regiones del cerebro -obtenidas mediante scans de resonancia magnética MRI- [Weinberg et al., 2009] y diferencias en la forma de la cara a partir de escaneos 3D (3dMD stereophotogrammetry) [Miller et al., 2014]. En 2018, el trabajo de Howe et al., mostró una asociación entre la reducción del ancho del *filtrum* y el aumento de riesgo para el LL/PHns. Considerando estos antecedentes, Weinberg explica el origen de la hipótesis de la forma facial ("*Facial Shape Hypothesis*") en la cual se postula que ciertas características faciales poseen mayor susceptibilidad para la manifestación de fisuras orales, y que los genes relacionados con los rasgos faciales podrían también estar implicados en la ocurrencia de la fisura (y vice-versa) [Weinberg, 2022].

Considerando que el aumento de AB y la manifestación de anomalías congénitas (AC) son posibles consecuencias de disturbios durante el desarrollo embrionario [Naugler & Ludman, 1996], en varias investigaciones se incorporaron la cuantificación y la comparación de los niveles de asimetría bilateral entre los rasgos fenotípicos analizados. La presente Tesis pertenece a este marco de investigaciones al estudiar el nivel de AB usando los dermatoglifos e imágenes faciales como fuentes fenotípicas en familias con LL/PHns pertenecientes a una población de alta frecuencia. El desarrollo de la investigación se ordena en tres capítulos; detallando los antecedentes específicos, la metodología llevada a cabo y los resultados de la investigación en cada sección.

En el primer capítulo, se realiza un análisis del nivel de asimetría basado en los dermatoglifos. Se cuantifica la AB en individuos con LL/PHns y controles de la misma población, y se compara según la lateralidad de la fisura labial y la recurrencia familiar;

En el segundo capítulo, se estudia el nivel de asimetría bilateral a partir de la aplicación de morfometría geométrica sobre imágenes faciales 3D. Se analizan los parientes de primer

grado no afectados y controles de la misma población. También se evalúa las posibles diferencias según la recurrencia familiar de la anomalía;

En el tercer y último capítulo, se desarrolla un análisis de asociación génica. Se busca identificar los factores genéticos asociados al nivel de asimetría, y su relación con la susceptibilidad al labio leporino con o sin paladar hendido no sindrómico (LL/PHns) en la población analizada.

Objetivo General

El objetivo general del presente trabajo de tesis es caracterizar el nivel de asimetría bilateral en las familias pertenecientes a una población de alta frecuencia de LL/PHns, contribuyendo al conocimiento sobre los factores genéticos involucrados en la ocurrencia de esta patología en particular, y de la heterogeneidad etiológica de las FOs en general.

Hipótesis

En la Patagonia argentina se observa una frecuencia de labio leporino con o sin paladar hendido mayor a la esperada, posiblemente, en esta población existe mayor homogeneidad causal y el incremento de casos se deba al aumento de una única o pocas causas, sean genéticas y/o ambientales. En este sentido, se espera que la caracterización del nivel de asimetría bilateral, entendida como una medida de susceptibilidad, utilizando dermatoglifos e imágenes faciales 3D, oriente la identificación de genes candidatos para el LL/PHns en esta población.

Material

Población de estudio

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó material clínico, genealógico y biológico obtenido a partir del reclutamiento de familias con labio leporino con o sin paladar hendido realizado por la red de profesionales miembros del ECLAMC en hospitales de la región Patagónica.

ECLAMC es un acrónimo del Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas (www.eclamc.org) [Castilla & Orioli, 2004; Poletta et al. 2014]. El objetivo del programa es la prevención de defectos congénitos mediante la investigación. Forman parte profesionales de la salud, médicos genetistas, neonatólogos, obstetras, pediatras, genetistas, biólogos, odontólogos, entre otros; que trabajan en la vigilancia e investigación epidemiológica sobre nacimientos ocurridos en distintos hospitales de Latinoamérica.

Esta tesis complementa la línea de investigación desarrollada por el ECLAMC sobre 'Fisuras orales en Patagonia'. Esta línea surge a partir de un rumor sobre la alta frecuencia de LL/PHns en la Patagonia, que fue confirmada mediante una metodología específica para análisis espacial de prevalencias [Poletta et al. 2007, Gili et al., 2015], y motivó el posterior interés por estudiar los agentes causales de la alta frecuencia en la región. De estudios de recurrencia familiar y segregación compleja en familias de esta población se han obtenido evidencias de estar segregando un gen principal dominante de penetrancia incompleta y con una frecuencia alélica de entre 1 y 9% más un componente multifactorial que modifica los patrones de penetrancia [Poletta 2010]. Estos resultados sugieren la presencia en estas poblaciones de un mayor número de genes predisponentes que posiblemente interactúen además con factores ambientales para producir una mayor susceptibilidad a LL/PH. Lo cual abre la posibilidad de realizar estudios de tipo interacción gen-ambiente (GxE) y constituyen una oportunidad para la búsqueda de genes candidatos en esta población. Para ello se confeccionó un registro de casos de FOs nacidos en la región patagónica siguiendo las guías desarrolladas por la IDCFA (*International Database on Cranio-Facial Anomalies*) del programa de Genética Humana de la Organización mundial de la Salud (OMS) [Mossey & Castilla,

2001] y a partir de los hospitales de la red ECLAMC como base se extendió el registro utilizando múltiples fuentes de averiguación.

La información disponible en el registro de casos se utilizó para contactar a las familias, se procedió a invitarlas a participar del estudio y citarlas a entrevistas médicas. En estas entrevistas luego de explicarles los objetivos y alcance del estudio, las familias daban su conformidad a participar del mismo con la firma de un consentimiento informado específico para cada caso y tipo de material colectado.

En el desarrollo de la línea de investigación se consolidaron proyectos colaborativos con grupos nacionales e internacionales los cuales participaron en la planificación y ejecución de las campañas de recolección de datos y en los análisis de los mismos. Entre los años 2005 a 2012 se realizaron ocho campañas de recolección de muestras para contactar nuevas familias y completar material faltante que incluyeron visitas a El Bolsón, Esquel, Bariloche, localidades pequeñas distribuidas a lo largo de la “Línea Sur” (Ingeniero Jacobacci, Los Menucos, Maquinchao y El Maitén), Puerto Madryn, y Bahía Blanca (en este caso únicamente se incorporaron casos *afectados* derivados desde Patagonia). El proyecto inicial fue diseñado como un estudio de agregación familiar que incluyó controles apareados por sexo y lugar de residencia para contar con una referencia de la población general.

Muestra

En esta tesis se recolectó información de 198 individuos afectados con LL/PHns, 338 parientes no afectados y 130 controles no relacionados (individuos no afectados y sin historia familiar de la enfermedad). La información brindada por aquellas personas sobre características clínicas de los afectados y antecedentes familiares, datos demográficos y muestras biológicas que se obtuvieron de cada individuo se almacenaron en un única base de datos. Para eso se utilizó el software *progeny* (www.progenygenetics.com). En el mismo uno diseña su propia base de datos, puede utilizar las variables de base incluidas y generar nuevas variables. *Progeny* es útil para trabajar con datos humanos porque brinda la posibilidad de tener un archivo para cada individuo pero asociados para los parientes de la misma familia en pedigrees y teniendo en cuenta las relaciones de parentesco entre los individuos.

Previo a la toma de todas las muestras se procedió a la lectura, la firma del consentimiento informado por parte del paciente o en su defecto por su padre/madre/tutor y la autorización escrita para la realización de los exámenes clínicos. Las autorizaciones del material ya colectado permanecen disponibles en la institución CEMIC. En el consentimiento informado escrito se explica detalladamente la utilidad, los beneficios, las limitaciones y los resultados posibles de estas determinaciones genéticas. Para el banco de muestras se mantiene estricta confidencialidad mediante el uso de códigos numéricos. Las muestras biológicas sólo podrán ser utilizadas para los fines para los que los pacientes autoricen, no pudiéndose realizar otros estudios excepto para los que fueran solicitados. Tanto los pacientes y/o padres o tutores de pacientes menores podrán solicitar en cualquier momento que sus datos médicos, fotografías o material biológico sean retirados de la base de datos de este proyecto de investigación sin que esto pueda generar un perjuicio en la atención de su patología ni una discriminación asistencial o terapéutica futura en la Institución a la que acuden. Toda la información clínica y de laboratorio se mantendrá con la confidencialidad habitual que requieren los datos de los registros médicos para Investigación.

Los archivos de trabajo para el análisis de los resultados son completamente anónimas y los datos médicos y de laboratorio disponibles no tienen ninguna información de los pacientes ni ninguna otra información que permita identificarlos siguiendo las recomendaciones del Comité de Ética de la institución y el artículo 11 inciso e de la Ley de Protección de los Datos Personales. El presente estudio cumple con todos los requisitos éticos, legales y jurídicos, establecidos en las normas bioéticas nacionales (Disposición ANMAT 5330/97) e internacionales (Código de Nüremberg, Declaración de Helsinki y sus modificaciones, Declaración Universal sobre Genoma Humano y Derechos Humanos aprobada por la Conferencia General de la UNESCO, del 11 de noviembre de 1997). El proyecto cuenta con aprobación de Comité de Ética en Investigación del CEMIC (reconocimiento internacional NIH-HHS; IRB #1745; IORG #131) y está sometido a revisiones anuales de la evolución y posibles modificaciones del estudio por parte del Comité de Ética.

Impresiones dactilares, imágenes faciales 3D y ADN extraído a partir de muestras de saliva, son las muestras biológicas analizadas en esta tesis. Se detalla el procedimiento de la toma de muestras y la metodología utilizada para evaluar cada objetivo. Cabe señalar que trabajar con datos humanos muchas veces implica datos faltantes, tanto de información genealógica

como de muestras biológicas por impedimentos técnicos, disponibilidad de recursos económicos, por falta parcial o total de consentimiento y/o de participación de alguno de los individuos del núcleo familiar. Por esto mismo, se especifica la muestra definitiva incluída en cada análisis.

Tabla 1. Tamaño de muestra por sexo y grupo analizado.

	N FEMENINO	N MASCULINO	N TOTAL
Casos de LL/PHns	88	110	198
Parientes de LL/PHns	223	115	338
Controles	72	58	130

Definición de Caso

La definición de caso y la clasificación del subtipo de fisura oral es registrada según el código de malformaciones de 6 dígitos utilizado por el ECLAMC [Castilla & Orioli, 2004]. Para el caso de fisuras orales: los cuatro primeros dígitos definen el subtipo principal, el quinto dígito define la extensión y el sexto dígito la lateralidad de la fisura. En esta tesis se incorporó sólo aquellos casos con fisura labial con o sin paladar hendido no sindrómicos, independiente de la extensión (5to código) y la lateralidad (6to código). Los códigos incorporados de la clasificación del ECLAMC son: 7491 para Labio Leporino SIN paladar hendido; y 7492 para Labio Leporino CON paladar hendido. Los mismos corresponden a los códigos Q36 y Q37 para LL/PH, de la Clasificación estadística internacional de enfermedades y otros problemas de salud en su décima revisión (ICD-10) [Bramer, 1988], versión 2007 on-line [WHO & DIMDI, 2006]. Si bien el ECLAMC registra una descripción detallada del cuadro clínico de cada caso, a los fines del presente trabajo de tesis solo la información contenida en los cuatro primeros dígitos del código fue utilizada.

Capítulo I: Asimetría bilateral a partir del estudio de los dermatoglifos

Antecedentes

El uso de dermatoglifos en el estudio de fisuras orales se origina a mediados de la década de 1960. En investigaciones previas se estudiaron las diferencias entre lados derecho e izquierdo de los dígitos homólogos respecto a los patrones de figuras, al número de crestas y al ángulo palmar *atd*, entre otros indicadores fenotípicos. En primer instancia, el trabajo de Adams y Niswander, 1967 analizaron el nivel de asimetría fluctuante a partir de los dermatoglifos y de los dientes molares en individuos con FOs (LL/PH y PH) con y sin historia familiar, y observaron mayores niveles de AB en aquellos con historia familiar [Adams and Niswander, 1967]. Posteriormente, Woolf y Gianas (1976 y 1977) con una muestra de personas caucásicas de Estados Unidos y Neiswanger et al., 2002 en una población de China, analizaron el nivel de AB sobre el número de crestas y el patrón de figuras de los dermatoglifos casos y sus parientes no afectados, con y sin historia familiar, y también observaron mayores niveles de AB en los casos con historia familiar [Woolf y Gianas 1976; 1977; Neiswanger et al., 2002]. En un trabajo más reciente de Neiswanger et al., en el cual analizaron distintas poblaciones, encontraron mayores niveles de asimetría basado en el índice de disimilitud en el patrón de figuras entre personas afectadas y controles [Neiswanger et al., 2020].

A partir de estos antecedentes, en esta tesis se propuso evaluar si existían diferencias en los niveles de AB sobre los dermatoglifos de los individuos afectados, según la lateralidad de la fisura (unilateral izquierda, unilateral derecha y bilateral) y según el grado de recurrencia familiar, como un indicador de las posibles diferencias en los mecanismos etiológicos subyacentes.

Objetivos específicos

I.a. Estimar el grado de asimetría bilateral a partir del análisis de dermatoglifos en individuos afectados con LL/PHns y en controles no relacionados de la misma población.

I.b. Evaluar las diferencias en el nivel de asimetría bilateral en relación a la lateralidad de la fisura labial en los afectados.

I.c. Evaluar las diferencias en el nivel de asimetría bilateral en relación al grado de recurrencia familiar de LL/PHns.

Metodología

Toma de imágenes

Se tomaron impresiones dactilares de 81 casos de LL/PH y de 84 controles. El protocolo para la toma de impresiones consiste en: impregnar con tinta ambas manos del individuo implementando un rodillo, y plantar las mismas sobre hojas con acabado semi-satinado (papel propalcote) con cuidado para asegurar una impresión pareja. En cada hoja se registra el código de identificación del individuo. Luego son escaneadas y almacenadas para examinarlas en forma digital.

De cada imagen se estudiaron los 10 dígitos dactilares y se analizaron cualitativa y cuantitativamente para generar indicadores de asimetría bilateral.

Análisis cualitativo

Usando un visor de imágenes se observó cada dígito y se usó la clasificación de Galton para determinar si el patrón observado correspondía con un arco, presilla o verticilo [Cummins & Midlo, 1961]. Un arco se define como la figura formada por crestas con origen en un lado de la falange y se dirigen hacia el otro lado, manteniendo cierto grado de paralelismo (Figura 4.A). Las presillas son figuras que presentan al menos una cresta que entra de un lado de la

falange, se incurva y termina en el mismo lado (Figura 4.B). Los verticilos son figuras más complejas que en su forma más sencilla forma un espiral (Figura 4.C). El trirradio se define como el punto de encuentro de tres rayos que demarcan tres regiones separadas con crestas paralelas entre sí. Los arcos carecen de trirradio, las presillas poseen uno sólo, y los verticilos tienen al menos dos [Cummins & Midlo 1961].

Análisis cuantitativo

Se trazó una línea recta entre el trirradio y el centro, y se contó la cantidad de crestas observadas de cada dígito dactilar. Por definición, el recuento de crestas de los arcos equivale a 0, mientras que las presillas tienen una única línea de conteo y los verticilos al menos dos, en cuyo caso se tiene en cuenta el recuento mayor.

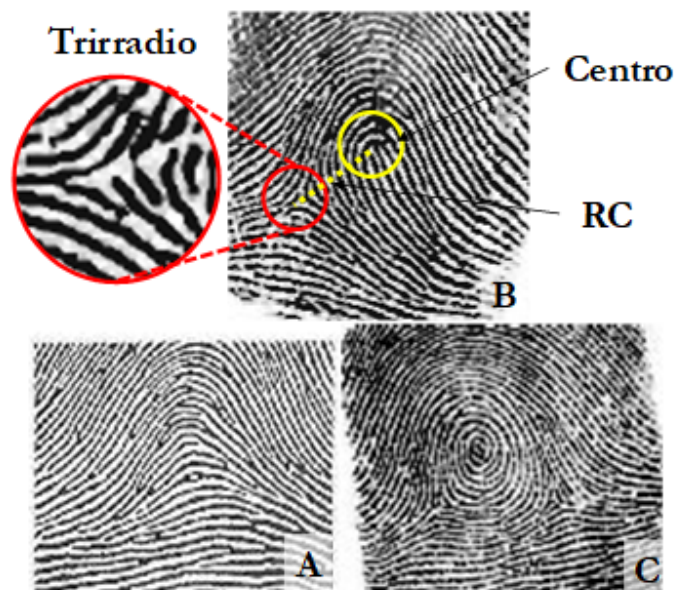


Figura 4: A: Arco, B: Presilla, C: Verticilo, RC: Recuento de crestas.
Extraída de *Poletta* 2010, con autorización del autor.

Indicadores de asimetría bilateral

A partir de la figura y del recuento de crestas de cada dígito dactilar se obtuvieron indicadores individuales de asimetría bilateral:

- Índice de Disimilitud en el Patrón de Figuras (IDPF): Se usó la escala de disimilitud desarrollada por Woolf & Gianas [Woolf & Gianas, 1977] que otorga un “0” cuando el tipo de figura entre el mismo dígito de la mano izquierda y la derecha coincide y un “1” cuando difiere. Luego se suman los valores obtenidos para los 5 dígitos y así se calcula el valor individual entre [0; 5].
- Índice de Asimetría Direccional (IAD): Se calculó la diferencia en el recuento de crestas totales entre mano derecha e izquierda ($D - I$) de acuerdo a lo propuesto por Jantz & Webb, 1980 [Jantz & Webb, 1980].

En primera instancia se estudió la distribución del indicador IAD mediante un histograma para evaluar la presencia o ausencia de antisimetría. Es necesario descartar la presencia de AS para la interpretación de los análisis posteriores. Para determinar si el indicador IAD presenta un patrón grupal de asimetría direccional se analizó gráficamente con el mismo histograma y analíticamente mediante un test de Wilcoxon cuya hipótesis nula es si la media es igual a 0 (cero) usando la función *signrank* en Stata.17 [StataCorp 2021, TX, USA].

Categorías de comparación:

- Casos vs Controles
- Lateralidad
- Recurrencia

Lateralidad

Los afectados se clasificaron en unilateral (izquierdo o derecho) y bilateral según el tipo de fisura presentada. Al incluir los controles como referencia, en cada análisis estadístico se compararon tres -para estudiar diferencias entre unilateral y bilateral- o cuatro grupos -para las comparaciones entre unilateral izquierdo y derecho- (Figura 5).

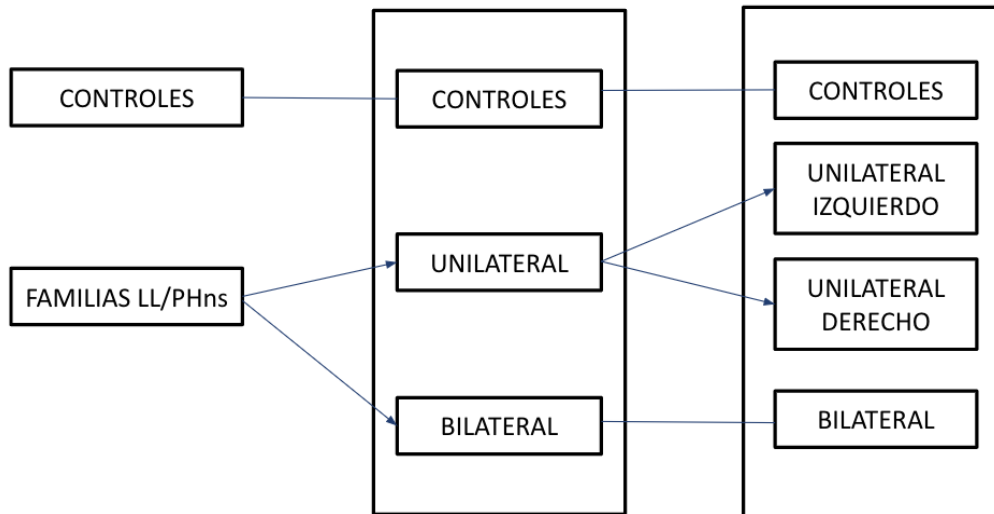


Figura 5: Clasificación según la lateralidad de la fisura.

Recurrencia

El nivel de recurrencia familiar se calculó a partir de la información de genealogías y siguiendo la fórmula de la Ecuación 1 del índice de historia familiar (IHF) [*Family History Score*, Khoury et al., 1993]. Para cada familia de casos se obtuvo un valor de IHF continuo, y tomando el cero como umbral, las familias se clasificaron en dos grupos: baja y alta recurrencia familiar. Agregando los controles como referencia en los análisis estadísticos se compararon tres grupos (Figura 6).

$$IHF = \frac{\#LLPH_{ob} - \#LLPH_{esp}}{\sqrt{\#LLPH_{esp}}} \quad \text{[Ecuación 1]}$$

Donde $\#LL/PH_{ob}$ corresponde al número de casos de labio leporino con o sin paladar hendido observado en los parientes de primer grado en la familia. $\#LL/PH_{esp}$ al número esperado de casos en parientes de primer grado considerando la frecuencia en la población de Patagonia (0,0176) y el tamaño familiar (cantidad de parientes de primer grado).

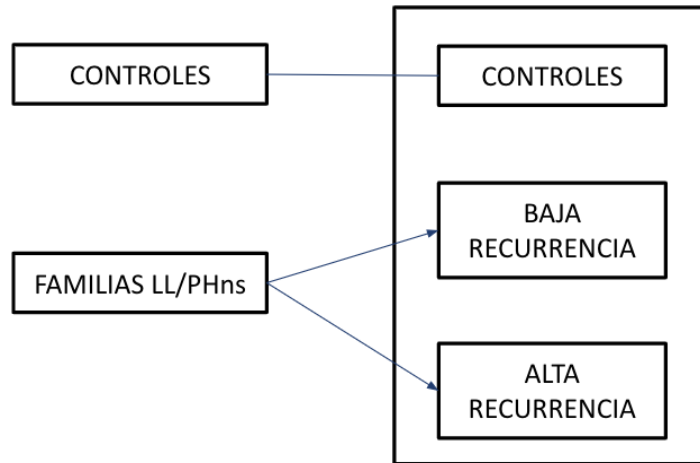


Figura 6: Clasificación según la recurrencia familiar.

Análisis estadístico

Para el Índice de Disimilitud en el Patrón de Figuras (IDPF) se hizo una regresión logística ordinal incorporando el sexo biológico, el grupo correspondiente en cada comparación (caso/control y nivel de recurrencia) y su interacción ajustado por aquellos pertenecientes a la misma familia (Ecuación 2). En cambio, para el indicador de asimetría direccional basado en el recuento de crestas (IAD) se realizó una regresión no paramétrica ya que no cumplía con los requisitos estadísticos necesarios. Para el indicador IAD también se comparó según la lateralidad de la fisura en los afectados. Los análisis se realizaron utilizando las funciones *olog* y *npregress series* respectivamente en el programa Stata 17 [StataCorp 2021, TX, USA].

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \text{ grupo} + \beta_2 \text{ sexo} + \beta_3 \text{ grupo} * \text{sexo} + e \text{ [Ecuación 2]}$$

Donde Y es la variable dependiente que en cada regresión lo ubicará un indicador de asimetría bilateral diferente, β_0 es la ordenada al origen, β_1 es el coeficiente que mide el efecto principal de la categoría de comparación *grupo*, β_2 es el coeficiente que mide el efecto principal del sexo biológico (*sexo*), entre masculino y femenino, y β_3 es el coeficiente que mide el efecto de la interacción entre variable de interés y sexo biológico (*grupo * sexo*), *e* es el error residual.

Resultados

Caso-control

En la Tabla 2 se detallan las características demográficas de las personas cuyos dermatoglifos fueron tomados y analizados. La muestra corresponde a personas afectadas con LL/PHns (casos, N=81), y personas no afectadas y sin historia familiar (controles, N=84) de la Patagonia argentina. La razón masculino/femenino fue 0,9 para los controles y 1,07 para los casos.

Tabla 2. Muestra de dermatoglifos analizados

	N FEMENINOS	N MASCULINO	N TOTAL
Controles	44	40	84
Casos de LL/PHns	39	42	81

El análisis gráfico realizado sobre el histograma de frecuencias del índice IAD permitió descartar la presencia de antisimetría en el número de crestas, por lo tanto, se pudo continuar con el análisis (Figura I.4). Gráficamente, refleja una distribución en forma de campana con la media corrida del cero, reflejando un posible patrón de asimetría direccional, que se verificó analíticamente ($p=0,0029$).

La Tabla 3 presenta la dispersión de los valores obtenidos para los distintos indicadores de asimetría bilateral obtenidos a partir de los análisis sobre los dermatoglifos para casos y controles según el sexo biológico. Los dermatoglifos que mostraron patrones inusuales no pudieron ser analizados cuantitativamente pero sí fueron incluidos para calcular el indicador de disimilitud (IDPF), por este motivo la muestra del IAD es menor (Tabla 3). Hay una tendencia de mayor IDPF para los casos sobre los controles, sin embargo las diferencias no alcanzaron significancia estadística (Tabla S1, $p=0,427$). Lo mismo sucede con el IAD (Tabla S2, $p=0,736$), que además se observa mayor asimetría en los casos femeninos que no llega a ser estadísticamente significativo (Tabla S2, $p=0,799$).

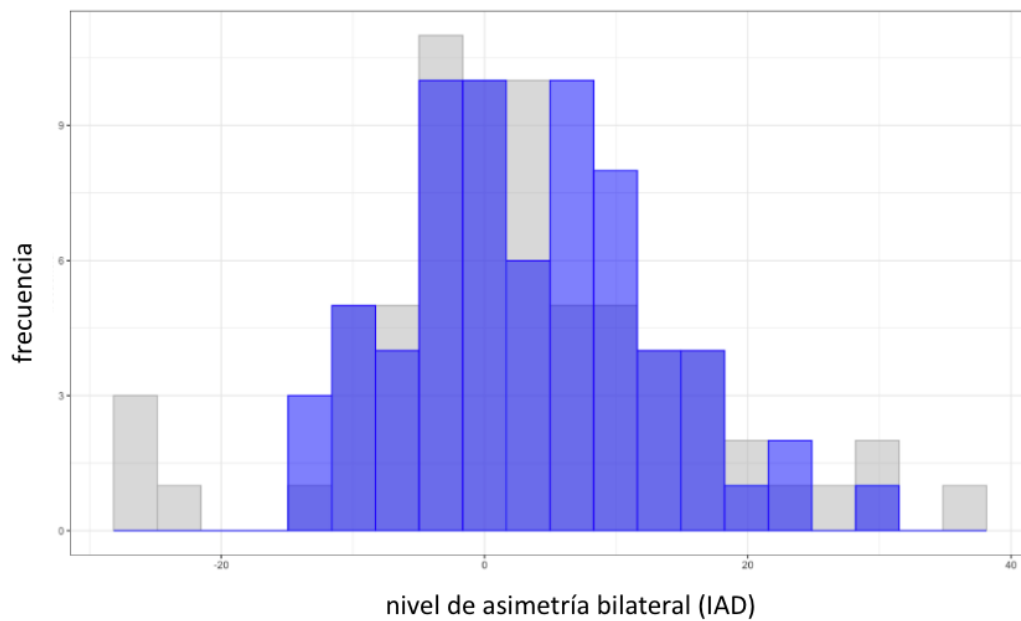


Figura 7: Histograma de frecuencias del índice IAD para casos (azul) y controles (gris).

Tabla 3. Distribución percentil de los indicadores de asimetría bilateral obtenidos a partir de los dermatoglifos

		N	IDPF p50 (p25-p75)	N	IAD p50 (p25-p75)
Controles	Total	84	1 (0-2)	71	1,33 (-4,33 - 10,33)
	Femeninos	44	1 (0-2)	37	2,33 (-2,67 - 7,00)
	Masculinos	40	1 (0-2)	34	0,83 (-8,00 - 12,00)
Casos	Total	81	1 (1-2)	68	2,33 (-3,49 - 9,17)
	Femeninos	39	1 (1-2)	30	1,33 (-6,33 - 9,67)
	Masculinos	42	2 (1-2)	38	2,67 (-0,33 - 6,67)

Lateralidad

En la muestra analizada se observa que la mayoría de los individuos afectados presentan una fisura unilateral (80%), y dentro de estas, la del lado izquierdo predomina sobre la del lado derecho (67%) (Tabla 4).

Tabla 4. Muestra de dermatoglifos analizados según la lateralidad de la fisura

	N FEMENINOS	N MASCULINO	N TOTAL
Controles	44	40	84
Bilateral	7	9	16
Unilateral	32	36	68
Unilateral Izquierdo	19	27	46
Unilateral Derecho	13	9	22

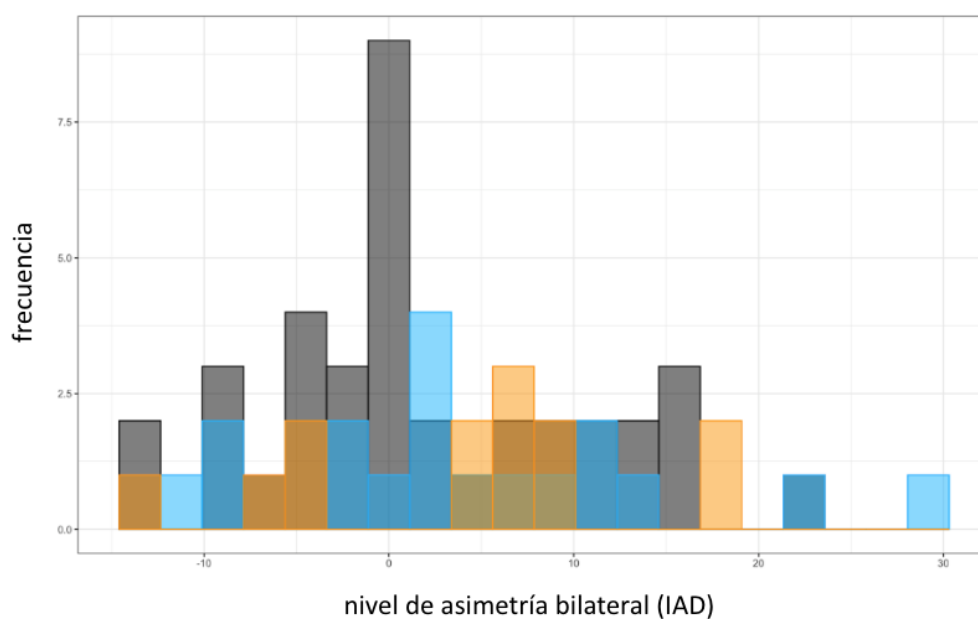


Figura 8. Histograma de frecuencias del indicador IAD para los casos con fisura unilateral izquierda (gris oscuro), los casos con fisura unilateral derecha (celeste) y los casos con fisura bilateral (naranja).

En primera instancia el histograma de frecuencias sobre el índice IAD no mostró un agrupamiento diferencial entre los subgrupos según la lateralidad de la fisura descartando la presencia de antisimetría (Figura 8). Tampoco se observan diferencias en las medianas de los

grupos de casos al clasificarlos según la lateralidad. La dispersión estadística del indicador de asimetría direccional observada se ve en la Tabla 5 y en la Figura 9. En estos resultados no se vieron diferencias significativas dentro de los casos según la lateralidad de la fisura: ni entre unilateral y bilateral, ni dentro de los casos con fisura unilateral entre derecha e izquierda (Tabla 6, Tabla S3 y Tabla S4).

Tabla 5. Distribución del índice de asimetría direccional (IAD) según la lateralidad de la fisura en el individuo afectado

		N	IAD p50 (p25-p75)
Controles	Total	71	1,33 (-4,33 - 10,33)
	Femeninos	37	2,33 (-2,67 - 7,00)
	Masculinos	34	0,83 (-8,00 - 12,00)
Bilateral	Total	13	5,99 (-3,67 - 8,33)
	Femeninos	5	6,99 (-3,67 - 9,67)
	Masculinos	8	5,67 (0,67 - 7,49)
Unilateral	Total	55	2,33 (-3,33 - 4,86)
	Femeninos	25	0,67 (-8 - 9,67)
	Masculinos	30	1,67 (-0,33 - 6,33)
Unilateral izquierdo	Total	37	0,67 (-3,99 - 8,67)
	Femeninos	15	0,67 (-8 - 10,67)
	Masculinos	22	0,67 (-3,33 - 6,00)
Unilateral derecho	Total	18	2,99 (-1,67 - 10,33)
	Femeninos	10	0,17 (-8,99 - 8,33)
	Masculinos	8	5,49 (2,49 - 11,33)

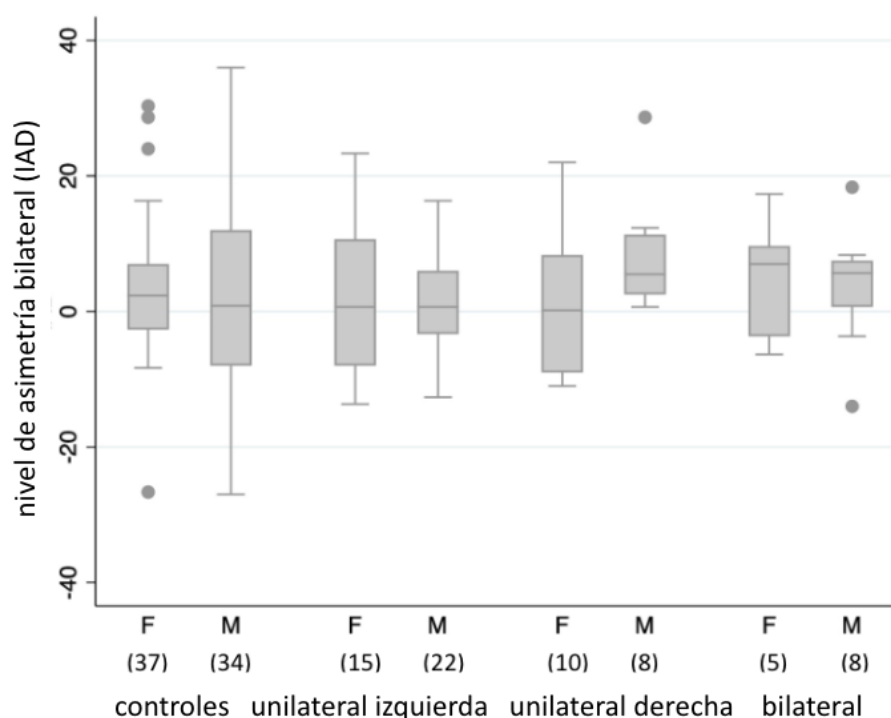


Figura 9. Diagrama de cajas (*box plot*) indicando mediana e intervalo intercuartílico del indicador IAD según sexo y lateralidad de la fisura.

Tabla 6. Resultados de los tests entre coeficientes a posteriori de cada regresión no paramétrica

	Comparación	χ^2 (p-valor)
IAD	unilateral vs bilateral	0,25 (0,61)
	unilateral izquierda vs unilateral derecha	1,12 (0,29)

Recurrencia

En la Tabla 7 se detalla la clasificación según la recurrencia familiar de la muestra. Al igual que para las comparaciones anteriores, en primera instancia se descartó la presencia de antisimetría mediante un histograma del IAD (Figura 10). La variación según la recurrencia familiar y el sexo de los indicadores evaluados se muestra en la Tabla 8. Los valores parecen diferir según el sexo, sin embargo no fueron estadísticamente significativos (Tablas S5 y S6). La regresión logística ordinal sobre IDPF mostró diferencias significativas dentro de los casos según la recurrencia familiar. En particular, sólo los casos con alta recurrencia presentan mayor asimetría en comparación con los casos de baja recurrencia y con los controles (Figura

11, Tabla S5). En el mismo sentido, la regresión no paramétrica sobre IAD mostró la misma tendencia (Tabla S6, $p=0,059$), con diferencias significativas entre los casos con baja y alta recurrencia, sin observarse diferencias por el sexo biológico (Figura 12, Tabla 9, $p=0,029$).

Tabla 7. Muestra de dermatoglifos analizados según la recurrencia familiar

	N FEMENINOS	N MASCULINO	N TOTAL
Controles	44	40	84
baja recurrencia	31	36	67
alta recurrencia	8	9	17

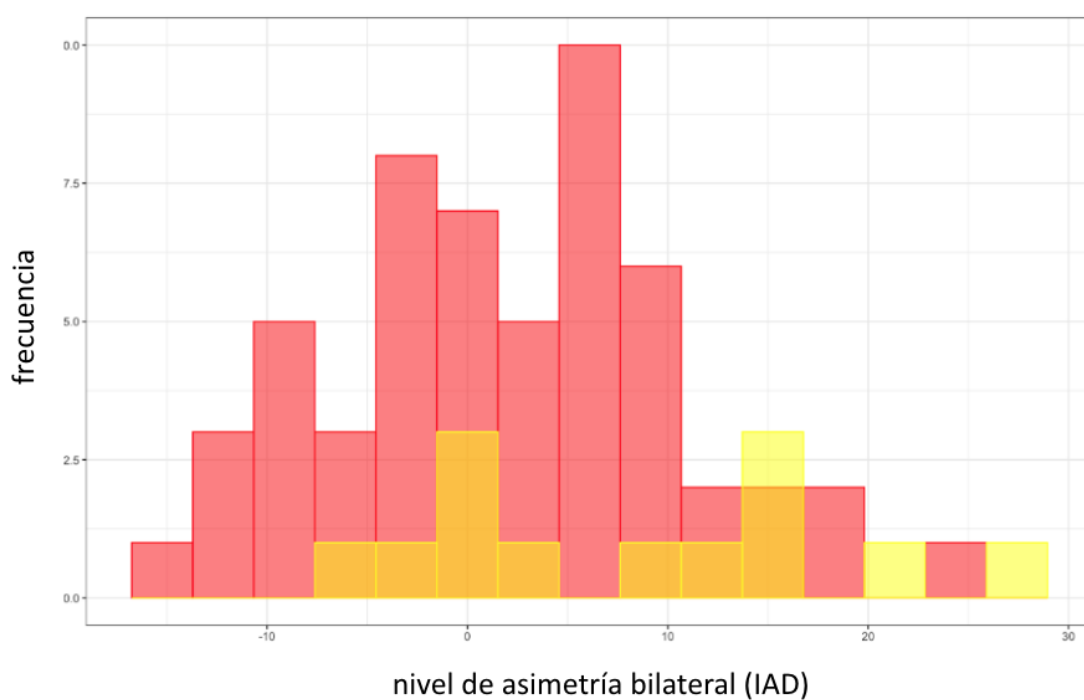


Figura 10. Histograma de frecuencias del indicador IAD para los casos con baja recurrencia (rojo) y los casos con alta recurrencia (amarillo)

Tabla 8. Indicadores de asimetría bilateral basados en los dermatoglifos según la recurrencia familiar.

		N	IDPF p50 (p25-p75)	N	IAD p50 (p25-p75)
controles	Total	84	1 (0-2)	71	1,33 (-4,33 - 10,33)
	Femenino	44	1 (0-2)	37	2,33 (-2,67 - 7,00)
	Masculino	40	1 (0-2)	34	0,83 (-8,00 - 12,00)
baja recurrencia	Total	64	1 (0-2)	55	2,33 (-3,67 - 6,99)
	Femenino	31	1 (0-2)	25	0,33 (-8,00 - 8,67)
	Masculino	33	2 (0-2)	30	2,67 (-2,33 - 6,00)
alta recurrencia	Total	17	2 (1-2)*	13	10,67 (0,99 - 15,99)*
	Femenino	8	2 (1-2)	5	10,67 (2,00 - 15,99)
	Masculino	9	2 (1-3)	8	6,83 (0,67 - 15,17)

Tabla 9. Tests entre coeficientes a posteriori de las regresiones no paramétricas

Comparación		χ^2 (p-valor)
IAD	baja recurrencia vs alta recurrencia	4,77 (0,029)*

En síntesis, no se observan diferencias significativas en el nivel de AB entre ambos sexos ni según la lateralidad de la fisura labial. Sin embargo, sí se encontró mayor nivel de AB, en ambos indicadores, en los casos con alta recurrencia frente a los casos con baja recurrencia y los controles. Este resultado indicaría que los casos con alta recurrencia presentan menor capacidad de amortiguar y canalizar frente a disturbios que los casos con baja recurrencia familiar.

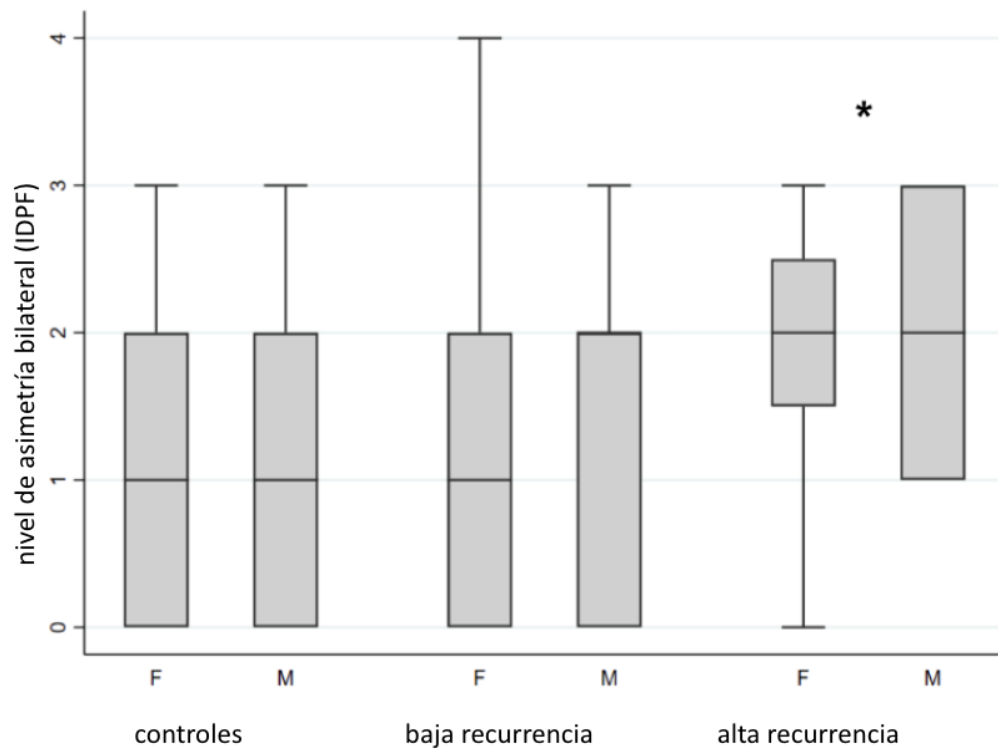


Figura 11. Diagrama de cajas (*box plot*) indicando mediana e intervalo intercuartílico del indicador IDPF según sexo y grado de recurrencia familiar.

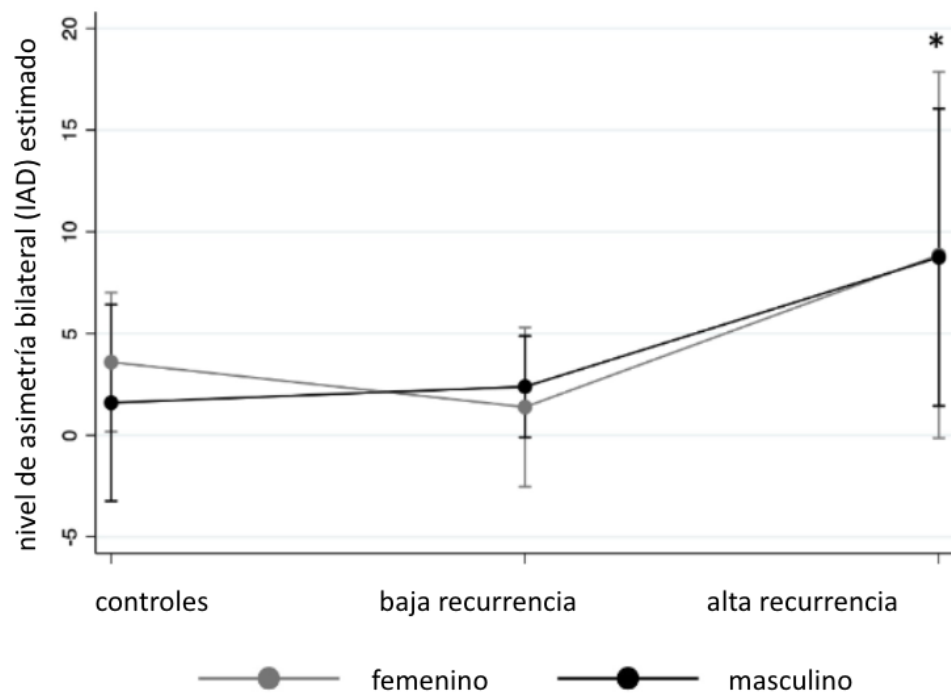


Figura 12. Nivel de asimetría bilateral estimado a partir del modelo de regresión según el grado de recurrencia familiar para el Índice de Asimetría Direccional (IAD)

Capítulo II: Asimetría bilateral a partir de morfometría geométrica sobre imágenes faciales 3D

Antecedentes

Varias medidas faciales se utilizaron para cuantificar el nivel de asimetría bilateral dentro del estudio de la etiología de LL/PHns. El trabajo de Neiswanger et al., 2005 incluye la AB generada a partir de la longitud de la oreja y de la fisura interpalpebral [Neiswanger et al., 2005]. McIntyre & Mossey presentaron dos trabajos en los cuales analizaron medidas cefalométricas de parientes no afectados de individuos con LL/PH y PH a partir de radiografías. En el primero encontraron evidencia de asimetría direccional del tamaño de la cavidad nasal, con una tendencia a ser mayor del lado izquierdo, y de la forma en la zona del complejo maxilo-cigomático; en el segundo observaron la presencia de asimetría direccional en ambos grupos, siendo mayor en los parientes de LL/PHns que en los de PH [McIntyre & Mossey, 2002; 2010]. Posteriormente, se incorporó la implementación de la morfometría geométrica en el análisis de AB. En particular, a partir de imágenes 3D faciales obtenidas por estereofotogrametría y la utilización de landmarks faciales, cuantificaron y compararon los niveles de AB [Weinberg et al 2009, 2013]. Entre los resultados más relevantes, encontraron mayores niveles de AF en la región nasal, el labio y el mentón [Miller et al., 2014] y también mayor AD en la región nasal [Zhang et al., 2018] en parientes no afectados que en controles no relacionados.

Los resultados a partir del análisis de asimetría bilateral basado en los dermatoglifos muestran que los casos de LL/PHns provenientes de familias con alta recurrencia difieren de aquellos casos esporádicos. En este nuevo Capítulo también se propuso evaluar si estas diferencias estaban presentes en los parientes no afectados a partir de muestras faciales.

Objetivos específicos

- II.a. Estimar el nivel de asimetría bilateral a partir de mediciones en imágenes faciales 3D en parientes de primer grado no afectados y en controles no relacionados de la misma población.
- II.b. Evaluar las diferencias en el nivel de asimetría bilateral en relación al grado de recurrencia familiar de LL/PHns.

Morfometría Geométrica

El desarrollo de este objetivo se basa en la morfometría, es decir, en el estudio cuantitativo de la forma, incluyendo en forma (*form*) el tamaño (*size*) y la forma independiente del tamaño (*shape*). Se conoce como morfometría clásica (*MC*) a la cuantificación de la forma a partir de las distancias lineales como pueden ser el ancho, el largo o la altura, de algún carácter de interés. En cambio, la morfometría geométrica (*MG*) se basa en analizar la forma representada por las coordenadas de una configuración de puntos homólogos entre los especímenes. Estos puntos deben ser seleccionados según el objeto de estudio, la pregunta de interés y la muestra disponible. Es importante señalar que todos los puntos elegidos deben estar ubicados en todas las imágenes incorporadas al estudio y en el mismo orden [Bookstein., 1997]. Se aplican herramientas matemáticas que permiten aislar la forma (*shape*) del tamaño (*size*), comparar las diferencias en *shape* y estudiar las relaciones entre *shape* y *size*. También utiliza estadística multivariada para analizar las variables de la configuración de forma conjunta y estudiar la forma *shape* como el rasgo multidimensional que es. Para eso se aplica una transformación de procrustes que implica una traslación, un escalamiento y una rotación de modo que todas las configuraciones a analizar sean comparables. Se usa un '*partial procrustes fitting*' a partir de las coordenadas crudas se generan coordenadas de procrustes y un indicador del tamaño individual, el centroid size (CSize). El CSize se calcula como la raíz cuadrada de la suma de las distancias cuadradas entre cada *landmark* y el centroide (Ecuación 3). El centroide es el centro de masa de la configuración que se calcula promediando todas las coordenadas X, Y, y Z de los *landmarks* ubicados, por lo tanto, el CSize es una medida de la dispersión de los *landmarks* alrededor del centro de masa. Las nuevas coordenadas, de procrustes, contienen la información de la forma *shape* independiente del tamaño.

$$CSize = \sqrt{\sum (X_i - X)^2} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Donde X_i es cada coordenada observada, X es la coordenada del centroide.

De esta manera, la transformación de procrustes separa la *shape* en componentes simétrico y asimétrico, y cuantifica la asimetría bilateral. El componente simétrico representa la variación entre los individuos y se obtiene haciendo el promedio entre la configuración original y la reflejada (entre *landmarks* pareados). Mientras que el componente asimétrico, que incluye la asimetría direccional y fluctuante, se calcula como las diferencias entre la configuración original y la reflejada [Klingenberg et al., 2002]. Por todo esto, esta herramienta tiene mayor versatilidad, y es más informativa y poderosa que la MC [Toro et al, 2010] .

Metodología

Captura

Las imágenes faciales 3D de 40 controles y 150 parientes no afectados fueron tomadas con la técnica de estereofotogrametría usando 3dMD [www.3dmd.com]. Consiste en un set de cámaras de alta resolución bastante rápidas (<1 segundo la toma de fotografías). Está asociado a un software específico que luego las renderiza y forma una imagen 3D que capta la textura y el relieve de la cara. Las personas deben permanecer quietas, con expresión neutra y relajada, manteniendo la boca cerrada y los ojos abiertos durante la toma. Para mayores detalles de la metodología, ver descripción en Marazita, Weinberg & Raffensperger, 2017.

Posterior a la captura, hay una depuración de la imagen obtenida para tener la imagen limpia de superficies externas al campo de interés y se obtiene el objeto digital definitivo para el análisis morfométrico que se almacena en formato .obj.

Digitalización de *Landmarks*

Previo a la digitalización de *landmarks* hubo que utilizar los programas *Vax* y *Meshlab* para limpiar el cuadro y hacer un cambio de formato.

A partir de la bibliografía estudiada se eligió una configuración de *landmarks* para representar la forma facial [Miller et al., 2014; Zhang et al., 2018]. La misma consistió en 28 *landmarks* de los cuales 8 son mediales y no están pareados (glabella, nasion, pronasion, subnasale, labiale superius, labiale inferius, sublabiale, and pogonion) y 10 son pareados -bilaterales- (endocanthion, palpebrale superius, exocanthion, palpebrale inferius, alare, alar curvature, subalare, nostril superior, chelion, and crista philtri) que se describen en la Tabla 10 y se muestran en la Figura 13. Se usó el *Landmark v3.0* [Wiley et al., 2005] para la ubicación de los mismos. Cada imagen se digitalizó por duplicado para evaluar el error de medición. Además, hubo un único operador que digitalizó todas las imágenes incorporadas, y se llevó adelante en un orden aleatorio y ciego, es decir, sin tener presente el origen del individuo (control/pariente) como formas de reducir posibles sesgos.

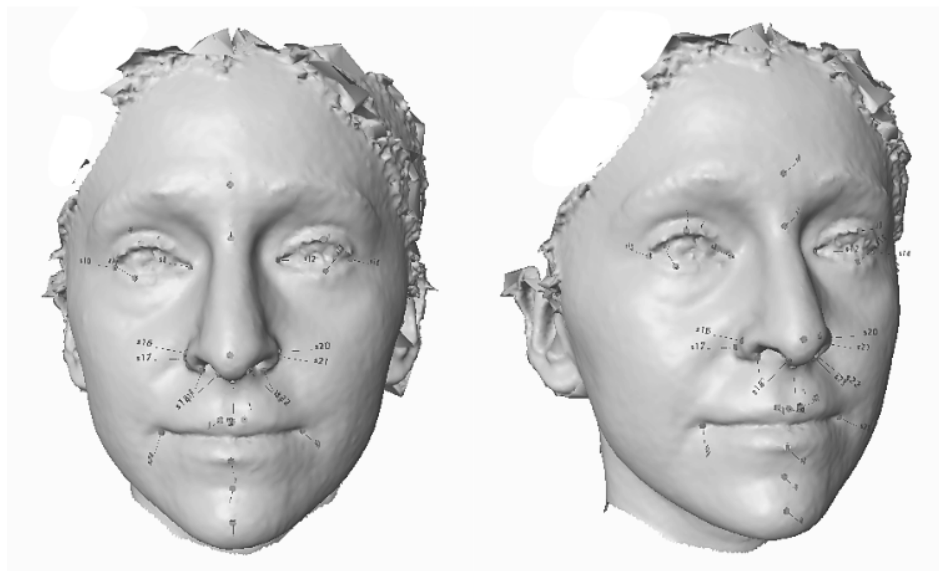


Figura 13. Landmarks utilizados en el análisis mediante morfometría geométrica

Tabla 10: Landmarks utilizados en el análisis mediante morfometría geométrica

LANDMARK		DEFINICIÓN
1	Glabella	El punto más prominente de la frente en la línea media de las crestas supraorbitales
2	Nasion	El punto externo de la intersección entre la línea nasion-sella y el tejido blando
3	Pronasion	El punto más prominente de la punta de la nariz cuando la cabeza está ubicada en el plano horizontal .
4	Subnasale	El punto donde el tabique nasal se funde en el plano medio sagital con el labio superior
5	Labiale Superius	El punto medio superior más prominente del borde bermellón del labio superior.
6	Labiale Inferius	El punto medio inferior más prominente del borde bermellón del labio inferior.
7	Sublabiale	El punto medio más profundo en el pliegue labio-mental, que determina el borde inferior del borde inferior del labio inferior o el borde superior de la barbilla.
8	Pogonion	El punto más saliente de la superficie anterior del mentón.
9	Endocanthion derecho	Esquina interna del ojo derecho, intersección entre los párpados.
10	Palpebral Superius derecho	Punto medial más alto del párpado superior derecho
11	Exocanthion derecho	Esquina externa del ojo derecho, intersección entre los párpados.
12	Palpebral Inferius derecho	Punto medial más bajo del párpado inferior derecho
13	Endocanthion izquierdo	Esquina interna del ojo izquierdo, intersección entre los párpados.
14	Palpebral Superius izquierdo	Punto medial más alto del párpado superior izquierdo
15	Exocanthion izquierdo	Esquina externa del ojo izquierdo, intersección entre los párpados.
16	Palpebral Inferius izquierdo	Punto medial más bajo del párpado inferior izquierdo
17	Alare derecho	Punto más lateral sobre el ala nasal derecha
18	Alar curvature derecho	<i>Sensu Zhang et al., 2018</i>
19	Nostril superior derecho	El punto más alto sobre el nostril derecho (intersección interna entre nostril y tabique)
20	Subalare derecho	<i>Sensu Zhang et al., 2018</i>
21	Alare izquierdo	El punto más lateral sobre el ala nasal izquierda <i>Sensu Zhang et al., 2018</i>
22	Alar curvature izquierdo	<i>Sensu Zhang et al., 2018</i>
23	Nostril superior izquierdo	El punto más alto sobre el nostril izquierdo (intersección interna entre nostril y tabique)
24	Subalare izquierdo	<i>Sensu Zhang et al., 2018</i>
25	Chelion derecho	Punto en la esquina derecha de la boca en la comisura del labio
26	Chelion izquierdo	Punto en la esquina izquierda de la boca en la comisura del labio
27	Crista Philtri derecho	El punto derecho superior del margen elevado del filtrum sobre la línea bermellón
28	Crista Philtri izquierdo	El punto izquierdo superior del margen elevado del filtrum sobre la línea bermellón

Se exportaron las coordenadas de todos los puntos ubicados en cada imagen en formato .tps. En una misma carpeta se guardan los textos de cada exportación con la marcación del individuo asociado. Utilizando un script de python se obtuvo un único archivo que incluye las 84 coordenadas en las columnas (X, Y, Z de cada landmark) por individuo (filas).

Esta matriz de datos es el archivo de entrada para el paquete de análisis estadístico geomorph en el entorno R [Adams et al., 2017]. Tiene que estar en un formato particular usado en MG definido como .tps . También se prepara un archivo en formato .csv con las variables de características clínicas y demográficas de los individuos que serán incluidas en los análisis (sexo, edad, la recurrencia familiar, etc). Ambas matrices se abrieron en RStudio [RStudio Team., 2020] para hacer todo el análisis.

El primer paso fue hacer la transformación de procrustes usando la función *gpa.gen* dentro del *geomorph*. A continuación se aplicó la función *PlotOutliers* para buscar outliers. Esta función ordena los individuos según la distancia de procrustes al consenso de forma decreciente. La función muestra las 'configuraciones' más alejadas en un gráfico, y permite observar la desviación de cada configuración.

Luego se utilizó la función *bilat.symmetry*. Esta función descompone la forma en componente simétrico y asimétrico considerando que la cara presenta simetría de objeto. Además este último se divide en el componente de asimetría direccional (cAD) donde hay una matriz con un valor promedio de la desviación por coordenada entre todos los individuos (uno por cada lado) y el componente de asimetría fluctuante (cAF) que es una matriz de individuos (filas) por coordenadas (columnas) que muestra la desviación individual respecto del promedio cAD. También genera el Análisis de la Varianza de *Procrustes* conocido como *Procrustes ANOVA* o anova de Palmer [Palmer & Strobeck, 1986] (subyacente a un modelo isotrópico donde se asume una varianza homogénea de cada *landmark*), el cual permite evaluar analíticamente el error de medición (EM) y la presencia de asimetría. Es un punto importante dado que el cAF es un componente pequeño de la variación fenotípica en comparación con el EM [Graham & Özener, 2016]. Se hizo un *Procrustes ANOVA* para la muestra total y para cada grupo dentro de la comparación estudiada de forma independiente. Además, para evaluar gráficamente el patrón principal de asimetría en la muestra y estudiar la presencia de antisimetría se hizo un análisis de componentes principales sobre el componente asimétrico y se graficó en un plano

cartesiano los primeros dos componentes, coloreando diferencialmente dentro de las categorías de comparación.

El análisis multivariado sobre el Componente de asimetría fluctuante se hizo con la función *procD.lm* la cual hace un análisis de permutaciones multivariado de la varianza (PERMANOVA) sobre la matriz siguiendo la fórmula de la Ecuación 4.

$$cAF = \beta_0 + \beta_1 Csize + \beta_2 edad + \beta_3 sexo + \beta_4 grupo/familia + e$$

[Ecuación 4]

Donde *cAF* es el componente de asimetría fluctuante compuesto por 84 variables (28 landmarks en 3D), β_0 es la ordenada al origen, β_1 y β_2 son los coeficientes principales de las co-variables tamaño y edad respectivamente, β_3 es el coeficiente que mide el efecto principal del sexo biológico, β_4 es el coeficiente principal de la categoría de comparación ajustado por familia como variable aleatoria, *e* es el error residual.

Categorías de comparación

- Parientes vs Controles
- Grado de Recurrencia familiar

Los parientes no afectados se ordenaron según el grado de recurrencia familiar siguiendo la clasificación señalada previamente en el capítulo I (Figura 6).

Todos las funciones informáticas mencionadas *plot.Outliers*, *gpa.gen*, *bilat.symmetry*, *procD.lm* y *morphol.disparity* son comandos del paquete de R especializado en morfometría geométrica, Geomorph [Adams et al., 2017; 2022; Baken et al., 2021].

Resultados

La muestra de imágenes faciales 3D corresponde a personas no afectadas: Los parientes de individuos con LL/PH (N=150) y los controles (N=40) de Patagonia. La razón masculino/femenino fue de 0,42 para los parientes y de 0,82 para los controles (Tabla 11).

Tabla 11: Muestra de imágenes 3D analizada

	N FEMENINO	N MASCULINO	N TOTAL	edad p50 (p25 - p75)
Controles	22	18	40	27 (12 - 35)
Parientes de LL/PH	106	44	150	30 (20 - 39)

El análisis gráfico de los primeros componentes principales del componente asimétrico no mostró ningún agrupamiento, y los controles y parientes parecen estar aleatoriamente distribuidos descartando la presencia de antisimetría y de asimetría direccional en la muestra total (Figura 14). Analíticamente se confirma la presencia de asimetría fluctuante respecto al error de medición en los resultados del *procrustes anova*, para la muestra total y para cada grupo de manera independiente, se ve que el cAF es significativo (Tabla 12). Se prosiguió comparando este componente de asimetría entre los grupos de interés.

El análisis multivariado mostró que los parientes de primer grado presentan mayor asimetría fluctuante -casi el doble- que los controles ($\text{razón}_{p/c} = 1,79$, $\text{VAR}_p = 8 \times 10^{-4}$, $\text{VAR}_c = 4,46 \times 10^{-4}$), y estas diferencias resultaron estadísticamente significativas ($p=0,006$, Tabla S8 y Tabla S9). También observamos que la familia -centrando los parientes pertenecientes al mismo núcleo familiar- y el error son los factores que más explican la variación en la asimetría (ver los R^2) señalando que la diversidad individual tiene mayor impacto en la variabilidad.

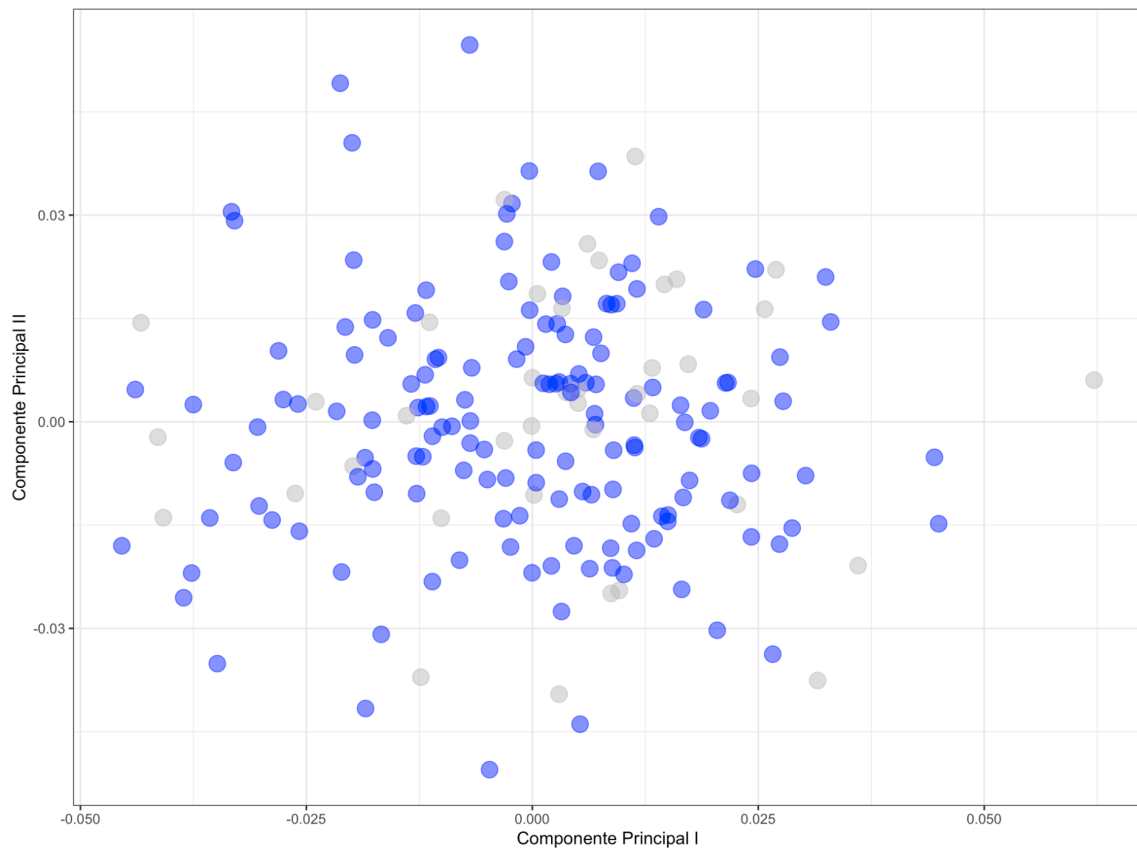


Figura 14: Distribución de los scores para los primeros componentes principales del análisis sobre el componente de asimetría bilateral para Controles (gris) y Parientes (azul).

Tabla 12: *Procrustes* ANOVA para la muestra completa, los controles y los parientes. Referencias: suma de cuadrados (SC), grados de libertad (gl), cuadrados medios (CM), componente de asimetría direccional (cAD), componente de asimetría fluctuante (cAF).

	Factor	SC	gl	CM	R ²	F	p
TOTAL	Individuo	3,92	189	0,021	0,85	10,72	0.001 **
	cAD	0,09	1	0,094	0,02	48,53	0.001 **
	cAF	0,37	189	0,002	0,08	2,80	0.001 **
	Error	0,26	370	0,0007	0,06		
CONTROLES	Individuo	0,83	39	0,021	0,847	11,802	0,001 **
	cAD	0,025	1	0,025	0,025	13,75	0,001 **
	cAF	0,071	39	0,002	0,072	2,592	0,001 **
	Error	0,054	78	0,001	0,055		
PARIENTES	Individuo	3,052	149	0,0205	0,844	10,439	0,001 **
	cAD	0,072	1	0,07158	0,019	36,486	0,001 **
	cAF	0,292	149	0,00196	0,081	2,853	0,001 **
	Error	0,2008	292	0,000688	0,056		

Recurrencia

En la Tabla 13 está detallada la clasificación de la muestra analizada según la recurrencia familiar. La razón masculino/femenino fue de 0,82 para los controles, de 0,45 para los parientes de primer grado de baja recurrencia y de 0,31 para los de alta recurrencia. El análisis mediante morfometría geométrica no mostró diferencias entre los parientes al estudiarlo según la recurrencia familiar. Cualitativamente no se observa un patrón de agrupamiento diferencial descartando la presencia de antisimetría y de asimetría direccional por grupo (Figura 15). En el análisis sobre el componente de asimetría fluctuante no se

observan diferencias estadísticamente significativas entre los parientes de baja y alta recurrencia (Tablas S12).

Tabla 13. Descripción de la muestra de imágenes 3D clasificada según la recurrencia familiar.

	N FEMEMINO	N MASCULINO	N TOTAL	EDAD (p25 p50 p75)
Controles	22	18	40	(12 27 35)
Baja recurrencia	77	35	112	(20 29 39)
Alta recurrencia	29	9	38	(23 31 40)

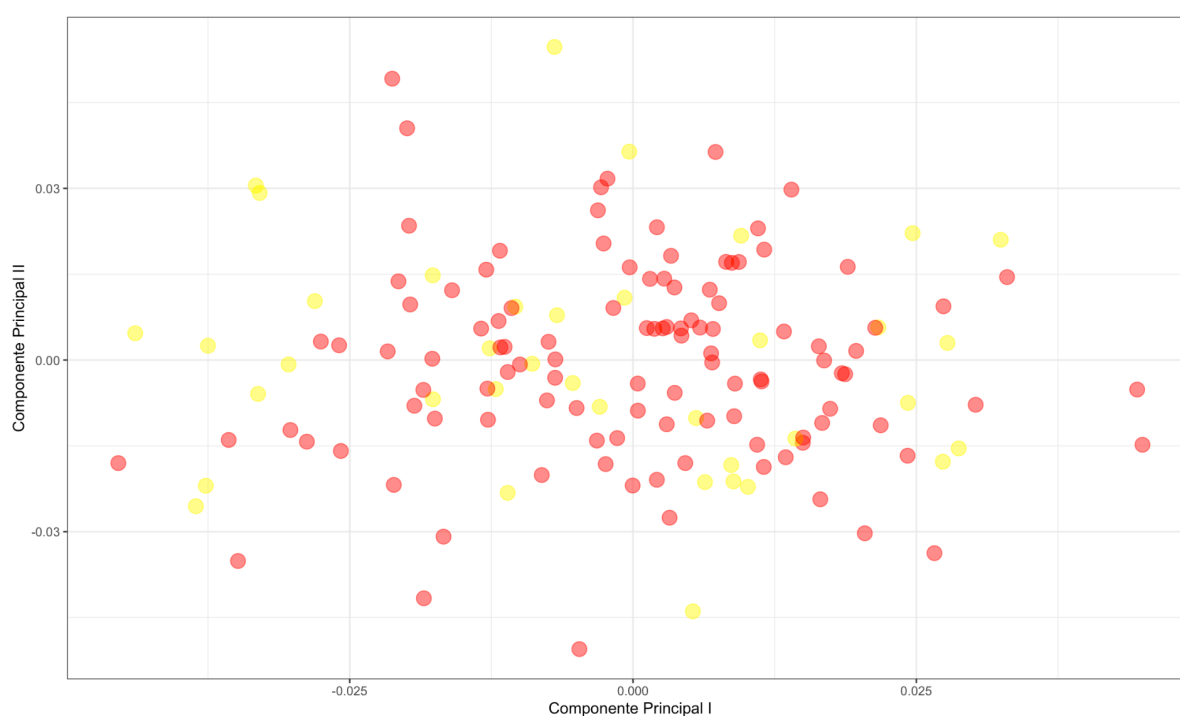


Figura 15. Distribución de los scores para los primeros componentes principales del análisis sobre el componente de asimetría bilateral para los parientes de familias con baja recurrencia (rojo) y alta recurrencia (amarillo).

En resumen, los parientes no afectados presentaron mayor asimetría facial frente a los controles. Lo cual indicaría una mayor susceptibilidad en las familias, sin diferencias según la recurrencia.

Capítulo III: Análisis de asociación génica

Antecedentes

En estudios previos, principalmente de asociación y de ligamiento, se han identificado genes asociados al LL/PHns. Algunos de ellos tienen importante participación durante el desarrollo orofacial como *MSX1*, *BMP4*, *SHH*, *FGF8*, otros son factores de crecimiento como *TGFa* y *TGFb*, factores de transcripción como TP63 y MAFb, proteínas con importancia en la adhesión y migración celular como las cadherinas y las nectinas (ejemplos: CDH1, NECTIN1), aquellas involucradas en la diferenciación celular epidérmica o peridérmica como el gen IRF6 ya determinado como el gen principal del síndrome Van der Woude y la señal Jag2-Notch1, las metaloproteasas de la matriz extracelular y sus inhibidores (MMPs, ADAMTSs, TIMPs) [Marazita et al., 1986, Vieira, 2008; Vieira, 2012; Miller et al., 2014; Leslie et al., 2017; Howe et al., 2018; Ji et al., 2020; Pusapaz et al., 2021]. En la revisión realizada por Reynolds y colaboradores, se describe la acción de WNT en múltiples procesos biológicos como la adhesión y la comunicación celular, especialmente su rol fundamental en el desarrollo orofacial y cómo influye en la ocurrencia de las fisuras orales. Además, detalla la interacción de WNT con las otras vías de señalización más importantes involucradas en el desarrollo facial, y describe la regulación epigenética mediante modificaciones sobre el ADN y miRNAs que existe sobre esta vía [Reynolds et al., 2019]. En particular, en Patagonia, se ha encontrado asociado una región sobre Xp21.1 que contiene al gen DMD [Fonseca et al., 2015], una interacción génica de Aquaporin 5 con anomalías dentales en casos de LL/PH [Anjomshoaa et al., 2015]; la estimación del grado de ascendencia nativa americana y mezcla étnica en esta población [Vieira-Machado et al., 2016]; una fuerte asociación con LL/PH ($P < 1.0 \times 10^{-7}$) de genes aún no reportados que mapean en 2p24, próximo de FAM49A que es un gen de función aún desconocida y en 19q13 cerca del gen RHPN2 involucrado en la organización del citoesqueleto de actina, una zona desértica ubicada en 8q24 y el locus 1q32 donde mapea el gen IRF6 también resultaron asociados al LL/PHns cuando una muestra de esta región fue incluida como parte de un estudio multicéntrico [Leslie et al., 2016].

Por otro lado, los estudios de asociación de barrido amplio del genoma (GWAS) sobre el LL/PHns y otras anomalías congénitas con distinciones faciales, también han servido para

comprender características genéticas asociadas a la morfología facial en general. En estos análisis de asociación hay variedad entre los fenotipos utilizados. Algunos incorporaron medidas lineales como la distancia bicigomática o el ancho del filtrum [Boehringer et al., 2011; Howe et al., 2018]; mientras que en otros trabajos usaron componentes principales generados a partir de las configuraciones de landmarks faciales [Liu et al., 2012; Miller et al., 2014; Rolfe et al., 2018]. Algunos genes asociados a la morfología facial son: PRDM16, PAX3, TP63, C5orf50, COL17A1 [Liu et al., 2012]. Entre los relacionados con indicadores de asimetría facial se encuentran el NFATC1, SOX5, NBAS, SNX6, AMBRA1, NRXN3, FANCC, LEFTY, SNAI1, entre otros [Miller et al., 2014; Rolfe et al., 2018]. A nivel general, la asimetría bilateral y la lateralización están menormente estudiadas a nivel genómico que las FOs, sin embargo, algunos genes que se encontraron involucrados son: Nodal, Pitx2, LEFTY1, LEFTY2, SNAI1, MSX1 y BMP4 [Grande & Patel., 2009; Boorman & Shimeld, 2002; Vieira & Dattilo, 2018].

Objetivos específicos

- III.a. Identificar variantes génicas asociadas al nivel de asimetría bilateral a partir de un estudio de asociación de barrido amplio del genoma (GWAS)
- III.b. Identificar variantes génicas asociadas al LL/PHns a partir de un estudio de asociación en familias sobre un barrido amplio del genoma (GWAS)
- III.c. Evaluar las relaciones entre las variantes génicas halladas y su relación con el LL/PHns en esta población.
- III.d. Estudiar las variantes génicas asociadas a la recurrencia familiar de LL/PHns en esta población.

Metodología

Toma y procesamiento de muestras biológicas

Se utilizó el kit OG-250 de ORAGENE-DNA® para recolectar las muestras de saliva. Se siguió el protocolo recomendado por la compañía. La extracción del ADN a partir de saliva se realizó en el Lab. central de la institución (UE CEMIC-CONICET) y siguiendo en cada caso los procedimientos de rutina. La cuantificación de ADN, los marcajes de los ADNs de los casos y de los controles, las hibridaciones y el análisis se hizo siguiendo los protocolos recomendados por los fabricantes de los productos utilizados. Se utilizó el scanner de microarrays de diseño semicustomizado de 557,677 *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) de Illumina HumanCoreExome que se encuentra enriquecido en regiones de interés para FOs y los softwares específicos integrados para levantar los datos moleculares a partir de la diferencia de fluorescencia con la referencia y poder relacionarlos con los datos clínicos de los pacientes. Esta parte del procedimiento *de mesada* fue realizada por un grupo colaborador en el Proyecto de Patagonia, el laboratorio dirigido por la Dra. Mary Marazita en el Center for Craniofacial and Dental Genetics (CCDG) de la Universidad de Pittsburgh (EEUU).

Los análisis bioinformáticos posteriores desde el control de calidad a los análisis de asociación y modelos estadísticos que se desarrollan a continuación, fueron realizados por la tesista y su equipo en el Laboratorio de Epidemiología Genética, UE CEMIC-CONICET.

Control de calidad

El procesamiento de datos genómicos se realizó usando PLINK 1.9 [Purcell & Chang <https://www.cog-genomics.org/plink/1.9>]. En primera instancia se hizo la prueba de calidad aplicando un protocolo de varios filtros sólo para autosomas (descartando los cromosomas sexuales y el mitocondrial) utilizando el total de la muestra de Patagonia (controles, casos y parientes no afectados).

El protocolo consistió en evaluar y filtrar por los siguientes parámetros, utilizando un protocolo estándar:

- ❖ Individuos con más del 10% de SNPs con información no especificada;

- ❖ SNPs con información genómica no especificada: se eliminaron aquellos SNPs que tuvieran más del 5% de individuos sin información;
- ❖ MAF: se eliminaron aquellos SNPs cuya frecuencia del alelo menos frecuente era menor al 1% (variantes raras)
- ❖ Equilibrio de Hardy-Weinberg: se excluyeron aquellos SNPs con un $p < 0,00001$;
- ❖ Desequilibrio de ligamiento: se utilizó un umbral de 0,8 para seleccionar SNPs que no estén en desequilibrio de ligamiento.

Análisis de asociación génica

Los SNPs e individuos que pasaron el control de calidad fueron procesados mediante dos abordajes: uno sobre el indicador de AB facial *Signed*, usando parientes no afectados y controles, y el otro, sobre la condición de LL/PHns, es decir, afectado y no afectado, utilizando tríadas.

Análisis de asociación génica sobre el nivel de asimetría como variable cuantitativa

En esta instancia se utilizó el índice de asimetría individual *Signed*, el cual es generado por la misma función *bilat.symmetry* utilizada en capítulo II. Este indicador está medido en distancias de *procrustes* y engloba las diferencias observadas para cada coordenada entre la configuración original y la reflejada -representando los lados derecho e izquierdo- considerando sólo los landmarks pareados de la configuración, obteniendo como resultado un valor individual de asimetría [Klingenberg & McIntyre, 1998; Lazić et al., 2015].

Fueron incorporados sólo los individuos con imagen facial 3D analizada e información genotípica. El total fueron 178 (parientes de primer grado no afectados y controles). Se realizó un análisis de asociación cuantitativa (qassoc) sobre este indicador usando el comando :

```
./Plink --assoc --adjust --family --pheno archivo
```

El Manhattan Plot y los SNPs asociados con mayor probabilidad se determinaron usando como *valor p* al corregido por control genómico que toma en cuenta la subestructura poblacional (columna GC, Tabla 14).

En PLINK 1.9 se importó un archivo de tres columnas (FamilyID, SampleID, fenotipo) que contiene la información de la muestra (indicadores de la familia y del individuo) y el valor del indicador crudo *Signed*, es decir, como variable continua. Se utilizó el 'comando' --pheno y luego se corrió un análisis de asociación usando el *flag* --family para ajustar por familia a aquellos individuos no afectados que eran parientes entre sí.

Los resultados se exportaron y fueron procesados usando R en Rstudio donde se generaron los gráficos y tablas que permiten una mejor visualización e interpretación. Los Manhattan plots, gráficos particulares de GWAS, se realizaron en R usando el paquete qqman [Turner, 2018].

Análisis de asociación génica en familias de LL/PHns (Test de desequilibrio de transmisión -TDT-)

En primer lugar se utilizaron las tríadas completas (N=43), es decir, caso (afectado con LL/PHns), madre y padre, para hacer un clásico Test de Desequilibrio de Transmisión (TDT) usando la plataforma PLINK 1.9. Este análisis de asociación en familias evalúa la transmisión diferencial de alelos de los padres a los hijos, para identificar asociaciones específicas [Spielman et al., 1993]. El mismo utiliza como *pseudo* controles a la variante alélica no transmitida, considerando que las variantes tienen la misma probabilidad de ser transmitidas ($p=0,5$) si el gen es bialélico y no está relacionado con la enfermedad. Como sólo los padres heterocigotas son informativos, el número de tríos informativos es diferente para cada SNP.

Poder de prueba: Usando el software Quanto [Morrison & Gauderman., 2009] se calculó que el poder de prueba para un estudio de 43 tríadas caso-padre-madre (N=129 individuos) y una frecuencia alélica de alrededor del 10% y bajo un modelo dominante, es posible detectar un alelo que aumente en al menos cuatro veces el riesgo de LL/PHns, con una potencia del 80% y un nivel de significancia del 95%.

Al igual que para el qassoc, los resultados se exportaron y fueron procesados usando R en Rstudio donde se generaron los gráficos y tablas que permiten una mejor visualización e interpretación. Los Manhattan plots, gráficos específicos GWAS, se realizaron en R usando el paquete qqman [Turner, 2018].

Análisis integrador

El último análisis integró la información obtenida de los análisis de asociación, es decir, se parte de la selección de SNPs realizada en los análisis de asociación génica. Utilizando PLINK 1.9 se exportaron los genotipos individuales de los casos de LL/PHns (N=117) y los controles (N=44) para aquellos SNPs seleccionados como candidatos en los análisis de qassoc y TDT.

La exportación de los genotipos se hizo considerando el alelo de riesgo para cada uno de los SNPs seleccionados, por consiguiente cada individuo analizado para cada SNP tendrá un valor entre 0, 1 o 2 (o no especificado). Se estudió la distribución de los genotipos, principalmente el porcentaje de genotipos no especificado en esta submuestra, y se excluyeron aquellos SNPs que contaron con más del 10% de individuos no especificados.

Luego, a partir de los genotipos se generaron nuevas variables dicotómicas: valor 0 = sin alelo de riesgo (genotipo=0), valor 1 = con al menos un alelo de riesgo (genotipos= 1 o 2). Es decir, se evaluó el alelo de riesgo con efecto dominante.

Con el fin de buscar un modelo más simple que incorpore las variables con una contribución mayor para explicar diferencias, se realizó una regresión logística LASSO -del inglés Least Absolute Shrinkage and Selection Operator- (selection (CV, folds(90)) en Stata 17 [StataCorp 2021, TX, USA]. Esta regresión LASSO incorporó el sexo además de los SNPs. Las variables seleccionadas como mejores predictoras se usaron para armar un red bayesiana usando los paquetes *data.table*, *bnlearn*, *parallel* e *igraph* en RStudio 4.2.3.

La red bayesiana está formada por nodos, que son las variables incluidas, y las aristas, que son las relaciones entre ellas. El tipo de red bayesiana utilizada en este trabajo no inicia con una hipótesis previa, en cambio, se rige y representa las relaciones probabilísticas condicionales entre las variables incorporadas. Es decir, la probabilidad de que haya ocurrido un suceso dado que ocurrió otro. En estas redes se modela la dependencia estadística, de forma cualitativa se puede estudiar el ordenamiento de los factores involucrados que no necesariamente está reflejando la causalidad pero funciona como generador de hipótesis. Cabe mencionar, que al armar las redes, el algoritmo descarta aristas (y a veces nodos) si están por formar ciclos; lo cual es necesario porque los ciclos pueden conducir a

inconsistencias y violaciones a la propiedad de independencia condicional en la cual se basa la teoría de Bayes.

En la Figura 16 se esquematiza la metodología aplicada en este capítulo en un diagrama de flujo sobre la metodología.

Análisis integrador: Recurrencia familiar

A partir de las diferencias observadas entre casos de LL/PNns con baja y alta recurrencia -del análisis sobre dermatoglifos-, se decidió evaluar la recurrencia como variable de interés mediante una red bayesiana. Fueron incluidos sólo los casos de LL/PHns, y clasificados según su historia familiar en: baja recurrencia (Recurrencia=0) o alta recurrencia (Recurrencia=1). Para armar la red se tomaron las mismas variables seleccionadas por la regresión LASSO, sólo se modificó la variable respuesta y la cantidad de individuos incluidos.

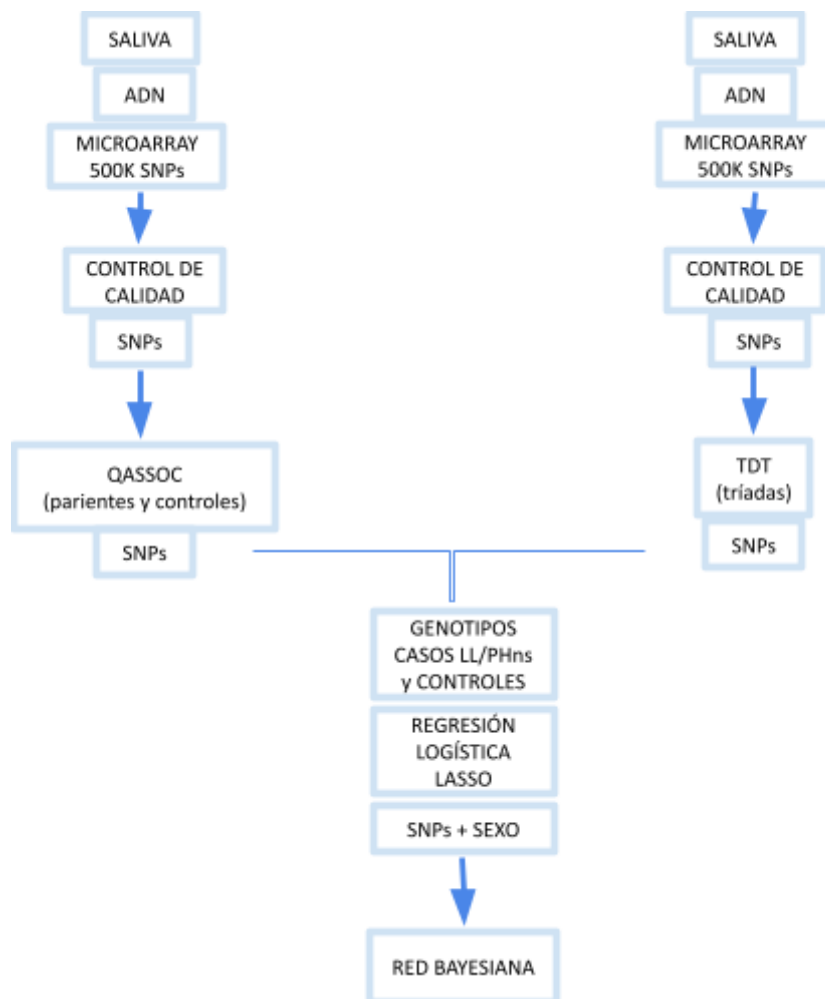


Figura 16. Diagrama de flujo sobre la metodología aplicada para los objetivos del capítulo III

Se exploró la información genética usando las plataformas libres: UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>), Ensembl (<https://ensemblgenomes.org/>), dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/), UniProt (www.uniprot.org/uniprotkb) y OMIM (<https://www.omim.org/>).

Resultados

En la prueba de calidad no se descartó ningún individuo por falta de genotipificación porque ninguno contó con más del 10% de SNPs faltantes. En cambio se descartaron SNPs por falta de genotipificación, de equilibrio de Hardy-Weinberg, por tener una frecuencia del alelo de menor frecuencia y por estar en desequilibrio de ligamiento, dejando un total de 255.759 SNPs usados en los análisis de asociación.

Análisis de asociación génica sobre el nivel de asimetría como variable cuantitativa

El análisis de asociación cuantitativo sobre el indicador *Signed* incluyó 178 individuos: fueron 140 parientes y 38 controles que contaron con información fenotípica y genética. El mismo mostró que 34 SNPs pasaron el umbral de Bonferroni. La ubicación de los mismos está representada en el Manhattan plot de la Figura 17 y la información genética está detallada en la Tabla 14.

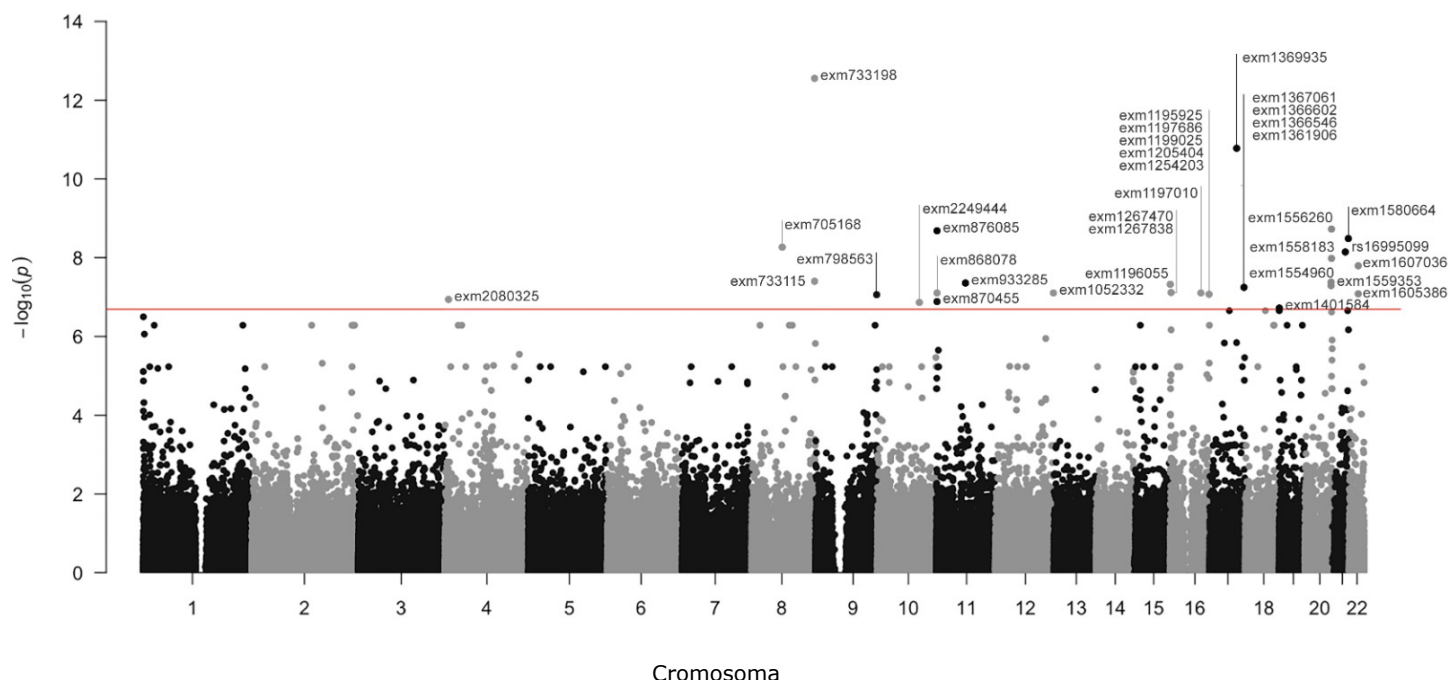


Figura 17. Manhattan-plot resultado del test de asociación cuantitativa con el nivel de asimetría facial en 178 individuos no afectados. Se indican los SNPs asociados con un nivel de significación de $p < 2,028974e-07$ (línea roja) con su denominación comercial para el microarray HumanCoreExome+Custom array de Illumina.

Tabla 14. Principales SNPs asociados al nivel de asimetría facial identificados a partir del análisis de asociación cuantitativa en individuos no afectados. Referencias: CROM (Cromosoma), A1 (usualmente el alelo de menor frecuencia), A2 (usualmente el alelo de mayor frecuencia), BETA (coeficiente de asociación), p (p valor), CG (p ajustado por control genómico)

CROM	SNP	A1	A2	BETA	R2	p	CG	GEN	LOCUS
4	rs148384602	A	C	0,002942	0,1546	1,135E-07	1,135E-07	SH3TC1	4p16.1
8	rs201712813	A	G	0,001844	0,1762	5,449E-09	5,449E-09	SLCO5A1	8q13.3
8	rs202045203	A	G	0,002957	0,1601	4,088E-08	4,088E-08	RECQL4	8q24.3
8	rs61754061	A	G	0,002745	0,2619	2,849E-13	2,849E-13	RECQL4	8q24.3
9	rs200521815	A	G	0,002952	0,1566	8,478E-08	8,538E-08	NOTCH1	9q34.3
10	rs141829322	A	G	0,001681	0,1465	1,347E-07	1,347E-07	CYP2C18	10q23.33
10	rs116122613	A	G	0,002943	0,1519	8,23E-08	8,478E-08	TUBGCP2	10q26.3
11	rs202227463	A	G	0,001671	0,1548	1,322E-07	1,322E-07	PKP3	11p15.5
11	rs202001610	G	A	0,002282	0,1899	2,059E-09	2,059E-09	MUC5B MUC5B-AS1	11p15.5
11	rs144597079	A	G	0,002956	0,1587	4,367E-08	4,367E-08	CABP4 GPR152	11q13.2
12	rs148705404	A	G	0,002946	0,1517	7,736E-08	7,736E-08	ULK1	12q24.33
16	rs199589252	A	G	0,002948	0,1523	7,868E-08	7,868E-08	PDIA2	16p13.3
16	rs116350678	A	G	0,002957	0,1593	4,893E-08	5,057E-08	AXIN1	16p13.3
16	rs200682205	A	G	0,002949	0,1529	7,403E-08	7,403E-08	PRR35	16p13.3
16	rs199932886	A	G	0,002948	0,1523	7,868E-08	7,868E-08	WDR90	16p13.3
16	rs7185231	A	G	0,002948	0,1523	7,868E-08	7,868E-08	MIR662 (miRNA)	16p13.3
16	rs45517423	A	G	0,002948	0,1523	7,868E-08	7,868E-08	PKD1 TSC2	16p13.3
16	rs113455884	A	C	0,002948	0,1523	7,868E-08	7,868E-08	COG4	16q22.1
16	rs144492145	A	G	0,001707	0,1523	8,554E-08	8,554E-08	ZNF469 LOC112268182 (ncRNA)	16q24.2
16	rs200654742	A	G	0,002945	0,1532	8,538E-08	8,443E-08	ZFPM1	16q24.2
17	rs146828783	A	C	0,002953	0,1567	5,908E-08	5,908E-08	LGALS3BP	17q25.3
17	rs202119784	A	G	0,002948	0,1523	7,868E-08	7,868E-08	BAHCC1 MIR3186 (miRNA)	17q25.3

17	rs200684776	A	G	0,002947	0,1556	6,576E-08	6,576E-08	BAHCC1	17q25.3
17	rs72854496	A	G	0,002945	0,1517	8,443E-08	8,331E-08	FAAP100	17q25.3
17	rs147220016	A	C	0,002454	0,2099	1,434E-10	1,434E-10	TEX19	17q25.3
19	rs199628190	A	G	0,001662	0,1481	1,869E-07	1,869E-07	TCF3	19p13.3
20	rs144059766	A	G	0,002959	0,1633	5,057E-08	4,893E-08	SS18L1	20q13.33
20	rs41284992	A	G	0,001894	0,1879	1,857E-09	1,857E-09	LAMA5 LOC124904946 (ncRNA)	20q13.33
20	rs61737391	A	G	0,002973	0,1768	1,032E-08	1,032E-08	BIRC7	20q13.33
20	rs77136158	A	G	0,002958	0,1606	4,285E-08	4,285E-08	HELZ2	20q13.33
21	rs117725825	A	G	0,001851	0,1877	3,246E-09	3,246E-09	COL6A2	21q22.13
21	rs16995099	A	G	0,002234	0,1735	7,306E-09	7,306E-09	DYRK1A	21q22.13
22	rs115310908	A	C	0,002946	0,1526	8,331E-08	8,23E-08	TMPRSS6	22q12.3
22	rs28450766	A	G	0,002195	0,169	1,598E-08	1,598E-08	TRIOBP	22q13.1

Asociación genómica en familias de LL/PHns (Test de desequilibrio de transmisión -TDT-)

Los resultados del Test de Desequilibrio de Transmisión del análisis de barrido amplio del genoma permitieron filtrar los SNPs con mayor asociación al LL/PHns. En la Figura 18 se muestra la ubicación a lo largo del genoma de los 10 SNPs más significativamente asociados al LL/PHns en estas familias. Los mismos son: rs6680362, rs4246538, rs12137412, rs3861561, rs4971552, rs728837, rs7769262, rs7047933, rs4746992 y rs2850488, cuya información genética está detallada en la Tabla 15.

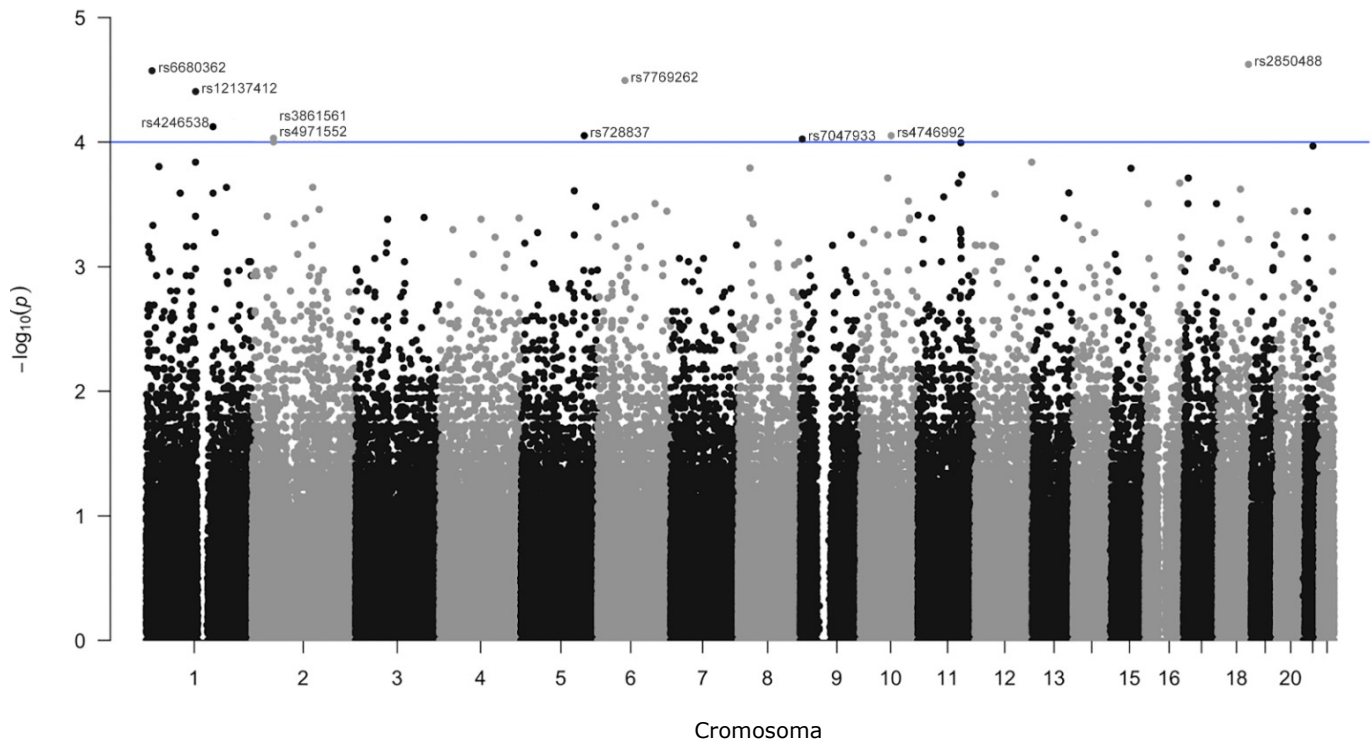


Figura 18. Diagrama tipo Manhattan-plot de los resultados del análisis de asociación en familias (TDT). Se indican los SNPs asociados con un nivel de significancia de $p < 0,0001$ (línea azul).

Tabla 15. Principales SNPs asociados a LL/PHns identificados a partir del análisis de asociación en familias (TDT). Referencias: CROM (Cromosoma), A1 (usualmente el alelo de menor frecuencia), A2 (usualmente el alelo de mayor frecuencia), T (número de A1 transmitidos), U (número de A1 no transmitidos), Ninfo (T+U = número de tríos informativos), OR (Odds Ratio), χ^2 (estadístico χ^2), P (p valor).

CROM	SNP	A1	A2	T	U	N info	OR	χ^2	P	GEN	LOCUS
1	rs6680362	G	A	23	2	25	11,5	17,64	2,669E-05	LRRC38 LOC102724856 ncRNA	1p36.21
1	rs12137412	A	G	7	33	40	0,2121	16,9	3,94E-05	VANGL1	1p13.1
1	rs4246538	A	G	39	11	50	3,545	15,68	7,501E-05	intergénica	1q23.1
2	rs3861561	G	A	33	8	41	4,125	15,24	9,448E-05	NRXN1	2p16.3
2	rs4971552	G	A	7	31	38	0,2258	15,16	9,888E-05	NRXN1	2p16.3
5	rs728837	G	A	9	35	44	0,2571	15,36	8,868E-05	intergénica	5q32
6	rs7769262	A	C	3	25	28	0,12	17,29	3,216E-05	intergénica	6q12
9	rs7047933	A	G	33	8	41	4,125	15,24	9,448E-05	SPATA6L	9p24.1
10	rs4746992	G	A	35	9	44	3,889	15,36	8,868E-05	intergénica	10q22.1
18	rs2850488	A	G	5	30	35	0,1667	17,86	2,381E-05	lncRNA	18q22.3

Análisis integrador

El último análisis integró la información obtenida de los análisis de asociación: los genotipos individuales de casos de LL/PHns (N=117) y controles (N=44) para los SNPs seleccionados del TDT y del qassoc, y el sexo biológico (Tabla 16). La regresión logística LASSO seleccionó el sexo y 11 SNPs (rs12137412, rs4246538, rs4746992, rs7769262, rs2850488, rs6680362, rs202001610, rs148384602, rs117725825, rs200684776, rs200521815) como los mejores predictores, la ubicación de los mismos están resumidas en la Tabla 17.

Tabla 16. Descripción de la muestra incorporada en el análisis integrador clasificada según la recurrencia familiar.

	N FEMEMINO	N MASCULINO	N TOTAL
Controles	27	17	44
Casos	49	68	117
Baja recurrencia	40	39	79
Alta recurrencia	9	29	38

Tabla 17: SNPs seleccionados por la regresión logística LASSO como mejores predictores de la ocurrencia de LL/PHns

SNP	CROM	LOCUS	GEN
rs12137412	1	1p13.1	VANGL1
rs6680362	1	1p36.21	LRRC38 LOC102724856 (ncRNA)
rs4246538	1	1q23.1	intergénico
rs7769262	6	6q12	intergénico
rs4746992	10	10q22.1	intergénico
rs2850488	18	18q22.3	lncRNA
rs148384602	4	4p16.1	SH3TC1
rs200521815	9	9q34.3	NOTCH1
rs202001610	11	11p15.5	MUC5B MUC5B-AS1 (lncRNA)
rs200684776	17	17q25.3	BAHCC1
rs117725825	21	21q22.3	COL6A2

El resultado de la red bayesiana se encuentra en la Figura 19, se puede notar que algunos snps seleccionados por el LASSO no se ven en la red, eso sucede porque, como se mencionó anteriormente, el mismo algoritmo de bayes elimina las aristas que pueden generar ciclos. En la red se observa que existen tres aristas directas que llegan a LL/PHns y podrían representar tres vías posibles de "acción": (A) la que llega por el nodo sexo, (B) la que llega vía el snp rs4246538, y (C) la del rs2850488. La vía (A) une snps que mapean en los genes MUC5B2 y MUC5B2-AS1 (rs202001610), el SH3TC1 (rs148384602) y el LRRC38 y LOC102724856 (rs6680362). La vía (B) (rs4246538) se compone de una triple relación entre tres snps obtenidos del qassoc y que se encuentran en los genes BAHCC1 (rs200684776), NOTCH1 (rs200521815) y COL6A2 (rs117725825). La vía (C) se limita al snp rs2850488 ubicado en un lncRNA.

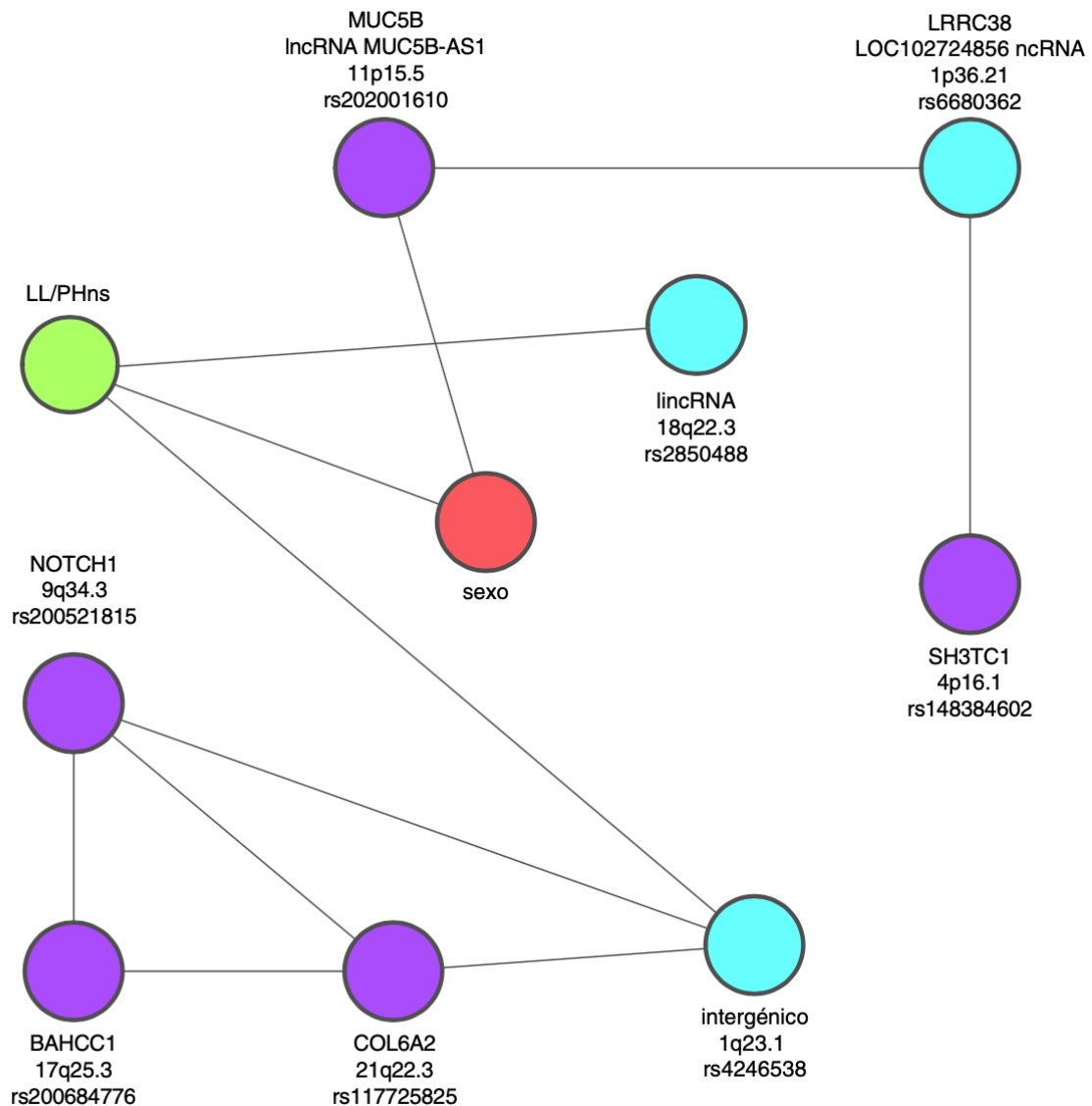


Figura 19. Red bayesiana incluyendo los casos de LL/PHns y controles. En verde está la variable de interés: LL/PHns, en rojo el sexo biológico, en celeste los SNPs candidatos seleccionados mediante el TDT, y en violeta los SNPs candidatos seleccionados por el qassoc sobre la AB. Los SNPs están nombrados usando la referencia de dbSNP.

Análisis integrador: Recurrencia familiar

La red sobre la recurrencia familiar se muestra en la Figura 20. Se ven cuatro nodos que llegan directamente a la variable recurrencia: (A) mediante el snp rs12137412 ubicado en el gen VANG1, (B) el snp rs2850488 dentro de un lincRNA, (C) vía el snp rs200684776 que se encuentra en el gen BAHCC1, (D) vía el snp rs202001610 el cual se ubica en los genes MUC5B y MUC5B-AS1.

Se observan semejanzas con la red anterior obtenida para el LL/PHns: (1) El snp rs2850488 no se relaciona con ningún otro snp y tiene una relación directa con la variable de interés (Recurrencia y LL/PHns); (2) El snp rs202001610 dentro de MUC5B y de MUC5B-AS1 tiene una relación directa con sexo; (3) La tríada de los snps ubicados dentro de los genes "BAHCC1 - NOTCH1 - COL6A2" interrelacionados entre sí y su vínculo con el snp regulatorio rs4246538. Por otro lado, en esta red está incorporado un SNP que no está incluido en la red sobre el LL/PHns, el rs12137412 ubicado en el gen VANGL1.

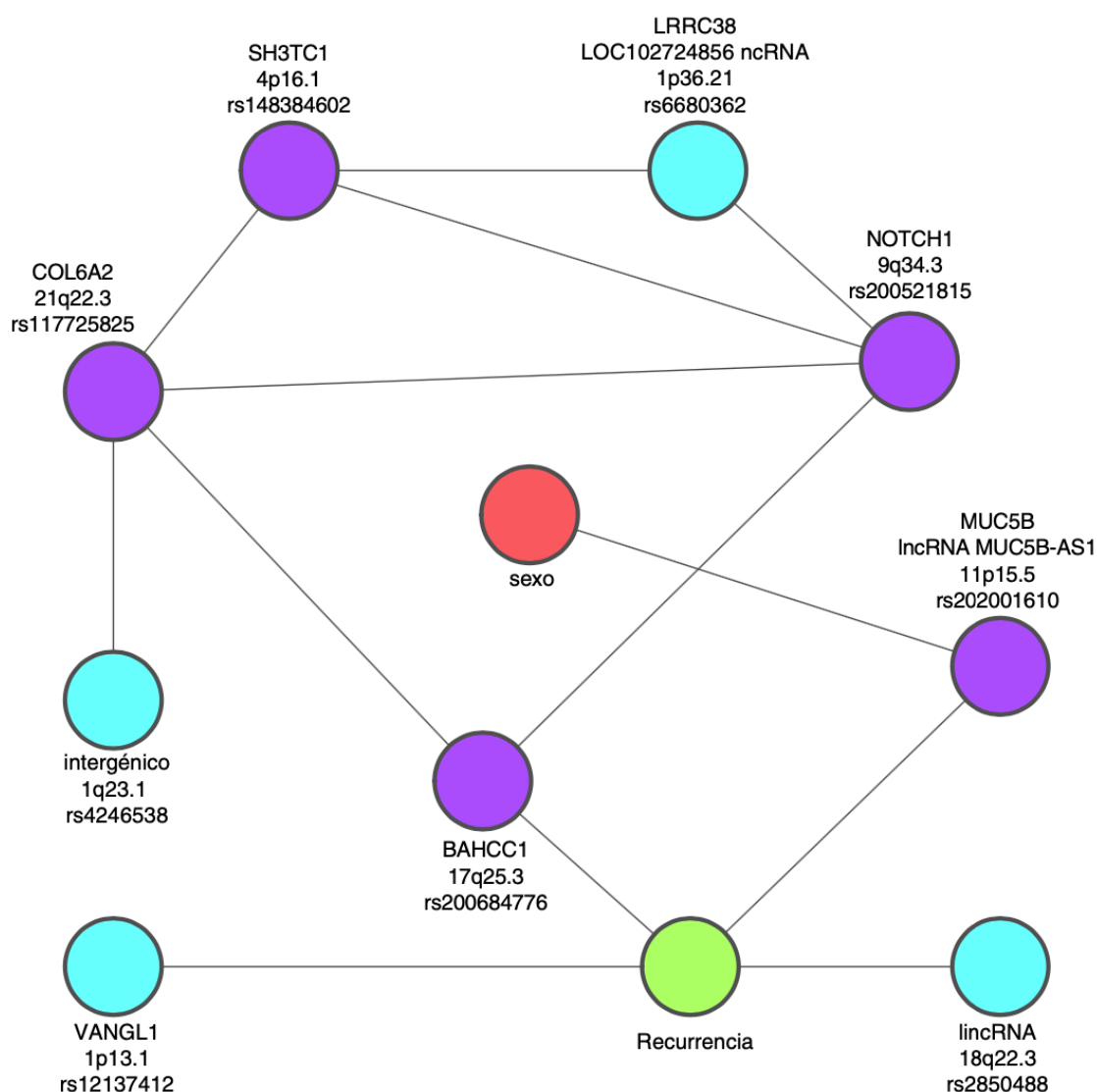


Figura 20. Red bayesiana para la recurrencia familiar. En verde está la variable de interés, en rojo el sexo biológico, en celeste los SNPs candidatos seleccionados mediante el TDT, y en violeta los SNPs candidatos seleccionados por el qassoc sobre la AB. Los SNPs están nombrados usando la referencia de dbSNP.

Discusión

La presente tesis representa un aporte al desarrollo de varias líneas de investigación sobre fisuras orales desarrolladas por el grupo ECLAMC: El estudio epidemiológico sobre factores de riesgo de fisuras orales en Sudamérica [Castilla et al., 1999, 2000, 2001, 2002; López-Camelo et al., 1996; Poletta et al., 2007]; el estudio de factores genéticos asociados a las fisuras orales a nivel mundial [Leslie et al., 2016, 2017; Ludwig et al., 2012; 2017; Yu et al., 2017; Carlson et al., 2019; van Rooij et al., 2019; Huang et al., 2019; Reynolds et al., 2020; Slavec et al., 2022]; y por último, al estudio de clusters de alta frecuencia para identificar factores específicos asociados a las fisuras orales en esta región [Poletta et al., 2007; Anjomshoa et al., 2015; Fonseca et al., 2015; Gili et al., 2015, 2016; Vieira-Machado et al., 2016; Santos et al., 2018].

La caracterización sobre la asimetría bilateral realizada en este trabajo brinda continuidad al entendimiento sobre los factores genéticos relacionados con el LL/PHns.

Asimetría bilateral en familias con casos de LL/PHns

Dimorfismo sexual en la asimetría bilateral

En diferentes campos de investigación, desde la biología y la medicina a la antropología y la psicología, se investiga sobre las diferencias biológicas entre los hombres y las mujeres. En particular, limitando a las cuestiones físicas, las diferencias entre los sexos biológicos no se limitan al sistema reproductor y su genitalidad, sino que existen diferencias en los procesos biológicos desde el desarrollo embrionario que se manifiestan en dimorfismos fisiológicos y epidemiológicos.

Estudiar los dermatoglifos como fuente de asimetría tiene la doble ventaja de presentar una ventana temporal al momento del desarrollo donde el labio y el paladar están en formación [Babler, 1991], y además, se mantienen invariantes durante toda la ontogenia [Galton, 1892]. Está descrito que el sexo femenino tiene mayor capacidad de *buffer*, mayor estabilidad y posibilidad de amortiguar los efectos generados por factores ambientales o genéticos, y se pueden manifestar en presentar menores niveles de asimetría bilateral [Graham & Özener.,

2016]. Sin embargo, las investigaciones muestran resultados contradictorios como describen en la revisión realizada por Graham y Özener: en algunos casos la asimetría fue mayor en hombres, en otros en mujeres y otros trabajos no encuentran diferencias. El trabajo realizado por Micle & Kobliansky en el cual de quince indicadores de “asimetría direccional”, en diez los valores fueron mayores en hombres; mientras que las diferencias no fueron tan marcadas para los indicadores de “asimetría no direccional”, sí vieron una tendencia de las mujeres a presentar menores valores. La explicación dada se basa en la evidencia a favor de la mayor asimetría que presentan los homocigotas, y la hemicigosis presente en los hombres daría lugar a una mayor asimetría [Micle & Kobliansky., 1986]. En contraposición, el trabajo de Neiswanger de 2002 en el cual analizan distintos indicadores también basados en los dermatoglifos no encuentran diferencias entre los sexos. Esto mismo se observó en esta tesis para los indicadores IDPF e IAD basados en los dermatoglifos. En el trabajo más reciente de Neiswanger et al., encuentran mayores niveles de asimetría en hombres para la muestra total de los casos, sin embargo, las diferencias significativas no fueron consistentes en todas las comparaciones realizadas [Neiswanger et al., 2020]. En conjunto, se concluye que las diferencias no son tan evidentes y que existen diversos factores que pueden estar influyendo.

A diferencia de los dermatoglifos, la asimetría facial se obtuvo de una muestra biológica que está expuesta a crecimiento y cambios durante toda la ontogenia. De hecho, hay al menos un trabajo que muestra que las diferencias faciales entre mujeres y hombres varían durante la ontogenia. Específicamente, muestran que existen diferencias entre los sexos en adultos jóvenes (mayor en hombres que en mujeres), que las mismas se atenúan en edades mayores, y lo relacionan con una influencia de hormonas sexuales involucradas en la morfología facial [Harnádková et al., 2023]. En esta tesis tampoco se hallaron diferencias entre los sexos al analizar el componente de asimetría fluctuante basado en landmarks faciales al igual que el trabajo de Zhang et al. 2018. Graham y Özener (2016) destacan que en los grupos poblacionales expuestos a estrés socioeconómico y en poblaciones étnicamente mixtas se vieron mayores niveles de asimetría facial en los hombres que en las mujeres. En esta revisión resaltan que los resultados contradictorios pueden deberse no sólo a las diferencias en la metodología aplicada, los rasgos estudiados y el poder estadístico, sino que un factor influyente también es la diferente exposición a estrés entre las poblaciones analizadas. Los autores aclaran que esperar diferencias sexuales en el nivel de asimetría en una población que no fue expuesta a un estrés significativo durante el

desarrollo sería poco razonable; y además señalan que se observó mayores niveles de AB en mujeres en algunas poblaciones patriarcales donde las condiciones de vida de las mujeres son peores que las de los hombres y que esto podría justificarlo, por lo tanto es importante reconocer que las condiciones sociales son factores que influyen en los rasgos cuantificados.

Aunque los resultados de esta tesis no reflejan un efecto del sexo en el nivel de asimetría, no se puede descartar que exista, y es una fortaleza incorporarlo como una variable explicatoria adicional en los modelos estadísticos por su relación con la asimetría y con la patología, que como se mencionó afecta mayoritariamente a los hombres [Mossey et al., 2002, 2009, 2012].

Asimetría bilateral según la lateralidad de la fisura oral

Mundialmente se observa mayor frecuencia de un tipo particular de LL/PHns, la frecuencia de la fisura labial unilateral izquierda es aproximadamente el doble que la fisura unilateral derecha [Mossey et al., 2002, 2009, 2012; Gundlach & Maus, 2006] y la misma proporción ha sido observada en la muestra de Patagonia. En esta tesis se comparó el nivel de asimetría usando el indicador IAD basado en los dermatoglifos entre casos con fisura bilateral o unilateral, y luego entre unilateral izquierda y derecha. En primer lugar, se vió que el indicador IAD presentó un patrón de asimetría direccional donde el lado derecho tuvo mayor número de crestas que el lado izquierdo en toda la muestra estudiada. Este tipo de patrón observado con el indicador IAD nos dice que, a nivel grupal, todos los individuos mostraron una inclinación determinada, y por lo tanto, que en este grupo es posible que exista un factor crónico que esté controlando esta tendencia. Si se hubieran encontrado diferencias entre los subtipos, reforzaría la hipótesis de heterogeneidad etiológica entre ellos.

Contrariamente a lo esperado, no se observaron diferencias significativas en los niveles de asimetría del IAD según la lateralidad de la fisura. Es posible que existan diferencias en la etiología y que no estén representadas en el nivel de asimetría de los dermatoglifos. De hecho, el trabajo de Yoon et al. 2003 en el cual estudiaron los padres y madres de individuos con LL/PH unilateral y compararon los niveles de asimetría facial representados por la diferencia entre landmarks bilaterales (pareados) a partir de las radiografías cefalométricas,

encontraron diferencias entre los parientes según el lado de la fisura en el hijo/a. Entre los resultados más interesantes de ese trabajo, está el hallazgo de una correspondencia entre el lado con el ala nasal más amplia en los padres y la lateralidad de la fisura en los hijos, especialmente para las madres, pudiendo estar representando una contribución genética al desarrollo de la fisura. Sin embargo, estos resultados requieren de repetibilidad. Con este fin, en algunos trabajos donde compararon la AD facial entre parientes no afectados y controles se buscó continuar con este interrogante. En el trabajo de Zhang et al., 2018, no encuentran diferencias significativas al comparar entre parientes de casos con fisura unilateral y bilateral, aunque al comparar cada grupo de parientes contra los controles, sí ven que sólo los padres de individuos con fisura unilateral presentan mayor AD estadísticamente significativa que los controles. Lo mismo se vio en el trabajo de Miller et al., 2014 al estudiar la asimetría facial: parientes de individuos con fisura unilateral tienen mayor AD facial que los controles, ven una tendencia no estadísticamente significativa entre ambos grupos de parientes (unilateral vs bilateral) y tampoco observan diferencias entre los parientes de individuos con fisura bilateral y los controles. Las diferencias entre parientes de un subtipo de fisura respecto del otro sugeriría una especificidad genética de la lateralidad. En suma, los resultados no muestran evidencia contundente de diferencias en el nivel de asimetría entre los subtipos según la lateralidad de la fisura, pero es posible que presenten diferencias en otros rasgos fenotípicos.

Background etiológico: nivel de asimetría bilateral en afectados y recurrencia familiar

El Índice de Disimilitud en el Patrón de Figuras, ha sido utilizado en genética clásica desde la década del 1960 principalmente para el estudio fenotípico de síndromes. En particular respecto de las FOs, fue utilizado en distintas poblaciones para comparar el nivel de AB entre personas afectadas, sus parientes y controles. En los resultados de esta tesis sobre este indicador no se observan diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles. Sin embargo, sí se observaron diferencias al clasificar los casos según la recurrencia familiar hallando que sólo aquellos con alta recurrencia familiar muestran mayor asimetría diferenciándose de los casos esporádicos y de los controles. Del mismo modo, en el trabajo de Eslami et al., 2013 donde estudiaron una población en Irán y tampoco encontraron diferencias al comparar los niveles de asimetría bilateral en casos esporádicos de LL/PHns unilateral y bilateral (sin historia familiar), sus parientes no afectados y controles de la misma población. Ellos evaluaron el indicador IDPF junto con otros indicadores,

compararon las medias entre los grupos y no hallaron diferencias significativas. Mientras tanto, el trabajo de Jahanbin et al., 2010 sobre esa misma población sí encontró mayores niveles de AB, al comparar las medias para el mismo indicador IDPF únicamente en las madres de individuos con LL/PHns bilateral y sin historia familiar, frente a los controles femeninos.

Por otro lado, el reciente trabajo de Neiswanger et al., 2020 sí vieron diferencias en el IDPF entre casos y controles, siendo mayor en los casos, consistente entre las diferentes poblaciones que analizaron. En el mismo trabajo, también incluyen la comparación con parientes no afectados, y observan significativamente mayor IDPF en los casos que en sus parientes no afectados. Asimismo, a diferencia de esta tesis, en este trabajo no clasifican las familias según los antecedentes de fisuras orales, pero mencionan que la muestra del estudio está enriquecida en familias con múltiples casos de fisuras; por lo tanto, las diferencias entre casos y controles podrían estar limitadas sólo a los casos de familias con recurrencia aunque no haya sido evaluado. De todos modos, debido a que el tamaño de muestra utilizado en el trabajo de Neiswanger et al., 2020 casi que triplica la muestra de esta tesis, también es posible que existan diferencias entre casos sin historia familiar y controles de menor magnitud que las observadas con los casos con historia familiar y en esta tesis falte poder para identificarlas.

Los resultados del IDPF de este trabajo respecto a la recurrencia familiar de LL/PHns coinciden con lo observado por Adams y Niswander en 1967, posteriormente por Woolf y Gianas en 1976 y 1977, Neiswanger et al., 2002, y más recientemente por Leite et al., 2015 en el que comparan el nivel de asimetría entre casos, sus padres no afectados y controles de una población de Brasil, en la cual tampoco observan diferencias entre casos y controles. Si bien este indicador no puede dar información sobre el patrón de asimetría, sobre su direccionalidad, sí evidencia que estas personas habrían tenido menor capacidad de *buffer* durante el desarrollo embrionario. Mientras tanto, el indicador IAD que sí evidencia un patrón de asimetría direccional, también evidenció diferencias entre los casos según el grado de recurrencia familiar. Estos resultados aportan evidencia a la hipótesis general de una heterogeneidad causal entre los casos esporádicos y los casos de familias con alta recurrencia. Específicamente, podrían ser uno o pocos genes principales actuando en estos casos como agente causal de la fisura [Weinberg et al., 2006] sobre un *background* multifactorial que modifica la penetrancia de los genes principales. Lo cual sería acorde con

lo propuesto para la herencia del LL/PHns en esta población donde existe evidencia del efecto de un gen principal dominante de penetrancia incompleta y con una frecuencia alélica de entre 1% y 9% que interacciona con un componente multifactorial [Poletta, 2010; Poletta et al 2011; Fonseca et al 2015].

Asimetría bilateral en los parientes no afectados

A partir de la aplicación de morfometría geométrica sobre una configuración de 28 landmarks faciales se observó mayor asimetría bilateral al analizar el componente de asimetría fluctuante y comparar las varianzas entre los parientes de individuos con LL/PHns frente a los controles de Patagonia. Este resultado acompaña lo observado por Miller et al., 2014. En este trabajo se describe un extenso análisis en el que evalúan distintos componentes de la forma facial y los comparan entre parientes no afectados y controles, al igual que en esta tesis. A partir de una configuración facial de 32 landmarks, ellos analizan los componentes principales generados a partir del componente simétrico (morfología facial) y del componente asimétrico, también utilizan un análisis discriminante para comparar las medias de asimetría (representando la asimetría direccional) y un indicador individual de asimetría fluctuante. Respecto a la asimetría facial, encuentran mayor asimetría direccional en los parientes no afectados frente a los controles y no observan diferencias sobre los valores individuales de asimetría fluctuante, al estudiar la muestra en su conjunto sin separar por sexo ni edad pero incorporándolos como covariables en los modelos. Sin embargo, en los análisis que hacen estratificando por sexo y edad en cuatro grupos, obtienen diferencias en los indicadores individuales de AF sólo para el estrato de mujeres adultas, viendo mayor AF en las madres de personas con LL/PHns que en los controles. En el mismo sentido, el trabajo de Zhang et al., 2018 muestra el análisis de asimetría direccional a partir de 15 landmarks ubicados en la región nasal en los parientes de LL/PHns y los controles. En este trabajo utilizan un análisis discriminante para comparar la configuración media de la asimetría nasal entre los grupos. En primera instancia comparan entre controles y el total de parientes de individuos con LL/PH, en el que observan que estos últimos presentan mayor asimetría nasal. Los autores resaltan que aunque la magnitud difería, la dirección y localización de la AD nasal era similar entre parientes y controles, para lo cual sugieren que los factores etiológicos predisponiendo a la asimetría en los parientes, también están presentes en la población general. Pese a que usaron un indicador diferente al que se analizó en esta tesis, ellos evalúan AD mientras que en esta tesis se profundizó en el

componente de AF, los resultados de nuestros trabajos apuntan en la misma dirección: los parientes se diferencian de los controles presentando mayor asimetría facial. Esto mismo podría representar una característica subclínica o una mayor inestabilidad acompañando un riesgo mayor de LL/PHns en las familias [Zhang et al., 2018].

A diferencia de lo observado en los casos mediante los indicadores IDPF e IAD, al clasificar los parientes según la recurrencia de LL/PHns en las familias, no se ven diferencias en el nivel de AB facial. Es posible que se deba a que las diferencias en personas no afectadas sean más sutiles que en individuos afectados, que el rasgo o la forma de estudiarlo no sea lo suficientemente potente para detectar las diferencias o que efectivamente no existan.

En conjunto, se concluye que en las familias con casos de LL/PHns existe mayor asimetría, posiblemente relacionado a un *background* multifactorial de mayor susceptibilidad y menor capacidad de amortiguar los disturbios que los controles, el cual contribuiría a tener un mayor riesgo basal de LL/PHns. Con este antecedente, se buscó identificar los factores genéticos relacionados con el nivel de asimetría en estas familias.

Búsqueda de factores genéticos: Análisis de asociación génica

Control por sesgo de subestructura poblacional

En las investigaciones científicas centradas en la etiología de alguna patología está extensamente utilizado el diseño caso-control, es decir la comparación de la frecuencia de alguna característica entre personas afectadas (casos) y no afectadas (controles). En estos estudios, cuando se observa una diferencia significativa de un valor de alguna variable se entiende que la misma está asociada a la enfermedad. Por ejemplo, en los análisis de asociación génica, la diferencia en la frecuencia de un alelo entre aquellos afectados y los controles puede ser interpretada como asociada. Sin embargo, existen fenómenos evolutivos y sociológicos que afectan las frecuencias alélicas y, si no se los toma en cuenta, pueden provocar asociaciones espurias, es decir, falsos positivos. En otras palabras, es posible que existan grupos dentro de la población estudiada, que debido a desviaciones de la panmixia, un alelo sea más frecuente en un grupo que en otro, y en simultáneo, que en ese primer grupo la patología sea más frecuente. De ser así, puede hallarse un alelo

asociado a la enfermedad cuando en realidad no está relacionado con la patología sino que está relacionado con la condición de pertenecer al grupo.

Este sesgo por subestructura poblacional es un sesgo muy conocido en epidemiología genética y existen diferentes metodologías para controlarlo. Una de ellas es estratificar la población en grupos, por ejemplo, por etnicidad, por religión, por nivel socioeconómico. Para ello, conocer la población de estudio es un factor necesario. La población argentina es una combinación de nativos americanos e inmigrantes europeos principalmente europeos latinos [Avena et al., 2012]. En Patagonia hay un componente mayor de nativo amerindio [Bailliet et al., 1994]. De hecho, el componente amerindio se asoció como factor de riesgo para FOs en esta región [Vieira et al., 2002; Poletta et al. 2007].

Otra posibilidad son los análisis de asociación basados en familias, como el Test de Desequilibrio de Transmisión, que son robustos contra la subestructura poblacional. Este abordaje es ampliamente utilizado en estudios de etiopatogénesis para patologías complejas como las fisuras orales. Una desventaja de este tipo de abordaje es el requerimiento de contar con información genética de una gran cantidad de tríadas (afectado y sus padres) para tener mayor potencia. Por otro lado, el avance de las herramientas estadísticas y las plataformas analíticas, incluyó el desarrollo de un procedimiento que permite controlar por subestructura poblacional en estudios de asociación con diseño del tipo caso-control. Se conoce como control genómico e implica la estimación de la inflación por la posible subestructura poblacional usando la información genética de loci no relacionados con la enfermedad, calcula un valor de corrección y el mismo se aplica para calcular los p-valores corregidos [Bacanu et al., 2000]. En esta tesis los posibles sesgos por subestructura poblacional fueron controlados mediante dos abordajes: un diseño de asociación en familias (tríadas caso-madre-padre) para la asociación con LL/PHns; y un diseño con control genómico para la asociación cuantitativa con el nivel de asimetría; lo cual fortalece los resultados obtenidos.

Factores genéticos asociados con la mayor (in)estabilidad

La asimetría, comprendida como una consecuencia o una manifestación de una menor capacidad de amortiguar los disturbios, tiene un origen multifactorial. Se buscó responder cuáles eran aquellos genes asociados a la (in)estabilidad y específicamente a la asimetría

facial: Si acaso se trataban de genes ya relacionados con otros procesos embriológicos o con el control de procesos básicos celulares, o quizás estaban involucrados en el desarrollo facial y ya han sido previamente asociados con alguna patología.

Ninguno de los SNPs asociados al nivel de asimetría fue previamente vinculado de forma directa a la morfología facial, ni al desarrollo facial, ni a la lateralización. Sin embargo, sí se hallaron ubicados en genes con funciones biológicas interesantes que cabe discutir.

En primer lugar, algunos genes resultaron asociados a patologías o síndromes, que en ciertos casos presentan distinciones faciales o inclusive fisuras orales dentro de su fenotipo. El gen RECQL4 codifica para una helicasa ATP dependiente y está relacionado con: el Síndrome Rapadilino, que entre sus características pueden presentar caras inusuales y fisura de paladar [OMIM: 266280]; el Síndrome Baller Gerold, cuya característica principal es la craneosinostosis (cierre prematuro de los huesos craneales) [OMIM: 218600]; y el Síndrome Rothmund Thompson [OMIM: 268400], en el que los afectados presentan anomalías óseas y tienen mayor riesgo de padecer cáncer [OMIM: 603780].

Sumado a este, el gen COG4 determina una proteína necesaria para el correcto funcionamiento del aparato de Golgi, el cual interfiere en la glicosilación y el transporte proteico intracelular [UniProt: Q9H9E3, OMIM: 606976]. Se encontraron mutaciones en este gen en pacientes con Síndrome de Saul-Wilson [OMIM:618150] y en personas con desorden congénito de glicosilación [OMIM: 613489]; en ambos casos, los afectados presentan características dismórficas, asociadas a defectos en el desarrollo del sistema nervioso y otras malformaciones congénitas.

Asimismo, se asoció el gen DYRK1A, cuya proteína tiene un rol importante en la reparación del ADN dañado. Este gen se asoció con desórdenes del desarrollo que incluyen dismorfias faciales, microcefalia y discapacidad intelectual [UniProt: Q13627].

En segundo lugar, algunos de los genes asociados codifican proteínas que participan de la comunicación celular, la adhesión y la migración. Estas son capacidades fundamentales de las células de la cresta neural que tienen un rol clave durante el desarrollo orofacial.

Uno de ellos es el gen LGALS3BP, el cual codifica para una proteína de la familia de las galectinas. Tales proteínas participan en las interacciones célula-célula y célula-matriz, y

participan de la adhesión celular vía integrinas. También podrían estimular la respuesta inmune mediante células NK (natural killer) ante la presencia de virus o de células tumorales [Uniprot: Q08380; UCSC:uc002jwh.3]. Al igual que el gen LGALS3BP, el gen PKP3 podría tener un rol en la adhesión celular y en mecanismos de señalización, ya que determina una proteína de la familia de las placofilinas. Estas proteínas se localizan en los desmosomas y están involucradas en la unión entre caderinas y filamentos intermedios del citoesqueleto [UCSC:uc021qbk.1].

Otro gen relacionado con estas funciones biológicas es LAMA5. La proteína codificada por el mismo es un componente de la matriz extracelular, que al unirse al receptor específico regula la fijación, la migración y la organización de las células a los tejidos durante el desarrollo embrionario [Uniprot: O15230]. Tiene un rol en la formación esquelética, y mutaciones en el gen se asociaron con el síndrome de displasia ósea de Bent, el cual, además de los defectos esqueléticos, incluye dismorfismos faciales y anomalías musculares [OMIM: 601033].

En el mismo sentido, se encontró el gen COL6A2, que codifica para una de las tres cadenas alfa del colágeno de tipo VI, un filamento de componente de la matriz extracelular, que también participa de la adhesión celular. Se encontraron mutaciones en este gen asociadas a la miopatía de Bethlem y a la distrofia muscular congénita de Ullrich [OMIM: 120240]. Recientemente, se encontró que COL6A2 se correlacionó con la prognosis de cáncer gástrico, y se sugiere como blanco terapéutico; los autores del trabajo muestran que otros genes de esta misma familia del colágeno también fueron asociados a la prognosis del cáncer, y explicitan que fueron previamente relacionados con diferentes cánceres y a la vía PI3-Akt por otros autores [Li et al., 2023].

Sobre la migración celular se encontró el gen TUBGCP2. La proteína correspondiente es parte del complejo organizador de microtúbulos y participa especialmente en la migración neuronal. De hecho, variantes en este gen se asociaron con la displasia cortical, una patología que entre sus características presentan dismorfias faciales [UniProt: Q9BSJ2, OMIM: 617817]. Continuando con el citoesqueleto, también se asoció el gen TRIOBP que codifica para una proteína de unión a filamentos de actina. La misma tiene varias isoformas que participan en diferentes procesos celulares: la isoforma 1 controla la organización del

citoesqueleto, la expansión y contracción celular, y es esencial para la división mitótica, y las isoformas 4 y 5 participan de la formación de estereocilias [Uniprot: Q9H2D6].

Respecto a la comunicación celular, se encontró asociado el gen CABP4. El mismo codifica para una proteína de unión a calcio cuyas funciones principales son mantener el equilibrio de calcio y regular la liberación de neurotransmisores, que son parte de la sinapsis normal de los fotorreceptores y de la transmisión auditiva [Uniprot:P57796]. El mismo SNP también se ubica dentro del gen PGR5 (GPR152), que codifica para un receptor tipo G de membrana involucrado en múltiples vías [Uniprot: Q8TDT2].

Además, se encontró asociado el gen SLC05A1 que codifica para un transportador iónico transmembrana ubicado en la membrana plasmática. Debido a su función biológica y a su ubicación celular, este transportador podría estar involucrado en la comunicación célula-célula y célula-matriz [Uniprot:Q9H2Y9]. También se asoció el gen TMPRSS2, que codifica para una proteasa transmembrana, la cual se vió involucrada en la entrada de virus durante una infección [Uniprot: O15393, OMIM: 602060]. De hecho, un trabajo muestra que la inhibición de TMPRSS2 podría bloquear la entrada de virus [Hoffmann et al., 2020]. Se ve la importancia que puede tener en la entrada de patógenos durante la ontogenia, y sería interesante estudiar su función durante el desarrollo embrionario.

En tercer lugar, se asociaron genes que codifican para componentes intracelulares. Uno de ellos es el gen SH3TC1, cuyo parálogo, el SH3TC2, está asociado a la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth tipo IV y se halló involucrado en el mantenimiento de la estructura e integridad de la mielina en las células de Schwann. Por las similitudes estructurales de estas proteínas, los autores señalan que las funciones celulares entre los parálogos pueden ser similares, aunque no está clara la localización ni la completa caracterización funcional de SH3TC1 [Vijay et al., 2016].

Asimismo, se asoció el gen ZNF469, del cual se sugiere que puede estar involucrado en la transcripción, debido a la estructura que tiene la proteína [Uniprot: Q96JG9]. Otro gen asociado, el gen TEX19, codifica una proteína que participa de la espermatogénesis y del desarrollo de la placenta. Además, la misma colabora con la señalización de la interacción entre Piwi-ARN (piRNA), que se encarga de controlar el movimiento de los transposones durante la meiosis [Uniprot: Q8NA77]. Si bien las funciones descritas no corresponden con

procesos biológicos del desarrollo facial, no se puede descartar que este gen tenga un rol en la proliferación celular somática o en la diferenciación celular de otras células durante el desarrollo embrionario.

Otro gen asociado y relacionado con la transcripción es TCF3. El mismo cumple un rol importante en el desarrollo y la diferenciación de las células B, y podría estar involucrado en la diferenciación neuronal [UCSC: uc002lto.3]. En el mismo sentido, se encontró asociado el gen SS18L1 (CREST), que codifica para una subunidad del complejo remodelador de la cromatina dependiente de calcio y específico de neuronas [OMIM: 606472]. También se asoció el gen HELZ2, que codifica para una exo-ribonucleasa reguladora de la transcripción y activadora de la actividad catalítica de los peroxisomas [Uniprot: Q9BYK8].

Sumado a los genes reguladores de la expresión, algunos SNPs asociados al nivel de AB se ubican dentro de ARN no codificantes (miRNA, ncRNA, lncRNA): MIR662 (rs7185231), MIR3186 (rs202119784), LOC112268182 (rs144492145) y LOC124904946 (rs41284992). Si bien se desconoce los genes específicos que estos ncRNA están regulando, se sabe que la función principal de los ARN no codificantes es la regulación de la expresión génica, y de esta manera, pueden estar involucrados en diversos procesos biológicos. Se observó el rol de los ncRNA en la proliferación, la migración y la transición epitelio-mesenquimática en cáncer [Zhang et al., 2019; Wang et al., 2019]. Esta evidencia sugiere que es posible que estén involucrados en diversos procesos celulares con gran repercusión durante el desarrollo.

Es posible que los ncRNA participen de las vías de señalización principales que están involucradas en el desarrollo facial, como son la cascada de BMP, la de TGF β , la de WNT/b-catenina y la de FGF. Sobre la vía de WNT, en los resultados obtenidos se identificó un SNP en el gen AXIN1, que actúa como un regulador negativo de la misma. En suma, otro inhibidor de WNT de la misma familia que AXIN1, AXIN2, ya se reportó asociado al desarrollo craneofacial, inclusive asociado al LL/PHns [Letra et al., 2009]. Además, la vía WNT también apareció al analizar los dos genes en donde se ubica el snp rs45517423: PKD1 y TSC2. La proteína codificada por PKD1 es un componente de un canal iónico de membrana que participa del equilibrio del calcio intracelular. A su vez, tiene un rol en interacciones célula-célula y célula-matriz, se relaciona con un miembro de la familia WNT, y participa del desarrollo tubular renal [UniProt: P98161]. Por otro lado, el gen TSC2 codifica

un regulador negativo del complejo mTORC1, que afecta el transporte intracelular de proteínas y controla el crecimiento celular. TSC2 es considerado un gen supresor de tumores y mutaciones en el mismo están asociadas a la esclerosis tuberosa, la cual se caracteriza por el desarrollo anormal de células y tejidos. Asimismo, la regulación negativa de TSC2 sobre mTORC se ve influenciada por WNT, provocando una reactivación del crecimiento celular, lo que puede estar asociado a la tumorigénesis [UniProt: P49815].

En cuarto lugar, cabe mencionar que el nivel de AB se asoció con genes cuyas funciones celulares le otorgan plausibilidad biológica a la relación. Por un lado, resulta interesante que se haya identificado el gen WDR90, porque tanto la lateralización como los diversos procesos embrionarios dependen del movimiento celular, y especialmente este gen se encontró requerido durante la etapa final de la ciliogénesis [Hamel et al., 2017; OMIM: 618290]. Por otro lado, se encontró el gen CYP2C18. El mismo codifica para un citocromo de la familia CP50 que está involucrado en la síntesis de lípidos, principalmente de colesterol y sus hormonas derivadas (esteroideas) [OMIM: 601131]. Una hipótesis para ser estudiada es la posibilidad de que este gen sea uno de los genes relacionados con la morfología facial y, por consiguiente, con los cambios en las diferencias de asimetría entre hombres y mujeres durante la ontogenia. Además, el gen encontrado PDIA2 codifica para una proteína intracelular que se une a estrógenos, y podría tener un rol en la regulación de sus niveles celulares [UniProt: Q13087].

Asimismo, otros genes que se asociaron al nivel de AB están involucrados en la diferenciación, la proliferación celular y la apoptosis. Uno de ellos es el gen BIRC7, que codifica para una proteína cuya función es promover la apoptosis o liberar procesos anti-apoptóticos. De este modo, influye en la proliferación, la terminación y controla el ciclo celular [UniProt: Q96CA5]. Otro gen, ULK1, codifica para una quinasa involucrada en la autofagia como respuesta a la inanición celular. La misma tiene un rol en la diferenciación neuronal y posiblemente en el transporte de vesículas a lo largo del axón [UniProt: O75385]. Además, se encontró asociado el gen ZFPM1. Este gen codifica para un regulador de la transcripción que pertenece a la familia FOG. El mismo está involucrado en la diferenciación de eritrocitos y megacariocitos, y podría estar envuelto en la regulación de ciertos genes en las gónadas y en el desarrollo cardíaco [UniProt: Q8IX07]. También, el gen FAAP100 codifica para una proteína que es miembro del complejo central de la anemia de Fanconi. Tal complejo proteico desempeña un papel fundamental en la red de la respuesta al daño de la

DNA. La función principal del mismo es la reparación del ADN, lo cual es muy importante para la estabilidad celular [UniProt: Q0VG06]. La anemia de Fanconi es un trastorno genéticamente heterogéneo, y los afectados presentan anomalías del desarrollo de los órganos principales, anomalías cutáneas, rasgos faciales pequeños entre otras características, y susceptibilidad al cáncer [OMIM: 227650].

Sumado a esto, el gen BAHCC1 codifica una proteína de unión a la cromatina que, al unirse a las histonas, participa de la regulación de la expresión génica. En ensayos bioquímicos y estructurales, se halló que BAHCC1 actúa como un lector directo de la histona H3K27me3, mostrando que la modulación trasciende diferentes tipos celulares. Lo cual sugiere que BAHCC1 podría tener una función generalizada en las células de los mamíferos [Fan et al., 2020]. En un trabajo más reciente, Berico et al., 2023 identificaron que BAHCC1 actúa como un *super-enhancer* de un subgrupo de células tumorales de melanoma, y resaltando su importancia de este gen en la proliferación celular e invasión *in vitro* e *in vivo*. Observaron que este gen se encuentra mayormente expresado en melanomas que en otras células tumorales, y su expresión está asociada a un peor pronóstico [Berico et al., 2023].

Otro de los genes destacables que se encontró asociado al nivel de AB facial fue NOTCH1, que codifica para uno de los cuatro parálogos del receptor Notch que existen en humanos [UniProt: P46531]. Esta familia de receptores transmembrana está ampliamente conservada y sus cascadas de señalización guían procesos celulares fundamentales desde el desarrollo. Las distintas uniones entre los cuatro receptores con los cinco ligandos que existen en humanos participan de la comunicación, la supervivencia, la proliferación, la diferenciación celular y la angiogénesis. Asimismo, pueden suprimir el crecimiento celular y llevar a la apoptosis [Zhou et al., 2022]. Por otro lado, en un trabajo de investigación en embriones de pollo se vio la importancia de esta familia de receptores en la regulación del calcio intracelular y su rol en la lateralización derecha-izquierda al activar la vía Nodal [Raya et al., 2004]. Este receptor también se asoció con patologías en la vida adulta, incluyendo el cáncer, lo cual es biológicamente compatible con los roles claves que tiene este grupo de receptores en los diversos procesos celulares [Kopan & Ilagan 2009].

En último lugar, el SNP rs202001610 está ubicado en el locus 11p15.5 y se encuentra dentro de la región codificante del gen MUC5B y en la región intrónica del antisense lncRNA MUC5B-AS 1. El gen MUC5B codifica para una proteína predominante en el mucus, la

mucina. El mismo se halló relacionado con una mayor susceptibilidad para la fibrosis pulmonar idiopática, una patología que incluye inflamación pulmonar y, de agravarse, puede derivar en cáncer de pulmón [UniProt:Q9HC84, OMIM: 600770]. Por otro lado, el trabajo de Yuan et al., 2018 sobre la regulación positiva entre el antisense lncRNA MUC5B-AS1 y el MUC5B, y su rol en adenocarcinoma pulmonar muestra resultados muy interesantes sobre la co-regulación de estos genes, el rol oncogénico del lncRNA MUC5B-AS1 al promover la migración y la metástasis tumoral [Yuan et al., 2018].

Considerando los cambios en la biología celular que adquieren las células tumorales, asimilándose a las características totipotentes de las células de la cresta neural, y los roles en los procesos biológicos que tienen estos genes, no sorprende que varios de ellos se hayan relacionado con distintos tipos de cáncer.

Interacción génica entre inestabilidad y susceptibilidad a fisuras orales

Luego de hallar los factores genéticos asociados al nivel de asimetría en esta muestra, se buscó cuáles de estos factores podrían estar interactuando con genes relacionados al LL/PH, aumentando la susceptibilidad a la fisura en esta población. Para ello, en un abordaje original integrador en el cual se incorporó los resultados de los análisis de asociación, y mediante herramientas estadísticas bayesianas se llegó a un modelo que muestra las posibles relaciones entre estos genes, y cómo podrían ser candidatos para el LL/PHns en Patagonia.

Es importante destacar que la relación entre el LL/PHns y el sexo biológico se mantiene en las redes y visibiliza lo observado epidemiológicamente que los embriones masculinos presentan mayor riesgo frente a los femeninos. En ambas redes se vio la relación entre sexo y el SNP ubicado en los genes MUC5B2 y MUC5B2-AS1. La relación biológica entre estas variables podría hallarse en la presencia de un dimorfismo sexual en las prevalencias de patologías asociadas a estos genes. En la búsqueda bioinformática el gen MUC5B se vio asociado a la enfermedad pulmonar intersticial [OMIM: 600770], pero existen sesgos y contradicciones en las diferencias sexuales [Ozaki et al., 2022]. Por otro lado, sí se observa mortalidad diferencial en cáncer de pulmón en Argentina, siendo mayor en hombres que en mujeres, al igual que la ocurrencia de LL/PHns [DEIS, 2023]. De todos modos, la relación entre este SNP (y estos genes) con el LL/PHns requiere mayor investigación.

Los SNPs seleccionados del TDT no se ubican en genes previamente reportados con LL/PHns. Sin embargo, aquellos filtrados por la regresión LASSO y encontrados en las redes bayesianas mostraron relaciones interesantes. El SNP rs4246538 está ubicado en una región intergénica y reguladora del locus 1q23.1. No hay información sobre cuáles son los genes ni las vías en las que estaría involucrado, pero el resultado de esta tesis podría indicar una posible interacción con los genes del trío NOTCH1-COL6A2-BAHCC1 y el riesgo de LL/PHns. Como se mencionó anteriormente, estos tres genes tienen una relación con la tumorigénesis en distintos tipos de cáncer: el posible blanco terapéutico hallado para el gen COL6A2 para el cáncer gástrico [Li et al., 2023]; la importancia de BAHCC1 principalmente en el cáncer que resulta de la tumorigénesis de los melanocitos, que son células epidérmicas derivadas de las células de la cresta neural. Considerando que las CCN tienen un rol importante en el desarrollo facial sería interesante evaluar la expresión de este gen en CCN 'normales', no cancerosas, y estudiar su función. Además, en particular el gen NOTCH1 es de sumo interés, por la asociación con anomalías del sistema cardiovascular y neurológico en su identificación con el Síndrome de Adams-Oliver [OMIM, 2024]; y porque su unión con el ligando Jag2 está relacionada con mecanismos embriológicos del desarrollo oral que se encontró asociada al LL/PH [revisión por Ji et al., 2020]. En este sentido, existen numerosos reportes en la literatura sobre la observación de una mayor frecuencia de cáncer en familias de casos con fisuras orales [Zhu et al., 2002; Bille et al., 2005; Menezes et al., 2009; Taioli et al., 2010; Vieira 2012; Araújo Veloso Popoff et al., 2013; Dunkhase et al., 2016; Oliveira-Dias et al., 2020], y sería interesante determinar en qué medida estas observaciones están afectadas por un sesgo de averiguación o efectivamente existen mecanismos moleculares comunes entre la etiopatogénesis de ambas patologías. Los resultados presentados aportan nueva evidencia en el marco de esta discusión.

Al igual que el snp rs4246538, el rs2850488 tampoco ha sido asociado a ninguna patología. Este SNP está ubicado en el locus 18q22.3 dentro de un lncRNA (long intergenic non coding RNA) [Ensembl, 2024]. Si bien no se conoce las funciones específicas del mismo, es interesante notar que este SNP cae dentro de la región del síndrome de delección 18q. Este síndrome ya reportado en la literatura, incluye la fisura oral dentro de los posibles fenotipos [Liu et al., 2021]. De todos modos, como la expresión de un gen es local y tiempo dependiente, habría que evaluar la expresión durante el período crítico para estudiar las

funciones biológicas en las que efectivamente está involucrado este SNP. Para ello, se podrían realizar ensayos in vivo, estudiar su expresión en tiempo y espacio, ejemplo en la región orofacial durante el período crítico, o las consecuencias fenotípicas de hacer un knock out del mismo.

Por último, la red bayesiana sobre la recurrencia familiar mantuvo algunas relaciones observadas en la primera red. La diferencia principal es la adición del snp rs12137412 que es una variante intrónica dentro del gen VANGL1 ubicado en el locus 1p13.1. Este gen codifica para una proteína transmembrana que se encontró asociada a defectos del tubo neural [UniProt: Q8TAA9, OMIM: 182940]. La revisión realizada por Dreyen, VanderVorst y Carraway sobre las funciones biológicas de los genes VANGL1 y VANGL2, resaltan la importancia de VANGL en mantener la polaridad tisular, su rol en procesos morfogenéticos durante el desarrollo embrionario, la relación con la vía WNT, y su función reguladora de la progresión tumoral y la relación observada con distintos tipos de cáncer [Dreyen et al., 2022]. Estas funciones hacen de VANGL1 un gen candidato para este grupo de casos con alta recurrencia familiar por su funciones relacionadas con el desarrollo y el cáncer. De todos modos, estos resultados requieren mayor profundización: un punto de partida podría ser secuenciar este gen en los afectados y sus parientes, y luego comparar entre aquellos provenientes de familias con baja y alta recurrencia.

Las redes presentadas representan un modelo en el cual algunos genes que aumentan la susceptibilidad a fisuras orales actúan sobre un *background* de menor capacidad de amortiguar los efectos ocasionados por disturbios del desarrollo. Sería interesante evaluar la relación de estas regiones asociadas a una mayor asimetría bilateral con otros genes reportados en la literatura como asociados con fisuras orales en otras poblaciones y que en los análisis de esta tesis no fueron seleccionados. Cabe profundizar la acción de los genes candidatos como VANGL1 en la ocurrencia de LL/PHns, y las interacciones intergénicas con los genes relacionados con la inestabilidad y su posible rol en la ocurrencia de fisuras orales.

Fortalezas

- Estudiar una población de una región de alta frecuencia en la cual es más probable que sean una o pocas causas incrementadas, y también aumenta la posibilidad de

encontrar los factores genéticos involucrados porque la muestra es más homogénea [Poletta et al 2007, Gili et al 2015, 2016].

- La aplicación de morfometría geométrica que es una herramienta muy potente que sirve para comparar las diferentes formas de una determinada estructura, y si bien la asimetría no es el foco principal de la misma, brinda la posibilidad de medirla y analizarla.
- Cuantificar el error de medición en el análisis mediante morfometría geométrica principalmente al profundizar sobre la asimetría fluctuante ya que la misma suele ser sutil y fácilmente tapada por el error de medición [Graham & Özener, 2016]. En particular, sobre imágenes de tejido blando donde la precisión suele ser menor que en las imágenes de tejido óseo.
- Incluir el tamaño y la edad, principalmente al analizar un rasgo expuesto a cambios durante la ontogenia. Si bien la asimetría se considera un indicador de inestabilidad embrionaria, si se mide sobre un carácter morfológico que siguió expuesto a diversos factores y el rasgo se ve modificado, también es posible que la asimetría a partir del mismo se vea afectada. Teniendo los datos y sabiendo que el tamaño puede tener un posible efecto sobre la forma, lo que se conoce como alometría, y que la edad por razones biológicas y temporales también puede influenciar en la forma (y en la asimetría), por estar expuestos a factores intrínsecos y extrínsecos, se incorporaron estas variables al modelo. Aunque no se encontró un aporte estadísticamente significativo de las mismas sobre la asimetría, es una fortaleza poder incorporar estas variables y cuantificar sus efectos.
- Contar con muestras biológicas de distintos individuos pertenecientes al mismo núcleo familiar. Dado que los individuos de la misma familia se parecen más entre sí que con otros individuos, y como no es posible descartar que exista un factor particular, sea genético o ambiental, que esté afectando la asimetría, se incorporó al modelo estadístico una variable independiente que determina la pertenencia a una misma *familia*, y así cuantificar y ajustar por esta fuente de variación. Evaluando los R^2 y las varianzas explicadas en las tablas de *procrustes anova* y las tablas de las correspondientes regresiones, las variables con mayor efecto sobre la forma no son

las grupales, sino las individuales. En otras palabras, aquello que más explica la varianza de la forma *shape* y la asimetría son los individuos, cada persona, cada familia. Considerar como posible factor confusor e incorporarlo en el modelo, no sólo es una fortaleza sino una condición necesaria.

Además, contar con varias muestras de ADN del mismo núcleo familiar permitió hacer los análisis de asociación génica en familias, por ejemplo el Test de Desequilibrio de Transmisión (TDT) en tríadas.

- Control por sesgo de subestructura poblacional mediante dos abordajes: El análisis de asociación en familias (TDT) lo controla por el mismo diseño, y en el análisis con la variable continua (qassoc) se usó el valor de p corregido por GC genomic control .
- El uso de microarrays de 500K SNPs para obtener datos genéticos. Los paneles de patologías específicas se basan en una referencia global que no representa a la población estudiada en esta tesis. De hecho, la descripción de variantes de secuencia de enfermedades con componente genético es escasa para las poblaciones sudamericanas. Por lo tanto, considerando que las referencias globales actuales podrían omitir información relevante y dado que la causa de las enfermedades puede variar entre grupos étnicos, cabe destacar la ventaja de empezar con un microarray de 500K SNPs que posibilita una amplia cobertura del genoma y resaltar la importancia de los aportes realizados en la presente tesis.

Limitaciones

- A diferencia de un experimento controlado con modelos *in vitro* o *in vivo*, en este tipo de estudios en epidemiología clínica y genética no es posible controlar la distribución de sexos y otras variables potencialmente confusoras para cada una de las características comparadas. En este tipo de estudios, la composición de los subgrupos de la muestra depende de diferentes factores: la frecuencia de la patología en cada subgrupo poblacional; de su eficiente averiguación y registro hospitalario; de la posibilidad de contactar a los casos y sus familias; del consentimiento informado de esos individuos de participar en el estudio; del consentimiento en particular de los individuos para cada uno de los exámenes clínicos, antropométricos y de extracción

de material biológico, y para cuáles no aceptan ser examinados. Es debido a esto que la muestra obtenida y el poder de prueba alcanzado varía para cada uno de los distintos objetivos específicos. Esta potencial limitación ha sido tomada en cuenta y tratado de minimizar con la elección del abordaje metodológico y el análisis estadístico desarrollado para responder a cada objetivo específico.

- La imposibilidad de incorporar como posibles confusores las características sociodemográficas que ya han sido asociadas con LL/PHns, como etnia, nivel socioeconómico, exposición materna a enfermedades agudas o crónicas durante el embarazo, consumo de medicamentos durante el primer trimestre de embarazo o consumo materno de drogas sociales, tabaco y alcohol durante el embarazo y otras variables ambientales como posibles teratógenos. Esta limitación también afecta la posibilidad de evaluar interacciones gen-ambiente, que tienen importancia en patologías multifactoriales y en el riesgo de recurrencia de las mismas.
- La imposibilidad de evaluar la epigenética, ya que los microarrays de ADN utilizados en esta tesis, no evalúan las modificaciones moleculares de metilación, acetilación y cambios en las histonas, y además se sabe que la expresión de los genes es temporal y localmente dependiente, por lo tanto, para estudiar la expresión de ciertos genes, habría que tener una muestra biológica de la zona orofacial durante el período embrionario. Algo que en futuras investigaciones sería posible hacer utilizando modelos animales.

Propuestas a futuro

- Realizar análisis de asociación génica especialmente diseñados para evaluar los datos genómicos en los cromosomas sexuales (par 23). Dado la determinación del sexo en humanos en donde el sexo femenino presenta dos cromosomas X los cuales contienen unos 1000 genes, mientras que el sexo masculino porta un cromosoma Y que contiene sólo unos 55 genes, y donde las regiones que son homólogas entre los cromosomas X e Y se limitan sólo a los extremos de los brazos cortos de ambos cromosomas (denominadas pseudoautosómicas); estos SNPs no pueden ser analizados con los test clásicos de asociación y de desequilibrio de transmisión. Estos nuevos análisis planificados nos permitirán profundizar resultados previos de nuestro

grupo sobre la asociación entre el LL/PH y la región Xp21.1 que contiene al gen DMD [Fonseca et al., 2015].

- Repetir el análisis integrador usando la lateralidad de la fisura como variable dependiente, y de esta manera, investigar si algunos factores genéticos relacionados con el nivel de asimetría se asocian diferencialmente entre estos subtipos.
- Usar directamente el indicador cuantitativo obtenido de los dermatoglifos que no fue posible debido a que el número de individuos con datos de dermatoglifos y datos genómicos a partir de microarrays analizados no era suficiente para poder evaluarlo (N=20). Con nueva financiación, se espera poder genotipificar más individuos y, de esta manera, tener un tamaño de muestra suficiente para realizar un análisis de asociación basado en el indicador IAD.
- Extender las comparaciones y los análisis de asociación sobre los componentes principales generados a partir del componente asimétrico. Esto sería interesante ya que permite estudiar la ubicación de las diferencias y ver cuáles son las zonas que concentran mayor asimetría o mayores diferencias entre los grupos, y ahondar en la búsqueda de SNPs asociados a cada una. Además, ahondar en el análisis del componente de asimetría direccional.
- Aumentar la muestra, en particular de familias con fisuras labiales (LL) de modo que sea posible evaluar el interrogante sobre si LL y LLPH corresponden o no a la misma entidad nosológica.
- Profundizar el estudio sobre la relación entre la ocurrencia de LL/PHns y el gen VANGL1. Un posible abordaje podría ser mediante ensayos funcionales en modelos animales.

Conclusión

La presente tesis incluyó la aplicación de herramientas clásicas, como el análisis de dermatoglifos, y novedosas, como la morfometría geométrica sobre imágenes 3D, para cuantificar el nivel de asimetría bilateral y determinar las diferencias entre las familias de afectados, destacando que los casos pertenecientes a familias con alta recurrencia presentan mayor nivel de asimetría que los casos de familias de baja recurrencia. La mayor asimetría encontrada en los parientes sugiere una mayor susceptibilidad basal multifactorial.

Se logró identificar factores genéticos asociados a un mayor nivel de asimetría y analizar cómo estos podrían estar aumentando la predisposición a las fisuras orales, ya sea por relaciones intergénicas con genes relacionados con fisuras o reduciendo la capacidad de amortiguar los efectos ocasionados por disturbios durante el desarrollo embrionario.

Se obtuvo un modelo que sintetiza estas interacciones génicas sobre la ocurrencia de LL/PHns en esta población y que requieren de futuros estudios para su profundización: el efecto del trío NOTCH1-BAHCC1-COL6A2 mediado a través de la región que incluye al snp rs4246538; la relación directa del snp rs28504888 con LL/PHns; la relación entre MUC5B y el sexo; y por último, el rol del gen VANG1 como gen candidato para los casos con alta recurrencia familiar, y posiblemente relacionado con la mayor frecuencia observada en Patagonia.

Esta tesis destaca la importancia de los estudios de epidemiología clínica que combinan análisis de recurrencia familiar, evaluaciones de características fenotípicas subclínicas y técnicas moleculares de amplia cobertura del genoma, en el estudio de enfermedades de etiología compleja como las fisuras orales. Los resultados de este trabajo representan un aporte al estudio de los componentes genéticos involucrados en el nivel de asimetría bilateral, su interpretación como manifestación de una menor capacidad de canalización y su interacción con genes de susceptibilidad para las fisuras orales. Un mayor conocimiento de la biología de esta patología y de los mecanismos etiopatogénicos involucrados permitiría la identificación de genes principales y su interacción con factores de exposición ambiental, con la consiguiente mejora en el asesoramiento genético a estas familias, y la posibilidad de identificar potenciales focos de campañas de prevención primaria en esta población.

Bibliografía

Acuña-González, G., Medina-Solís, C. E., Maupomé, G., Escoffie-Ramírez, M., Hernández-Romano, J., Márquez-Corona, M. de L., Islas-Márquez, A. J., & Villalobos-Rodelo, J. J. (2011). Family history and socioeconomic risk factors for non-syndromic cleft lip and palate: A matched case-control study in a less developed country. *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional De Salud*, 31(3), 381-391.

Adams, D. C., Collyer, M., Kaliontzopoulou, A., & Sherratt, E. (2017). Geomorph: Software for geometric morphometric analyses. R package version 3.0.5. <https://cran.r-project.org/package=geomorph>.

Adams, D. C., M. L. Collyer, A. Kaliontzopoulou, and E.K. Baken. (2022). Geomorph: Software for geometric morphometric analyses. R package version 4.0.4. <https://cran.r-project.org/package=geomorph>.

Adams, M. S., & Niswander, J. D. (1967). Developmental 'Noise' and a congenital malformation. *Genetics Research*, 10(3), 313-317.

Anjomshoaa, I., Briseño-Ruiz, J., Deeley, K., Poletta, F. A., Mereb, J. C., Leite, A. L., Barreta, P. A. T. M., Silva, T. L., Dizak, P., Ruff, T., Patir, A., Koruyucu, M., Abbasoğlu, Z., Casado, P. L., Brown, A., Zaky, S. H., Bayram, M., Kuchler, E. C., Cooper, M. E., Liu K., Marazita M. L., Tanboğa İ., Granjeiro J. M., Castilla E. E., Orioli I. M., Sfeir C., Owyang H., Buzalaf M. A. R., & Vieira, A. R. (2015). Aquaporin 5 Interacts with Fluoride and Possibly Protects against Caries. *PloS One*, 10(12), e0143068.

Avena, S., Via, M., Ziv, E., Pérez-Stable, E. J., Gignoux, C. R., Dejean, C., Huntsman, S., Torres-Mejía, G., Dutil, J., Matta, J. L., Beckman, K., Burchard, E. G., Parolin, M. L., Goicoechea, A., Acreche, N., Boquet, M., Ríos Part, M. D. C., Fernández, V., Rey, J., Stern M. C., Carnese R. F., & Fejerman, L. (2012). Heterogeneity in Genetic Admixture across Different Regions of Argentina. *PLoS ONE*, 7(4), e34695.

Babler, W. J. (1991). Embryologic development of epidermal ridges and their configurations. *Birth Defects Original Article Series*, 27(2), 95-112.

Bacanu, S. A., Devlin, B., & Roeder, K. (2000). The power of genomic control. *American Journal of Human Genetics*, 66(6), 1933-1944.

Badovinac, R. L., Werler, M. M., Williams, P. L., Kelsey, K. T., & Hayes, C. (2007). Folic acid-containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: A meta-analysis. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 79(1), 8-15.

Bailliet, G., Rothhammer, F., Carnese, F. R., Bravi, C. M., & Bianchi, N. O. (1994). Founder mitochondrial haplotypes in Amerindian populations. *American Journal of Human Genetics*, 55(1), 27-33. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1918234>

Balgir, R. S. (1993). Dermatoglyphics in cleft lip and cleft palate anomalies. *Indian pediatrics*, 30(3), 341-346.

Baken, E. K., Collyer, M. L., Kaliontzopoulou, A., & Adams, D. C. (2021). Geomorph v4. 0 and gmShiny: Enhanced analytics and a new graphical interface for a comprehensive morphometric experience. *Methods in Ecology and Evolution*, 12(12), 2355-2363.

Berico, P., Nogaret, M., Cigrang, M., Lallement, A., Vand-Rajabpour, F., Flores-Yanke, A., Gambi, G., Davidson, G., Seno, L., Obid, J., Vokshi, B. H., Le Gras, S., Mengus, G., Ye, T., Cordero, C. F., Dalmaso, M., Compe, E., Bertolotto, C., Hernando, E., Davidson I., & Coin, F. (2023).

Super-enhancer-driven expression of BAHCC1 promotes melanoma cell proliferation and genome stability. *Cell Reports*, 42(11), 113363.

Bille, C., Winther, J. F., Bautz, A., Murray, J. C., Olsen, J., & Christensen, K. (2005). Cancer risk in persons with oral cleft—A population-based study of 8,093 cases. *American Journal of Epidemiology*, 161(11), 1047-1055.

Boehringer, S., van der Lijn, F., Liu, F., Günther, M., Sinigerova, S., Nowak, S., Ludwig, K. U., Herberz, R., Klein, S., Hofman, A., Uitterlinden, A. G., Niessen, W. J., Breteler, M. M. B., van der Lugt, A., Würtz, R. P., Nöthen, M. M., Horsthemke, B., Wiczorek, D., Mangold, E., & Kayser, M. (2011). Genetic determination of human facial morphology: Links between cleft-lips and normal variation. *European Journal of Human Genetics*, 19(11), Article 11.

Bookstein, F. L. (1997). Morphometric Tools for Landmark Data. En *Morphometric Tools for Landmark Data*. <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/1997mtld.book.....B>

Boorman, C. J., & Shimeld, S. M. (2002). The evolution of left–right asymmetry in chordates. *BioEssays*, 24(11), 1004-1011.

Brämer, G. R. (1988). International statistical classification of diseases and related health problems. Tenth revision. *World Health Statistics Quarterly. Rapport Trimestriel De Statistiques Sanitaires Mondiales*, 41(1), 32-36.

Brito, L. A., Cruz, L. A., Rocha, K. M., Barbara, L. K., Silva, C. B. F., Bueno, D. F., Agüena, M., Bertola, D. R., Franco, D., Costa, A. M., Alonso, N., Otto, P. A., & Passos-Bueno, M. R. (2011). Genetic contribution for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NS CL/P) in different regions of Brazil and implications for association studies. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 155(7), 1581-1587.

Burdi, A. R., & Faist, K. (1967). Morphogenesis of the palate in normal human embryos with special emphasis on the mechanisms involved. *American Journal of Anatomy*, 120(1), 149-159.

Carlson, J. C., Anand, D., Butali, A., Buxo, C. J., Christensen, K., Deleyiannis, F., Hecht, J. T., Moreno, L. M., Orioli, I. M., Padilla, C., Shaffer, J. R., Vieira, A. R., Wehby, G. L., Weinberg, S. M., Murray, J. C., Beaty, T. H., Saadi, I., Lachke, S. A., Marazita, M. L., Feingold E., & Leslie, E. J. (2019). A systematic genetic analysis and visualization of phenotypic heterogeneity among orofacial cleft GWAS signals. *Genetic epidemiology*, 43(6), 704-716

Carter, C. O. (1969a). Genetics of common disorders. *British Medical Bulletin*, 25(1), 52-57.

Carter, C. O. (1969b). Polygenic inheritance and common diseases. *Lancet (London, England)*, 1(7608), 1252-1256.

Castilla, E. E., Lopez-Camelo, J. S., & Campaña, H. (1999). Altitude as a risk factor for congenital anomalies. *American journal of medical genetics*, 86(1), 9-14.

Castilla, E. E., Campaña, H., & Camelo, J. S. (2000). Economic activity and congenital anomalies: An ecologic study in Argentina. ECLAMC ECOTERAT Group. *Environmental Health Perspectives*, 108(3), 193-197.

Castilla, E. E., López-Camelo, J. S., Campaña, H., & Rittler, M. (2001). Epidemiological methods to assess the correlation between industrial contaminants and rates of congenital anomalies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 489(2-3), 123-145.

Castilla, E. E., & Orioli, I. M. (2004). ECLAMC: the Latin-American collaborative study of congenital malformations. *Public Health Genomics*, 7(2-3), 76-94.

Chang, C. C., Chow, C. C., Tellier, L. C., Vattikuti, S., Purcell, S. M., & Lee, J. J. (2015). Second-generation PLINK: Rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*, 4(1), s13742-015-0047-0048.

Chesi, A., Staahl, B. T., Jovičić, A., Couthouis, J., Fasolino, M., Raphael, A. R., Yamazaki, T., Elias, L., Polak, M., Kelly, C., Williams, K. L., Fifita, J. A., Maragakis, N. J., Nicholson, G. A., King, O. D., Reed, R., Crabtree, G. R., Blair, I. P., Glass, J. D., & Gitler, A. D. (2013). Exome sequencing to identify de novo mutations in sporadic ALS trios. *Nature Neuroscience*, 16(7), Article 7.

Collyer, M. L. and D. C. Adams. (2018). RRPP: An R package for fitting linear models to high-dimensional data using residual randomization. *Methods in Ecology and Evolution*. 9(2): 1772-1779.

Collyer, M. L. and D. C. Adams. (2021). RRPP: Linear Model Evaluation with Randomized Residuals in a Permutation Procedure. <https://cran.r-project.org/web/packages/RRPP>

Compagnucci, C., Martinus, K., Griffin, J., & Depew, M. J. (2021). Programmed Cell Death Not as Sledgehammer but as Chisel: Apoptosis in Normal and Abnormal Craniofacial Patterning and Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.

Csardi, G., & Nepusz, T. (2018). The igraph software package for complex network research. *InterJournal Complex Systems* 1695 (2006).

Cummins, H., & Midlo, C. (1961). Finger prints, palms and soles: An introduction to dermatoglyphics (Vol. 319). Dover Publications New York.

Dataset: Developing 3D Craniofacial Morphometry Data and Tools to Transform Dysmorphology | Data Browser | FaceBase. (s. f.).<https://www.facebase.org/chaise/record/#1/isa:dataset/RID=TJ0>

dbSNP - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>

DEIS: Dirección de Estadísticas e Información en Salud. Mortalidad por cáncer de pulmón. (2023). Elaborado por el SIVER-Ca en base a los registros de mortalidad de la DEIS, Ministerio de Salud de la Nación. Instituto Nacional del Cáncer (INC), Argentina. <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad-cp>

Dixon, M. J., Marazita, M. L., Beaty, T. H., & Murray, J. C. (2011). Cleft lip and palate: Understanding genetic and environmental influences. *Nature Reviews. Genetics*, 12(3), 167-178.

Dreyer, C. A., VanderVorst, K., & Carraway III, K. L. (2022). Vangl as a master scaffold for Wnt/planar cell polarity signaling in development and disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 887100.

Dunkhase, E., Ludwig, K. U., Knapp, M., Skibola, C. F., Figueiredo, J. C., Hosking, F. J., Ellinghaus, E., Landi, M. T., Ma, H., Nakagawa, H., Kim, J.-W., Han, J., Yang, P., Böhmer, A. C., Mattheisen, M., Nöthen, M. M., & Mangold, E. (2016). Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate and cancer: Evaluation of a possible common genetic background through the analysis of GWAS data. *Genomics Data*, 10, 22-29.

Ensembl Genome browser: *Homo_sapiens* <https://www.ensembl.org>

Eslami, N., Jahanbin, A., & Ezzati, A. (2013). Palm and finger print characteristics in nonfamilial cleft lip and palate patients and their parents. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 24(3), 769-772.

Falconer, D. S. *Introduction to Quantitative Genetics by D.S. Falconer: Good (1960) 1st Ed.* | Better World Books Ltd. Recuperado 30 de agosto de 2023, de <https://www.abebooks.com/first-edition/Introduction-Quantitative-Genetics-D.S-Falconer-Ronald/30596647793/bd>

Fan, H., Lu, J., Guo, Y., Li, D., Zhang, Z.-M., Tsai, Y.-H., Pi, W.-C., Ahn, J. H., Gong, W., Xiang, Y., Allison, D. F., Geng, H., He, S., Diao, Y., Chen, W.-Y., Strahl, B. D., Cai, L., Song, J., & Wang, G. G. (2020). BAHCC1 binds H3K27me3 via a conserved BAH module to mediate gene silencing and oncogenesis. *Nature Genetics*, 52(12), 1384-1396.

Farrall, M., & Holder, S. (1992). Familial recurrence-pattern analysis of cleft lip with or without cleft palate. *American Journal of Human Genetics*, 50(2), 270-277.

Figueiredo, J. C., Ly, S., Magee, K. S., Ihenacho, U., Baurley, J. W., Sanchez-Lara, P. A., Brindopke, F., Nguyen, T.-H.-D., Nguyen, V., Tangco, M. I., Giron, M., Abrahams, T., Jang, G., Vu, A., Zolfaghari, E., Yao, C. A., Foong, A., DeClerk, Y. A., Samet, J. M., & Magee, W. (2015). Parental risk factors for oral clefts among Central Africans, Southeast Asians, and Central Americans. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 103(10), 863-879.

Fogh-Andersen, P., & Aagesen, E. (1942). *Inheritance of Harelip and Cleft Palate: Contribution to the Elucidation of the Etiology of the Congenital Clefts of the Face*. Nyt nordisk forlag, A. Busck.

Fonseca, R. F., de Carvalho, F. M., Poletta, F. A., Montaner, D., Dopazo, J., Mereb, J. C., Moreira, M. A. M., Seuanez, H. N., Vieira, A. R., Castilla, E. E., & Orioli, I. M. (2015). Family-based genome-wide association study in Patagonia confirms the association of the DMD locus and cleft lip and palate. *European Journal of Oral Sciences*, 123(5), 381-384.

Fraser, F. C. (1970). The genetics of cleft lip and cleft palate. *American Journal of Human Genetics*, 22(3), 336-352.

Galton, F. (1892). Finger prints. *Cosimo Classics*.

Garland, M. A., Reynolds, K., & Zhou, C. J. (2020). Environmental mechanisms of orofacial clefts. *Birth Defects Research*, 112(19), 1660-1698.

Gauderman, W. J., & Morrison, J. M. (2009). QUANTO 1.1: A computer program for power and sample size calculations for genetic-epidemiology studies [article online], 2006.

Gili, J. A., Poletta, F. A., Pawluk, M., Gimenez, L. G., Campaña, H., Castilla, E., & López-Camelo, J. S. (2015). High Birth Prevalence Rates for Congenital Anomalies in South American Regions. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 26(5), e53-55.

Gili, J. A., Poletta, F. A., Giménez, L. G., Pawluk, M. S., Campaña, H., Castilla, E. E., & López-Camelo, J. S. (2016). Descriptive analysis of high birth prevalence rate geographical clusters of congenital anomalies in South America. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 106(4), 257-266.

Graham, J. H., & Özener, B. (2016). Fluctuating Asymmetry of Human Populations: A Review. *Symmetry*, 8(12), Article 12.

Grande, C., & Patel, N. H. (2009). Nodal signalling is involved in left-right asymmetry in snails. *Nature*, 457(7232), Article 7232.

Grimes, D. T., & Burdine, R. D. (2017). Left-right patterning: Breaking symmetry to asymmetric morphogenesis. *Trends in genetics : TIG*, 33(9), 616-628.

Gritli-Linde, A. (2007). Molecular control of secondary palate development. *Developmental Biology*, 301(2), 309-326.

Grosen, D., Chevrier, C., Skytthe, A., Bille, C., Mølsted, K., Sivertsen, A., Murray, J. C., & Christensen, K. (2010). A cohort study of recurrence patterns among more than 54,000 relatives of oral cleft cases in Denmark: Support for the multifactorial threshold model of inheritance. *Journal of Medical Genetics*, 47(3), 162-168.

Gundlach, K. K. H., & Maus, C. (2006). Epidemiological studies on the frequency of clefts in Europe and world-wide. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 34, 1-2.

Hallgrímsson, W. Mio., Richard A. Spritz, Ophir Klein. (2017). Developing 3D Craniofacial Morphometry Data and Tools to Transform Dysmorphology. *FaceBase Consortium*.

Hamel, V., Steib, E., Hamelin, R., Armand, F., Borgers, S., Flückiger, I., Busso, C., Olieric, N., Sorzano, C. O. S., Steinmetz, M. O., Guichard, P., & Gönczy, P. (2017). Identification of Chlamydomonas Central Core Centriolar Proteins Reveals a Role for Human WDR90 in Ciliogenesis. *Current Biology*, 27(16), 2486-2498.e6.

Hammond, N. L., & Dixon, M. J. (2022). Revisiting the embryogenesis of lip and palate development. *Oral Diseases*, 28(5), 1306-1326.

Harnádková, K., Kočandrlová, K., Jaklová, L. K., Dupej, J., & Velemínská, J. (2023). The effect of sex and age on facial shape directional asymmetry in adults: A 3D landmarks-based method study. *PLOS ONE*, 18(8), e0288702.

Harville, E. W., Wilcox, A. J., Lie, R. T., Vindenes, H., & Abyholm, F. (2005). Cleft lip and palate versus cleft lip only: Are they distinct defects? *American Journal of Epidemiology*, 162(5), 448-453.

Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N.-H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271-280.e8.

Howe, L. J., Lee, M. K., Sharp, G. C., Davey Smith, G., St Pourcain, B., Shaffer, J. R., Ludwig, K. U., Mangold, E., Marazita, M. L., Feingold, E., Zhurov, A., Stergiakouli, E., Sandy, J., Richmond, S., Weinberg, S. M., Hemani, G., & Lewis, S. J. (2018). Investigating the shared genetics of non-syndromic cleft lip/palate and facial morphology. *PLoS Genetics*, 14(8), e1007501.

Huang, L., Jia, Z., Shi, Y., Du, Q., Shi, J., Wang, Z., Mou, Y., Wang, Q., Zhang, B., Wang, Q., Ma, S., Lin, H., Duan, S., Yin, B., Lin, Y., Wang, Y., Jiang, D., Hao, F., Zhang, L., Wang H., Jiang S., Xu H., Yang C., Li C., Li J., Shi B., & Yang, Z. (2019). Genetic factors define CPO and CLO subtypes of non syndromic orofacial cleft. *PLOS Genetics*, 15(10), e1008357

Hubbard, T., Barker, D., Birney, E., Cameron, G., Chen, Y., Clark, L., Cox, T., Cuff, J., Curwen, V., Down, T., Durbin, R., Eyra, E., Gilbert, J., Hammond, M., Huminiecki, L., Kasprzyk, A., Lehtsalaiho, H., Lijnzaad, P., Melsopp, C., Mongin, E., Pettett R., Pocock M., Potter S., Rust A., Schmidt E., Searle S., Slater G., Smith J., Spooner W., Stabenau A., Stalker J., Stupka E., Ureta-Vidal A., Vastrik I., & Clamp, M. (2002). The Ensembl genome database project. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 38-41.

Indencleef, K., Roosenboom, J., Hoskens, H., White, J. D., Shriver, M. D., Richmond, S., Peeters, H., Feingold, E., Marazita, M. L., Shaffer, J. R., Weinberg, S. M., Hens, G., & Claes, P. (2018). Six NSCL/P Loci Show Associations With Normal-Range Craniofacial Variation. *Frontiers in Genetics*, 9, 502.

Indencleef, K., Hoskens, H., Lee, M. K., White, J. D., Liu, C., Eller, R. J., Naqvi, S., Wehby, G. L., Moreno Uribe, L. M., Hecht, J. T., Long, R. E., Christensen, K., Deleyiannis, F. W., Walsh, S., Shriver, M. D., Richmond, S., Wysocka, J., Peeters, H., Shaffer, J. R., Marazita, M. L., Hens G., Weinberg S. M., & Claes, P. (2021). The Intersection of the Genetic Architectures of Orofacial Clefts and Normal Facial Variation. *Frontiers in Genetics*, 12, 626403.

Jahanbin, A., Mahdavishahri, N., Naseri, M. M., Sardari, Y., & Rezaian, S. (2010). Dermatoglyphic analysis in parents with nonfamilial bilateral cleft lip and palate children. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal: Official Publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association*, 47(1), 9-14.

- Jamilian, A., Sarkarat, F., Jafari, M., Neshandar, M., Amini, E., Khosravi, S., & Ghassemi, A. (2017). Family history and risk factors for cleft lip and palate patients and their associated anomalies. *Stomatologija*, 19(3), 78-83.
- Jantz, R. L., & Webb, R. S. (1980). Dermatoglyphic asymmetry as a measure of canalization. *Annals of Human Biology*, 7(5), 489-493.
- Ji, Y., Garland, M. A., Sun, B., Zhang, S., Reynolds, K., McMahon, M., Rajakumar, R., Islam, M. S., Liu, Y., Chen, Y., & Zhou, C. J. (2020). Cellular and developmental basis of orofacial clefts. *Birth defects research*, 112(19), 1558-1587.
- Jiang, R., Bush, J. O., & Lidral, A. C. (2006). Development of the upper lip: Morphogenetic and molecular mechanisms. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 235(5), 1152-1166.
- Khoury, M., Beaty, T., & Cohen, B. (1993). Epidemiological Approaches to Familial Aggregations. En *Fundamentals of genetics epidemiology*. (pp. 164-167). In: Press, OU., editor.
- Klingenberg, C. P., & McIntyre, G. S. (1998). Geometric morphometrics of developmental instability: Analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution*, 52(5), 1363-1375.
- Klingenberg, C. P., Barluenga, M., & Meyer, A. (2002). Shape Analysis of Symmetric Structures: Quantifying Variation Among Individuals and Asymmetry. *Evolution*, 56(10), 1909-1920.
- Kopan, R., & Ilagan, Ma. X. G. (2009). The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell*, 137(2), 216-233.
- Lazić, M. M., Carretero, M. A., Crnobrnja-Isailović, J., & Kaliontzopoulou, A. (2015). Effects of environmental disturbance on phenotypic variation: An integrated assessment of canalization, developmental stability, modularity, and allometry in lizard head shape. *The American Naturalist*, 185(1), 44-58.
- Leite, B. D. G. L., Queiroz, I. N., Aquino, S. N. de, Machado, R. A., Paranaíba, L. M. R., Martelli, D. R. B., Swerts, M. S. O., & Martelli-Júnior, H. (2015). Evaluating fluctuating asymmetry in a Brazilian population with non-syndromic cleft lip and/or palate. *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery*, 49(5), 289-294.
- Lejarraga, H. (2021). Diferencias de sexo en la canalización del crecimiento y del desarrollo infantil: un ejemplo de regulación genética. *Arch. Argent. Pediatr*, 119(5), e473-e479.
- Leslie, E. J., & Marazita, M. L. (2013). Genetics of cleft lip and cleft palate. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, 163C(4), 246-258.
- Leslie, E. J., Carlson, J. C., Shaffer, J. R., Feingold, E., Wehby, G., Laurie, C. A., Jain, D., Laurie, C. C., Doheny, K. F., McHenry, T., Resick, J., Sanchez, C., Jacobs, J., Emanuele, B., Vieira, A. R., Neiswanger, K., Lidral, A. C., Valencia-Ramirez, L. C., Lopez-Palacio, A. M., Valencia DR, Arcos-Burgos M, Czeizel AE, Field LL, Padilla CD, Cutiongco-de la Paz EM, Deleyiannis F, Christensen K, Munger RG, Lie RT, Wilcox A, Romitti PA, Castilla EE, Mereb JC, Poletta FA, Orioli IM, Carvalho FM, Hecht JT, Blanton SH, Buxó CJ, Butali A, Mossey PA, Adeyemo WL, James O, Braimah RO, Aregbesola BS, Eshete MA, Abate F, Koruyucu M, Seymen F, Ma L, de Salamanca JE, Weinberg SM, Moreno L, Murray JC, Marazita, M. L. (2016). A multi-ethnic genome-wide association study identifies novel loci for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate on 2p24.2, 17q23 and 19q13. *Human Molecular Genetics*, 25(13), 2862-2872.
- Leslie, E. J., Carlson, J. C., Shaffer, J. R., Butali, A., Buxó, C. J., Castilla, E. E., Christensen, K., Deleyiannis, F. W. B., Leigh Field, L., Hecht, J. T., Moreno, L., Orioli, I. M., Padilla, C., Vieira, A. R., Wehby, G. L., Feingold, E., Weinberg, S. M., Murray, J. C., Beaty, T. H., & Marazita, M. L. (2017). Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic orofacial clefts identify novel associations between

FOXE1 and all orofacial clefts, and TP63 and cleft lip with or without cleft palate. *Human Genetics*, 136(3), 275-286.

Letra, A., Menezes, R., Granjeiro, J. M., & Vieira, A. R. (2009). AXIN2 and CDH1 Polymorphisms, Tooth Agenesis and Oral Clefts. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology*, 85(2), 169-173.

Letra, A., Bjork, B., Cooper, M. E., Szabo-Rogers, H., Deleyiannis, F. W. B., Field, L. L., Czeizel, A. E., Ma, L., Garlet, G. P., Poletta, F. A., Mereb, J. C., Lopez-Camelo, J. S., Castilla, E. E., Orioli, I. M., Wendell, S., Blanton, S. H., Liu, K., Hecht, J. T., Marazita, M. L., Vieira A. R., & Silva, R. M. (2012). Association of AXIN2 with Non-syndromic Oral Clefts in Multiple Populations. *Journal of Dental Research*, 91(5), 473-478.

Li, A., Li, Y., Li, Y., Zhang, M., Zhang, H., & Chen, F. (2023). Identification and validation of key genes associated with pathogenesis and prognosis of gastric cancer. *PeerJ*, 11, e16243.

Li, B., Ma, L., Zhang, C., Zhou, Z., Yuan, H., Jiang, H., Pan, Y., & Tan, Q. (2018). Associations of genetic variants in endocytic trafficking of epidermal growth factor receptor super pathway with risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 6(6), 1157-1167.

Little, J., Cardy, A., & Munger, R. G. (2004). Tobacco smoking and oral clefts: A meta-analysis. *Bulletin of the World Health Organization*, 82(3), 213-218.

Liu, F., Van Der Lijn, F., Schurmann, C., Zhu, G., Chakravarty, M. M., Hysi, P. G., Wollstein, A., Lao, O., De Bruijne, M., Ikram, M. A., Van Der Lugt, A., Rivadeneira, F., Uitterlinden, A. G., Hofman, A., Niessen, W. J., Homuth, G., De Zubicaray, G., McMahon, K. L., Thompson, P. M., Daboul A., Puls R., Hegenscheid K., Bevan L., Pausova Z., Medlan S. E., Montgomery G. W., Wright M. J., Wicking C., Boehringer S., Spector T. D., Paus T., Martin N. G., Biffar R., & Kayser, M. (2012). A Genome-Wide Association Study Identifies Five Loci Influencing Facial Morphology in Europeans. *PLoS Genetics*, 8(9), e1002932.

Liu, S., Chen, M., Yang, H., Chen, S., Wang, L., Duan, L., Zhu, H., & Pan, H. (2021). Clinical Characteristics and Long-Term Recombinant Human Growth Hormone Treatment of 18q- Syndrome: A Case Report and Literature Review. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 776835.

Lopez-Camelo, J. S., & Orioli, I. M. (1996). Heterogeneous rates for birth defects in Latin America: Hints on causality. *Genetic epidemiology*, 13(5), 469-481.

Lübbers, H.-T., Medinger, L., Kruse, A., Grätz, K. W., & Matthews, F. (2010). Precision and accuracy of the 3dMD photogrammetric system in craniomaxillofacial application. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 21(3), 763-767.

Ludwig, K. U., Mangold, E., Herms, S., Nowak, S., Reutter, H., Paul, A., Becker J., Herberz R., AlChawa T., Nasser E., Böhmer A. C., Mattheisen M., Alblas M. A., Barth S., Kluck N., Lauster C., Braumann B., Reich R. H., Hemprich A., Pötzsch S., Blaumeiser B., Daratsianos N., Kreusch T., Murray J. C., Marazita M. L., Ruczinski I., Scott A. F., Beauty T. H., Kramer F.-J., Wienker T. F., Steegers-Theunissen R. P., Mossey P. A., Hoffmann P., Lange C., Cichon S., Propping Peter., Knapp M., & Nöthen, M. M. (2012). Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci. *Nature genetics*, 44(9), 968-971.

Ludwig, K. U., Böhmer, A. C., Bowes, J., Nikolić, M., Ishorst, N., Wyatt, N., Hammond N. L., Gözl L., Thieme F., Barth S., Schuenke H., Klamt J., Spielmann M., Aldhorae K., Rojas-Martínez A., Nöthen M. M., Rada-Iglesias A., Dixon M. J., Knapp M., & Mangold, E. (2017). Imputation of orofacial clefting data identifies novel risk loci and sheds light on the genetic background of cleft lip±cleft palate and cleft palate only. *Human molecular genetics*, 26(4), 829-842

Marazita, M. L., Spence, M. A., & Melnick, M. (1986). Major gene determination of liability to cleft lip with or without cleft palate: A multiracial view. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology. Supplement*, 2, 89-97.

Marazita, M. L., Field, L. L., Cooper, M. E., Tobias, R., Maher, B. S., Peanchitlertkajorn, S., & Liu, Y. (2002). Genome Scan for Loci Involved in Cleft Lip With or Without Cleft Palate, in Chinese Multiplex Families. *American Journal of Human Genetics*, 71(2), 349-364.

Marazita, M. L. (2012). The evolution of human genetic studies of cleft lip and cleft palate. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 13, 263-283.

Mary L. Marazita, Z. Raffensperger., Seth Weinberg. (2017). 3D Facial Norms Database. *FaceBase Consortium*. <https://doi.org/10.25550/1WWP>

Martin FJ, Amode MR, Aneja A, Austine-Orimoloye O, Azov AG, Barnes I, Becker A, Bennett R, Berry A, Bhai J, Bhurji SK, Bignell A, Boddu S, Branco Lins PR, Brooks L, Ramaraju SB, Charkhchi M, Cockburn A, Da Rin Fiorretto L, Davidson C, Dodiya K, Donaldson S, El Houdaigui B, El Naboulsi T, Fatima R, Giron CG, Genez T, Ghattaoraya GS, Martinez JG, Guijarro C, Hardy M, Hollis Z, Hourlier T, Hunt T, Kay M, Kaykala V, Le T, Lemos D, Marques-Coelho D, Marugán JC, Merino GA, Mirabueno LP, Mushtaq A, Hossain SN, Ogeh DN, Sakthivel MP, Parker A, Perry M, Piližota I, Prosovetskaia I, Pérez-Silva JG, Salam AIA, Saraiva-Agostinho N, Schuilenburg H, Sheppard D, Sinha S, Sipos B, Stark W, Steed E, Sukumaran R, Sumathipala D, Suner MM, Surapaneni L, Sutinen K, Szpak M, Tricomi FF, Urbina-Gómez D, Veidenberg A, Walsh TA, Walts B, Wass E, Willhoft N, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Chakiachvili M, Flint B, Giorgetti S, Haggerty L, Ilsley GR, Loveland JE, Moore B, Mudge JM, Tate J, Thybert D, Trevanion SJ, Winterbottom A, Frankish A, Hunt SE, Ruffier M, Cunningham F, Dyer S, Finn RD, Howe KL, Harrison PW, Yates AD, Flicek P. Ensembl 2023. *Nucleic Acids Res.* 2023 Jan 6;51(D1):D933-D941.

McIntyre, G. T., & Mossey, P. A. (2002). Asymmetry of the parental craniofacial skeleton in orofacial clefting. *Journal of Orthodontics*, 29(4), 299-305; discussion 278-279.

McIntyre, G. T., & Mossey, P. A. (2010). Asymmetry of the craniofacial skeleton in the parents of children with a cleft lip, with or without a cleft palate, or an isolated cleft palate. *European Journal of Orthodontics*, 32(2), 177-185.

McKusick, V. A. (2007). Mendelian Inheritance in Man and Its Online Version, OMIM. *The American Journal of Human Genetics*, 80(4), 588-604.

Menezes, R., Marazita, M. L., McHenry, T. G., Cooper, M. E., Bardi, K., Brandon, C., Letra, A., Martin, R. A., & Vieira, A. R. (2009). AXIN2, Orofacial Clefts and Positive Family History for Cancer. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 140(1), 80-84.

Micle, S., & Kobylansky, E. (1986). Dermatoglyphic sexual dimorphism in Israelis: Principal components and discriminant analyses applied to quantitative traits. *Human biology*, 485-498.

Miller, S. F., Weinberg, S. M., Nidey, N. L., Defay, D. K., Marazita, M. L., Wehby, G. L., & Moreno Uribe, L. M. (2014). Exploratory genotype-phenotype correlations of facial form and asymmetry in unaffected relatives of children with non-syndromic cleft lip and/or palate. *Journal of Anatomy*, 224(6), 688-709.

Mitchell LE, Risch N. (1992). Mode of inheritance of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a reanalysis. *Am J Hum Genet*, 51(2):323-32.

Mitchell LE, Risch N. (1993). Correlates of genetic risk for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Clin Genet*, 43, 255-60

Mitchell, L. E., & Christensen, K. (1996). Analysis of the recurrence patterns for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the families of 3,073 Danish probands. *American Journal of Medical Genetics*, 61(4), 371-376.

- Mossey, P. & Castilla E. (2001). Global registry and database on craniofacial anomalies: report of a WHO Registry Meeting on Craniofacial Anomalies. In: Main Editors: Mossey, P. C., EE, ed.,. World Health Organization, Geneva
- Mossey, P., & Little, J. (2002). Epidemiology of oral clefts: An international perspective. En *Cleft lip and palate: From origins to treatment*. (In: Wyszynski DF, ed. New York: Oxford University Press).
- Mossey, P. A., Little, J., Munger, R. G., Dixon, M. J., & Shaw, W. C. (2009). Cleft lip and palate. *Lancet (London, England)*, 374(9703), 1773-1785.
- Mossey, P. A., & Modell, B. (2012). Epidemiology of oral clefts 2012: An international perspective. *Frontiers of Oral Biology*, 16, 1-18.
- Munger, R. G., Sauberlich, H. E., Corcoran, C., Nepomuceno, B., Daack-Hirsch, S., & Solon, F. S. (2004). Maternal vitamin B-6 and folate status and risk of oral cleft birth defects in the Philippines. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 70(7), 464-471.
- Naugler, C. T., & Ludman, M. D. (1996). Fluctuating asymmetry and disorders of developmental origin. *American Journal of Medical Genetics*, 66(1), 15-20.
- Neiswanger, K., Cooper, M. E., Weinberg, S. M., Flodman, P., Keglovits, A. B., Liu, Y., Hu, D. N., Melnick, M., Spence, M. A., & Marazita, M. L. (2002). Cleft lip with or without cleft palate and dermatoglyphic asymmetry: Evaluation of a Chinese population. *Orthodontics & Craniofacial Research*, 5(3), 140-146.
- Neiswanger, K., Cooper, M. E., Liu, Y.-E., Hu, D.-N., Melnick, M., Weinberg, S. M., & Marazita, M. L. (2005). Bilateral asymmetry in Chinese families with cleft lip with or without cleft palate. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal: Official Publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association*, 42(2), 192-196.
- Neiswanger, K., Mukhopadhyay, N., Rajagopalan, S., Leslie, E. J., Sanchez, C. A., Hecht, J. T., Orioli, I. M., Poletta, F. A., de Salamanca, J. E., Weinberg, S. M., & Marazita, M. L. (2020). Individuals with nonsyndromic orofacial clefts have increased asymmetry of fingerprint patterns. *PloS One*, 15(3), e0230534.
- Neubauer, S., Gunz, P., Scott, N. A., Hublin, J. J., & Mitteroecker, P. (2020). Evolution of brain lateralization: A shared hominid pattern of endocranial asymmetry is much more variable in humans than in great apes. *Science Advances*, 6(7), eaax9935
- Oliveira Dias, V., Reis Barbosa Martelli, D., Santos, M. L., Fernandes Maia, C. M., Soares de Andrade, R., Coletta, R. D., & Martelli Júnior, H. (2020). Nonsyndromic Oral Cleft in First-Degree Relatives of Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Dentistry Journal*, 8(1), 23.
- OMIM. 2024. Online Mendelian Inheritance in Man. McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD) [Online]. Disponible en: <https://www.omim.org/> [Acceso 2024].
- Ozaki, M., Glasgow, A., Oglesby, I. K., Ng, W. L., Kelly, S., Greene, C. M., Durcan, L., & Hurley, K. (2022). Sexual Dimorphism in Interstitial Lung Disease. *Biomedicines*, 10(12), 3030.
- Palmer, A. R., & Strobeck, C. (1986). Fluctuating Asymmetry: Measurement, Analysis, Patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 17, 391-421.
- Palmieri, A., Avantaggiato, A., Arlotti, G., Scapoli, L., Martinelli, M., Pezzetti, F., & Carinci, F. (2008). Drugs and nonsyndromic orofacial cleft: An update. *Brazilian Journal of Oral Sciences (ISSN: 1677-3217) Vol 7 Num 24*, 7.

- Palomino, H., Guzmán, E., & Blanco, R. (2000). Familial recurrence of non syndromic cleft lip with or without cleft palate in Chilean populations. *Revista Medica De Chile*, 128(3), 286-293.
- Pawluk, M. S., Campaña, H., Rittler, M., Poletta, F. A., Cosentino, V. R., Gili, J. A., Gimenez, L. G., & López Camelo, J. S. (2018). Individual deprivation, regional deprivation, and risk for oral clefts in Argentina. *Revista Panamericana De Salud Publica = Pan American Journal of Public Health*, 41, e110.
- Penrose, L. S., & Ohara, P. T. (1973). The development of the epidermal ridges. *Journal of Medical Genetics*, 10(3), 201-208. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1013024/>
- Poletta, F. A., Castilla, E. E., Orioli, I. M., & Lopez-Camelo, J. S. (2007). Regional analysis on the occurrence of oral clefts in South America. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 143A(24), 3216-3227.
- Poletta, F. A. (2010). *Epidemiología Genética de Fisuras Orales en Sudamérica: Estudio de Patagonia como Área Endémica*. [Tesis Doctoral]. FMED, Universidad de Buenos Aires.
- Poletta, FA., Castilla, EE., Orioli I.M., Mereb J.C., Carvalho F.M., Brandon C.A., Resick, J.M., Vieira, A.R. Marazita, M.L., Lopez- Camelo, JS. (2011). Segregation Analysis of Isolated Cleft Lip: uncommon high-risk allele and implications for genetic association studies. 12th International Congress of Human Genetics / 61st Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. October 11-15, 2011. Montreal, Canada. (Abstract #635T - page 419 en: <http://www.ichg2011.org/pdf/ICHG%20Poster%20Abstracts.pdf>)
- Poletta FA, Gili JA, Castilla EE. (2014) Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations (ECLAMC): a model for health collaborative studies. *Public Health Genomics* 17(2):61-7.
- Popoff, D. A. V., Coelho, M. P., Martelli, D. R. B., Saini, R., Della Coletta, R., & Martelli-Júnior, H. (2013). Non-syndromic oral clefts and risk of cancer: A systematic review. *Dentistry 3000*, 1(1), 12-18.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I. W., Daly, M. J., & Sham, P. C. (2007). PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81(3), 559-575.
- Pusapaz, D. E. P., Terranova, M. C. A., & Terranova, D. A. (2021). Genética de las fisuras labiopalatinas: una visión general de los factores de riesgo genéticos y ambientales. *Revista Med*, 29(2), Article 2.
- R Core Team 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. R version 4.2.3 (2023-03-15)
- Raya, Á., Kawakami, Y., Rodríguez-Esteban, C., Ibañes, M., Rasskin-Gutman, D., Rodríguez-León, J., Büscher, D., Feijó, J. A., & Izpisua Belmonte, J. C. (2004). Notch activity acts as a sensor for extracellular calcium during vertebrate left-right determination. *Nature*, 427(6970), 121-128.
- Reynolds, K., Kumari, P., Sepulveda Rincon, L., Gu, R., Ji, Y., Kumar, S., & Zhou, C. J. (2019). Wnt signaling in orofacial clefts: Crosstalk, pathogenesis and models. *Disease Models & Mechanisms*, 12(2), dmm037051
- Reynolds, K., Zhang, S., Sun, B., Garland, M. A., Ji, Y., & Zhou, C. J. (2020). Genetics and signaling mechanisms of orofacial clefts. *Birth defects research*, 112(19), 1588-1634.
- Rolfe, S., Lee, S.-I., & Shapiro, L. (2018). Associations Between Genetic Data and Quantitative Assessment of Normal Facial Asymmetry. *Frontiers in Genetics*, 9.

RStudio Team., (2020). Versión 2023.03.0+386 RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

Samuels, B. D., Aho, R., Brinkley, J. F., Bugacov, A., Feingold, E., Fisher, S., Gonzalez-Reiche, A. S., Hacia, J. G., Hallgrimsson, B., Hansen, K., Harris, M. P., Ho, T.-V., Holmes, G., Hooper, J. E., Jabs, E. W., Jones, K. L., Kesselman, C., Klein, O. D., Leslie, E. J., Li H., Liao E. C., Long H., Lu N., Maas R. L., Marazita M. L., Mohammed J., Prescott S., Schuler R., Selleri L., Spritz R. A., Swigut T., van Bakel H., Visel A., Welsh I., Williams C., Williams T. J., Wysocka J., Yuan Y., & Chai, Y. (2020). FaceBase 3: Analytical tools and FAIR resources for craniofacial and dental research. *Development (Cambridge, England)*, 147(18), dev191213.

Santos, M. R., Campaña, H., Jurado Medina, L. S., Sala, C., Muzzio, M., Lopez-Camelo, J. S., & Bailliet, G. (2018). NAT2 and oral clefts: Evaluation of genetic risk and the relative importance of embryo and maternal genotypes. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 21(1)

Sarkar, S., Petiot, A., Copp, A., Ferretti, P., & Thorogood, P. (2001). FGF2 promotes skeletogenic differentiation of cranial neural crest cells. *Development (Cambridge, England)*, 128(11), 2143–2152.

Scutari, M. (2014). Bayesian network constraint-based structure learning algorithms: Parallel and optimised implementations in the bnlearn R package. *arXiv preprint arXiv:1406.7648*.

Sherry, S. T., Ward, M., & Sirotkin, K. (1999). dbSNP-database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome Research*, 9(8), 677-679.

Sivertsen, A., Wilcox, A. J., Skjaerven, R., Vindenes, H. A., Abyholm, F., Harville, E., & Lie, R. T. (2008). Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: Population based cohort study of first degree relatives. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 336(7641), 432-434.

Slavec, L., Karas Kuželički, N., Locatelli, I., & Geršak, K. (2022). Genetic markers for non-syndromic orofacial clefts in populations of European ancestry: A meta-analysis. *Scientific Reports*, 12(1), Article 1.

Sperber, G. H. (2002). Formation of the primary palate. In: Wyszynski, D. F. (ed.) Cleft lip and palate: from origin to treatment. New York: Oxford University Press, Inc.

Spielman, R. S., McGinnis, R. E., & Ewens, W. J. (1993). Transmission test for linkage disequilibrium: The insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *American Journal of Human Genetics*, 52(3), 506-516.

Steiß, V., Letschert, T., Schäfer, H., & Pahl, R. (2012). PERMORY-MPI: A program for high-speed parallel permutation testing in genome-wide association studies. *Bioinformatics*, 28(8), 1168-1169.

Taioli, E., Ragin, C., Robertson, L., Linkov, F., Thurman, N. E., & Vieira, A. R. (2010). Cleft Lip and Palate in Family Members of Cancer Survivors. *Cancer investigation*, 28(9), 958-962.

The UniProt Consortium. (2023). UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523-D531.

Toro Ibacache, M. V., Manriquez Soto, G., & Suazo Galdames, I. (2010). Morfometría Geométrica y el Estudio de las Formas Biológicas: De la Morfología Descriptiva a la Morfología Cuantitativa. *International Journal of Morphology*, 28(4), 977-990.

Turner, S. D. (2018). qqman: An R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. *Journal of Open Source Software*, 3(25), 731.

UCSC Genome Browser: Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Res.*;12(6):996-1006. <http://genome.ucsc.edu>.

van Rooij, I. A., Ludwig, K. U., Welzenbach, J., Ishorst, N., Thonissen, M., Galesloot, T. E., Ongkosuwito, E., Bergé, S. J., Aldhorae, K., Rojas-Martinez, A., Kiemeneij, L. A., Vermeesch, J. R., Brunner, H., Roeleveld, N., Devriendt, K., Dormaar, T., Hens, G., Knapp, M., Carels, C., & Mangold, E. (2019). Non-Syndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate: Genome-Wide Association Study in Europeans Identifies a Suggestive Risk Locus at 16p12.1 and Supports SH3PXD2A as a Clefing Susceptibility Gene. *Genes*, 10(12), Article 12.

Van Valen, L. (1962). A Study of Fluctuating Asymmetry. *Evolution*, 16(2), 125-142.

Vanderas, A. P. (1987). Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: A review. *The Cleft Palate Journal*, 24(3), 216-225.

Ventura, J. (2023). La asimetría bilateral como indicador de inestabilidad del desarrollo. *Encuentros en la Biología*, ISSN 1134-8496, N°. 93, 2004.

Vieira, A. R., Karras, J. C., Orioli, I. M., Castilla, E. E., & Murray, J. C. (2002). Genetic origins in a South American clefting population. *Clinical Genetics*, 62(6), 458-463.

Vieira, A. R., McHenry, T. G., Daack-Hirsch, S., Murray, J. C., & Marazita, M. L. (2008). A Genome Wide Linkage Scan for Cleft Lip and Palate and Dental Anomalies. *American journal of medical genetics. Part A*, 146A(11), 1406-1413.

Vieira, A. R. (2012). Genetic and environmental factors in human cleft lip and palate. *Frontiers of Oral Biology*, 16, 19-31.

Vieira-Machado, C. D., de Carvalho, F. M., Santana da Silva, L. C., Dos Santos, S. E., Martins, C., Poletta, F. A., Mereb, J. C., Vieira, A. R., Castilla, E. E., & Orioli, I. M. (2016). Analysis of the genetic ancestry of patients with oral clefts from South American admixed populations. *European Journal of Oral Sciences*, 124(4), 406-411.

Vieira, A. R., & Dattilo, S. (2018). Oxygen, Left/Right Asymmetry, and Cleft Lip and Palate. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 29(2), 396-399.

Vijay, S., Chiu, M., Dacks, J. B., & Roberts, R. C. (2016). Exclusive expression of the Rab11 effector SH3TC2 in Schwann cells links integrin- $\alpha 6$ and myelin maintenance to Charcot-Marie-Tooth disease type 4C. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1862(7), 1279-1290.

Waddington, C. H. (1959). Evolutionary Systems—Animal and Human. *Nature*, 183(4676), Article 4676.

Wang, J., Zhu, S., Meng, N., He, Y., Lu, R., & Yan, G.-R. (2019). ncRNA-Encoded Peptides or Proteins and Cancer. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 27(10), 1718-1725.

Wehby, G., & Cassell, C. H. (2010). The Impact of Orofacial Clefts on Quality of Life and Health Care Use and Costs. *Oral diseases*, 16(1), 3-10.

Weinberg, S. M., Neiswanger, K., Martin, R. A., Mooney, M. P., Kane, A. A., Wenger, S. L., Losee, J., Deleyiannis, F., Ma, L., De Salamanca, J. E., Czeizel, A. E., & Marazita, M. L. (2006). The Pittsburgh Oral-Facial Cleft study: Expanding the cleft phenotype. Background and justification. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal: Official Publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association*, 43(1), 7-20.

Weinberg, S. M., Andreasen, N. C., & Nopoulos, P. (2009). Three-dimensional morphometric analysis of brain shape in nonsyndromic orofacial clefting. *Journal of Anatomy*, 214(6), 926-936.

Weinberg, S. M., Naidoo, S. D., Bardi, K. M., Brandon, C. A., Neiswanger, K., Resick, J. M., Martin, R. A., & Marazita, M. L. (2009). Face shape of unaffected parents with cleft affected offspring:

Combining three-dimensional surface imaging and geometric morphometrics. *Orthodontics & Craniofacial Research*, 12(4), 271-281.

Weinberg, S. M. (2022). What's Shape Got to Do With It? Examining the Relationship Between Facial Shape and Orofacial Clefting. *Frontiers in Genetics*, 13, 891502.

Wiley, D. F., Amenta, N., Alcantara, D. A., Ghosh, D., Kil, Y. J., Delson, E., ... & Hamann, B. (2005). *Evolutionary morphing* (pp. 431-438). IEEE.

Wigginton, J. E., Cutler, D. J., & Abecasis, G. R. (2005). A Note on Exact Tests of Hardy-Weinberg Equilibrium. *American Journal of Human Genetics*, 76(5), 887-893.

Woolf, C. M., & Gianas, A. D. (1976). Congenital cleft lip and fluctuating dermatoglyphic asymmetry. *American Journal of Human Genetics*, 28(4), 400-403.

Woolf, C. M., & Gianas, A. D. (1977). A study of fluctuating dermatoglyphic asymmetry in the sibs and parents of cleft lip propositi. *American Journal of Human Genetics*, 29(5), 503-507.

Yoon, Y.-J., Perkiomaki, M. R., Tallents, R. H., Barillas, I., Herrera-Guido, R., Fong, C.-T., & Kyrkanides, S. (2003). Association of nasomaxillary asymmetry in children with unilateral cleft lip and palate and their parents. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal: Official Publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association*, 40(5), 493-497.

Yu Y., Zuo X., He M., Gao J., Fu Y., Qin C., Meng L., Wang W, Song Y., Cheng Y., Zhou F., Chen G., Zheng X., Wang X., Liang B., Zhu Z., Fu X., Sheng Y., Hao J., Liu Z., Yan H., Mangold E., Ruczinski I., Liu J., Marazita ML., Ludwig KU., Beaty TH, Zhang X., Sun L., & Bian Z. (2017). Genome-wide analyses of non-syndromic cleft lip with palate identify 14 novel loci and genetic heterogeneity. *Nature Communications*, 8, 14364.

Yuan, S., Liu, Q., Hu, Z., Zhou, Z., Wang, G., Li, C., Xie, W., Meng, G., Xiang, Y., Wu, N., Wu, L., Yu, Z., Bai, L., & Li, Y. (2018). Long non-coding RNA MUC5B-AS1 promotes metastasis through mutually regulating MUC5B expression in lung adenocarcinoma. *Cell Death & Disease*, 9(5), Article 5.

Zhang, C., Miller, S. F., Roosenboom, J., Wehby, G. L., Moreno Uribe, L. M., Hecht, J. T., Deleyiannis, F. W. B., Christensen, K., Marazita, M. L., & Weinberg, S. M. (2018). Soft tissue nasal asymmetry as an indicator of orofacial cleft predisposition. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 176(6), 1296-1303.

Zhang, P., Wu, W., Chen, Q., & Chen, M. (2019). Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. *Journal of Integrative Bioinformatics*, 16(3), 20190027.

Zhou, B., Lin, W., Long, Y., Yang, Y., Zhang, H., Wu, K., & Chu, Q. (2022). Notch signaling pathway: Architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 95.

Zhu, J. L., Basso, O., Hasle, H., Winther, J. F., Olsen, J. H., & Olsen, J. (2002). Do parents of children with congenital malformations have a higher cancer risk? A nationwide study in Denmark. *British Journal of Cancer*, 87(5), 524-528.

Anexo I

CEMIC Comité de Ética en Investigación Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas "Norberto Quirno"	1149
---	------

FORMULARIO DE APROBACIÓN

Buenos Aires, 28 de marzo de 2018

Investigador Principal: Dr. Poletta

EN REFERENCIA A:

Título del protocolo: "Subproyecto: Genómica traslacional aplicada al estudio de un cluster de fisuras orales en Patagonia: Integrando el diseño de microarrays personalizados, análisis de fenotipos subclínicos y bioinformática en estudios de recurrencia familiar".

El Comité de Ética en Investigación del CEMIC resolvió aprobar el protocolo de referencia y su respectivo consentimiento informado.

El Comité requerirá, cuando lo crea oportuno, información sobre el desarrollo del presente estudio y podrá reconsiderar su valoración inicial.

Saluda a Ud. atte.,


Dr. Hugo Krupitzki

Miembros del Comité: Enrique Gadow – Académico, Presidente Hugo Krupitzki - Prof. IUC, Efectividad Clínica Roberto Lede – Médico, Asesor externo Ana María Martirena - Lego Julio Ravioli - Médico Legista Juan Carlos Tealdi - Médico, Bioeticista José Molina – Lic. en Enfermería Analia López – Médica, Efectividad Clínica Sebastián Lipina – Psicólogo, Investigador CONICET Beatriz Vuelta-Psicóloga María Celeste Rivas – Lic. en Enfermería	Consultores: Roberto Arana - Académico Jorge López Camelo - Investigador CONICET
--	---

Anexo II. Tablas suplementarias

Capítulo I

Casos-contrôles

Tabla S1. Regresión logística ordinal sobre IDPF
olog IDPF caco##sexo, cluster(familia)

Número de observaciones = 165

IDPF	Coeficiente	EE	z	P>z	[IC95%]	
caco	0,2961208	0,3728837	0,79	0,427	-0,4347178	1,026959
sexo	0,1797889	0,3827853	0,47	0,639	-0,5704565	0,9300342
caco#sexo	0,339498	0,5769303	0,59	0,556	-0,7912647	1,470261

Referencias:

IDPF = Índice de Disimilitud en el Patrón de Figuras

caco = control (referencia) | caso

sexo = mujer (referencia) | hombre

EE = Error estándar

IC95% = Intervalo de confianza al 95%

Tabla S2. Regresión no paramétrica sobre IAD
npregress series IAD i.sexo i.caco

Número de observaciones = 139

IAD	Efecto	Error Estándar	z	P> z	[IC95%]	
sexo	-0,4842678	1,904107	-0,25	0,799	-4,216249	3,247714
caso vs control	0,6399837	1,900322	0,34	0,736	-3,08458	4,364547

Referencias:

caco: control (referencia) | caso

sexo = mujer (referencia) | hombre

IAD = Índice de Asimetría Direccional

EE = Error estándar

IC95% = Intervalo de confianza al 95%

Lateralidad

Tabla S3. Regresión no paramétrica sobre IAD
npregress series IAD i.sexo i.biluni

Número de observaciones = 139

IAD	Efecto	EE	z	P> z	[IC95%]	
sexo	-0,5187034	1,912902	-0,27	0,786	-4,267922	3,230515
biluni						
unilateral vs control	0,3935495	1,994324	0,20	0,844	-3,515253	4,302352
bilateral vs control	1,825203	2,95974	0,62	0,537	-3,975781	7,626188

Test entre coeficientes “unilateral” y “bilateral”

unilateral - bilateral = 0

$$\chi^2 = 0,25$$

$$\text{Prob} > \chi^2 = 0,6142$$

Referencias:

IAD = Índice de Asimetría Direccional

biluni = control (referencia) | unilateral | bilateral

sexo = mujer (referencia) | hombre

EE = Error estándar

IC95% = Intervalo de confianza al 95%

Tabla S4. Regresión no paramétrica sobre IAD
npregress series IAD i.sexo i.lateralidad

Número de observaciones = 139

IAD	Efecto	EE	z	P> z	[IC95%]	
sexo	-0,3906604	1,926771	-0,20	0,839	-4,167061	3,38574
lateralidad						
unilateral izquierdo vs control	-0,3154252	2,19546	-0,14	0,886	-4,618448	3,987598
unilateral derecho vs control	2,597626	2,737489	0,95	0,343	-2,767754	7,963006
bilateral vs control	1,825203	2,982248	0,61	0,541	-4,019896	7,670302

Test entre coeficientes “unilateral izquierdo” y “unilateral derecho”

unilateral izquierdo - unilateral derecho = 0

$$\chi^2 = 1,12$$

$$\text{Prob} > \chi^2 = 0,2897$$

Referencias:

IAD = Índice de Asimetría Direccional

lateralidad = control (referencia) | unilateral izquierdo | unilateral derecho | bilateral

sexo = mujer (referencia) | hombre

EE = Error estándar

IC95% = Intervalo de confianza al 95%

Recurrencia familiar

Tabla S5. Regresión logística ordinal sobre IDPF
olog IDPF bajarecurrencia##sexo altarecurrencia##sexo, cluster(familia)

Número de observaciones = 165

IDPF	Coeficiente	EE	z	P> z	[IC 95%]	
baja recurrencia	0,0245032	0,3864784	0,06	0,949	-0,7329804	0,7819869
sexo	0,1821179	0,3885736	0,47	0,639	-0,5794723	0,9437081
baja recurrencia#sexo	0,4643568	0,6301312	0,74	0,461	-0,7706777	1,699391
alta recurrencia	1,48427	0,5752638	2,58	0,010	0,3567739	2,611766
alta recurrencia#sexo	-0,2903737	0,9641253	-0,30	0,763	-2,180024	1,599277

Referencias:

IDPF: Índice de Disimilitud en el Patrón de Figuras

Recurrencia: controles (referencia), baja recurrencia, alta recurrencia

sexo = mujer (referencia) | hombre

EE = Error estándar

IC95% = Intervalo de confianza al 95%

Tabla S6. Regresión no paramétrica sobre IAD
npregress series IAD i.sexo i.recurrencia

Número de observaciones = 139

IAD	Efecto	EE	z	P> z	[IC95%]	
sexo (masc vs fem)	-0,634171	1,887614	-0,34	0,737	-4,333826	3,065484
Recurrencia						
baja recurrencia vs control	-0,6546039	1,923208	-0,34	0,734	-4,424022	3,114814
alta recurrencia vs control	6,245826	3,311593	1,89	0,059	-0,2447762	12,73643

Test entre coeficientes de “baja” y “alta” recurrencia

baja recurrencia- alta recurrencia = 0

$$\chi^2 = 4,77$$

$$\text{Prob} > \chi^2 = 0,0290$$

Referencias:

IAD= índice de Asimetría Direccional

Recurrencia familiar= controles (referencia), baja recurrencia, alta recurrencia

sexo = mujer (referencia) | hombre

EE= Error estándar

IC95%= Intervalo de confianza al 95%

Capítulo II

Parientes - controles

Tabla S7. Tabla resumen de los primeros componentes principales

	Comp1	Comp2	Comp3	Comp4
Autovalores	0,0003536926	0,0003218676	0,0001943062	0,0001451073
Proporción de la varianza	0,1810760139	0,1647829316	0,0994767300	0,0742889657
Proporción acumulada	0,1810760139	0,3458589456	0,4453356755	0,5196246413

Tabla S8. Resultados del *PERMANOVA* sobre el componente de asimetría fluctuante entre parientes y controles

Factor	SC	gl	CM	R ²	F	p-valor
tamaño	0,00145	1	0,00145	0,0042	0,757	0,700
edad	0,00151	1	0,00151	0,0044	0,787	0,627
sexo	0,00195	1	0,00195	0,0056	1,0156	0,411
parientes-control	0,00343	1	0,00343	0,0099	1,7885	0,006 *
parientes-control:familia	0,2054	107	0,00192	0,592	0,9997	0,506
residuals	0,13057	68	0,00192	0,376		
total	0,34689	179				

Tabla S9. Resultado del test a posteriori del permanova entre parientes y controles

Controles (varianza)	Parientes (varianza)
0,0004464632	0,0008000488
Test p-valor	
0,006*	

Recurrencia

Tabla S10. *Procrustes* ANOVA por grupo según la recurrencia familiar

Grupo	Factor	SC	gl	CM	R ²	F	p-valor
controles	Individuo	0,832	39	0,021	0,847	11,802	0,001 **
	cAD	0,025	1	0,025	0,025	13,75	0,001 **
	cAF	0,071	39	0,002	0,072	2,592	0,001 **
	Error	0,054	78	0,001	0,055		
baja recurrencia	Individuo	2,261	111	0,02037	0,847	10,646	0,001 **
	cAD	0,05052	1	0,050517	0,0189	26,4027	0,001 **
	cAF	0,21238	111	0,001913	0,0795	2,8486	0,001 **
	Error	0,14643	218	0,000672	0,0548		
alta recurrencia	Individuo	0,77396	37	0,020918	0,8328	9,82	0,001 **
	cAD	0,02223	1	0,022234	0,0239	10,438	0,001 **
	cAF	0,07881	37	0,002130	0,0848	2,8997	0,001 **
	Error	0,05436	74	0,000735	0,0585		

Tabla S11. Permanova sobre el componente de asimetría fluctuante en subgrupos por recurrencia familiar

Factor	SC	gl	CM	R ²	F	p-valor
tamaño	0,0015	1	0,00145	0,0042	0,757	0,700
edad	0,0016	1	0,00151	0,0056	1,0156	0,411
sexo	0,0020	1	0,00195	0,0044	0,7869	0,627
Recurrencia	0,0048	2	0,002398	0,0138	1,251	0,006
Recurrencia:flia	0,2031	107	0,0019	0,586	0,998	0,517
residuals	0,1306	68	0,0019	0,376		
total	0,3469	179				

Tabla S12. Resultado del test a posteriori del permanova con la comparación entre parientes según la recurrencia familiar

posteriori (morphol.disparity)		
Controles (varianza)	baja Recurrencia (varianza)	alta Recurrencia (varianza)
0,00045	0,00081	0,00076
Test p-valor baja vs alta recurrencia		
p=0,67		