

EVIDENCIAS DE UN GEN MAYOR AUTOSÓMICO EN LA ETIOLOGÍA DE LABIO HENDIDO CON O SIN PALADAR HENDIDO Y ASOCIACIÓN AL GRUPO SANGUÍNEO KIDD EN GENEALOGÍAS ESTUDIADAS EN EL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

EVIDENCES OF AN AUTOSOMAL MAJOR GENE IN THE AETIOLOGY OF CLEFT LIP WITH OR WITHOUT PALATE AND ASSOCIATION TO BLOOD GROUP KIDD PEDIGREES ASCERTAINED FROM ANTIOQUIA, COLOMBIA

María Luisa Bravo¹, Gustavo Jaillier², Consuelo Valencia², Luis Fernando Villegas², Óscar López², Lina Moreno², Rafael Blanco³ y Mauricio Arcos-Burgos^{1, 4}

Resumen

En este artículo se presenta un análisis epidemiológico genético de un grupo de familias afectadas de labio hendido con o sin paladar hendido (LH±PH) seleccionadas de la población de Antioquia (Colombia). La finalidad es discriminar el componente genético y el componente ambiental involucrados en la susceptibilidad para desarrollar LH±PH. En primera instancia se calculó una heredabilidad del 96% lo cual está en contra del modelo multifactorial y es más compatible con el modelo que postula la existencia de un gen con efecto mayor. Los resultados del análisis de segregación simple se ajustaron mejor al modelo de locus mayor recesivo con penetrancia incompleta. La frecuencia del gen mayor que induce la susceptibilidad para desarrollar LH±PH es de 0.037 dentro de la población que fue estudiada. Mediante una prueba de asociación de marcadores genéticos se encontró una covarianza significativa entre el fenotipo LH±PH y el genotipo *JKa/JKa* (grupo sanguíneo Kidd, $p < 0.01$, riesgo relativo igual a 0.2). El resultado anterior es compatible con la existencia de un efecto protector para el desarrollo de LH±PH. A partir de dicha asociación, se hizo un análisis secuencial de ligamiento entre LH±PH y el marcador sanguíneo Kidd mediante la genotipificación de una familia extendida de gran tamaño, lo que dio un LOD SCORE de -1. Este resultado de LOD-SCORE no permite confirmar ni descartar ligamiento. Los anteriores hallazgos sugieren que los efectos ambientales, considerados como el factor más importante en la génesis LH±PH, son mínimos en la generación de susceptibilidad para desarrollar LH±PH, y por lo tanto es necesario considerar el modelo de gen mayor.

Palabras claves: Labio con o sin paladar hendido, análisis de segregación, modelo multifactorial, análisis de ligamiento, estudios de asociación

Abstract

A genetic epidemiological analysis of cleft lip with or without cleft palate (CL±CP) in the Antioquian population (Colombia) is presented. The study was conducted in order to discriminate the genetic and the environmental components involved in the susceptibility to develop CL±CP. The value of heredability (96%) is not in concordance with the multifactorial threshold model and contrarily support the major gene model. The simple segregation analysis showed a better fit of the data to the recessive major locus model with incomplete penetrance. The frequency of the major gene involved in the susceptibility to develop CL±CP is 0,037 in the studied population. By performing an association study among genetic classical markers and the phenotype CL±CP we found significant covariance with the blood group Kidd ($p < 0.01$). The relative risk equal to 0.2 is consistent with protection for developing CL±CP. Analysing five families by sequential tests to detect linkage yielded a LOD-SCORE of minus 1, with did not permit the detection or confirmation of linkage.

Key words: Cleft lip with or without Cleft Palate, segregation analysis, multifactorial model, linkage analysis, associations studies

INTRODUCCIÓN

El labio hendido (LH) con o sin paladar hendido (PH), LH±PH, es una malformación congénita que ha acompañado a la humanidad desde sus orígenes.

Representa un 60% de todas las malformaciones del tracto gastrointestinal, lo que coloca esta patología como la segunda de todas las malformaciones congénitas (Juy, 1963).

Recibido: septiembre de 1997; aprobado para publicación: noviembre de 1997

1 Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Colombia.

2 Programa General de Labio Hendido y Paladar Hendido, Clínica Noel, Medellín, Colombia.

3 Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

4 Instituto Neurológico de Antioquia, Medellín, Colombia.

Varios estudios han mostrado la existencia de diversos factores ambientales que podrían explicar el desarrollo de LH±PH. Entre estos factores se pueden mencionar la rubeola (Ingalls *et al.*, 1964), el virus de la influenza A2 (Leck *et al.*, 1969), el uso de difenilhidantoinato sódico (Pashayan *et al.*, 1971) y algunos tranquilizantes menores (Safra y Oakley, 1975). Por otro lado, el LH±PH acompaña a más de un centenar de anomalías cromosómicas (Schinzel, 1984) y a un gran número de síndromes (McKusick, 1983). También se han descrito genes mayores asociados al uso de glucocorticoides en el primer trimestre del embarazo y el desarrollo de LH±PH (Trasler y Fraser, 1977). La prevalencia de LH±PH varía de acuerdo con la raza, así: mongoloides > caucasoides > negroides, con las siguientes cifras de incidencia: 1.93/1000 > 1.25/1000 > 0.46/1000, respectivamente (Chung *et al.*, 1974). En gemelos se ha demostrado una mayor concordancia en monocigóticos que en dicigóticos (Metrakos *et al.*, 1958). Lo anterior sugiere la existencia de un componente genético en la etiología de la entidad.

Para explicar la agregación familiar de LH±PH se han propuesto diferentes formas de transmisión. El modelo más clásico es el "multifactorial de Falconer", en el que se acoplan los efectos ambientales y los genéticos en forma conjunta (Falconer, 1965). Los estudios actuales han propuesto el "modelo de locus mayor", que muestra diversas formas de transmisión como la recesiva, la codominante y la dominante (Marazita *et al.*, 1986). Mediante análisis de segregación combinada (segregación compleja más ligamiento) se ha demostrado la presencia de al menos dos loci que interactúan entre sí (Clementi *et al.*, 1997). Los estudios de asociación han mostrado la presencia de desequilibrio de ligamiento al factor de crecimiento transformante epidermal localizado en el cromosoma 2 pero no se ha podido demostrar ligamiento (Ardinger *et al.*, 1989; Amos *et al.*, 1996).

El objetivo de esta investigación es discriminar el componente genético del ambiental en la susceptibilidad para desarrollar LH±PH en individuos pertenecientes al departamento de Antioquia, Colombia, y realizar estudios de asociación con algunos marcadores clásicos eritrocitarios con la finalidad de detectar desequilibrio de ligamiento o ligamiento genético.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mediante el uso de una estrategia de muestreo fijo, se estudió una muestra de 60 pacientes de la Clínica Noel de Medellín afectados de LH±PH, que fueron

analizados en forma aleatoria de acuerdo con el orden de llegada al programa de cirugía de Labio y Paladar Hendido. La edad de los casos índices estuvo entre 0 y 14 años. Paralelamente, se estudiaron 80 niños controles con edades igualmente entre 0 y 14 años, no afectados de LH±PH, de los que llegaban a ese centro hospitalario solicitando atención médica y que en su historia clínica no tuvieran antecedentes de LH±PH.

Cada individuo afectado de LH±PH fue evaluado en primera instancia por el equipo de cirugía plástica y de ortodoncia perteneciente al programa de la clínica, y luego se le practicó el examen genético. Este examen consistió en un análisis clínico, con la finalidad de descartar síndromes. No se practicaron pruebas de coeficiente intelectual ni tampoco se realizó cariotipo. En las familias con más de un afectado en la misma hermandad, o en diferentes hermandades conectadas por algún relacionado biológico al caso índice, se verificó la información mediante trabajo de campo. A los casos índices y a los padres se les tomó una muestra sanguínea. En las visitas domiciliarias se tomó muestra sanguínea a los familiares que estuvieron disponibles. Posteriormente se determinaron los genotipos para los sistemas sanguíneos ABO, Rh-Hr, MNSS, Kell y Kidd, de acuerdo con la metodología de Sussman (1976).

El análisis de segregación se realizó según la teoría descrita por Morton para modelos de segregación simple (1959). El contraste del modelo multifactorial de Falconer se realizó según la metodología de Marazita *et al.* (1986). Se determinó la incidencia de afectados en los relacionados biológicos en primer grado (hermanos y padres) y segundo grado (abuelos y tíos). Se calculó, así mismo, la heredabilidad, h^2 , según el modelo de Falconer (1965). El análisis de asociaciones se hizo por análisis de contingencia según la distribución de χ^2 y considerando la prueba exacta de Fisher, que es recomendada para muestras pequeñas. El análisis de ligamiento se llevó a cabo por el método secuencial de ligamiento (LOD SCORE), creado por Morton (1955), mediante el uso del programa sistematizado LIPED.

RESULTADOS

De los 60 afectados analizados, cinco fueron excluidos debido a que la evaluación clínica mostró la presencia de síndromes. Las variables demográficas se describen mediante distribuciones porcentuales en las tablas 1, 2 y 3. De los 31 casos en que se detectó agregación familiar, en 22 se pudo extender la genealogía en busca de mayor

información. En ellas se definieron 46 hermandades con un total de 230 individuos, entre los cuales existen 54 afectados (tabla 4).

En la tabla 4 se muestran los cálculos para el análisis de segregación simple, bajo el supuesto de una frecuencia de segregación (p) igual a 0.25, es decir, segregación recesiva. El valor esperado de afectados para $p=0.25$ es aproximadamente cuatro desviaciones típicas mayor que el observado. Cuando se asume $p=0.50$ (herencia dominante), el número de individuos observados es aproximadamente 10 desviaciones típicas menor que lo esperado.

Se encontraron 11 afectados en 120 relacionados biológicos de primer grado (padres y hermanos) del caso índice, o sea una frecuencia de 0.09166, y seis afectados en 236 relacionados biológicos de segundo grado (abuelos, tíos) del caso índice, o sea una frecuencia de 0.02500. La heredabilidad estimada a partir de estos resultados de incidencia es de 96.15 (desviaciones típicas = 7.98).

Se encontró asociación estadísticamente significativa al genotipo JKa/JKa del grupo sanguíneo Kidd

Tabla 1. Distribución de la forma y/o intensidad de LH±PH en 55 casos seleccionados en la población de Antioquia

	Nº	%
Según la forma		
I - LH±PH	49	89.09
LH unilateral	38	77.55
1 - LH unilateral derecha	18	36.73
2 - LH unilateral izquierdo	20	40.81
LH bilateral	11	22.44
II - PH	6	10.91
Según la intensidad		
I - LH+PH	37	75.50
II - LH-PH	12	20.40

Tabla 2. Distribución según la existencia o no de agregación familiar en pacientes afectados con LH±PH

	Nº	%
Existencia de agregación	31	54
No existencia de agregación	24	46
Total	55	100

* Agregación familiar: antecedentes de afectados vía paterna, vía materna o vía paterna y materna; antecedentes de uniones consanguíneas; antecedentes de uniones consanguíneas más antecedentes de afectados

($p < 0.01$). La búsqueda de un posible ligamiento entre este grupo sanguíneo y el LH±PH, utilizando el modelo de herencia recesivo con penetrancia incompleta, y considerando, además, igual fracción de recombinación masculina y femenina, dio un resultado de LOD SCORE de -1

Tabla 3. Distribución según la forma de afección en pacientes de LH±PH con antecedentes del cuadro a nivel familiar (agregación familiar)

	Nº	%
LH±PH	26	53.00
A- LH+PH	21	80.66
1- R.B. afectados por vía materna	6	28.00
2- R.B. afectados por vía paterna	5	23.00
3- R.B. afectados por vía paterna y materna	3	14.00
4- R.B. afectados más endogamia parental	3	14.00
5- Hermanos afectados	2	9.00
6- Endogamia parental	2	9.00
B- LH-PH	5	19.34
1- R.B. afectados por vía materna	2	40.00
2- R.B. afectados más endogamia parental	2	40.00
3- Endogamia parental	1	20.00

* R.B. = Relacionados biológicos

Tabla 4. Análisis de segregación simple utilizando el modelo recesivo para familias nucleares afectadas de LH±PH, seleccionadas a partir de casos índice

S	Número de individuos afectados			
	n_s	Obs	Esp	Var
2	7	7	7.9996	0.85715
3	14	15	18.162	3.68158
4	10	12	14.628	4.20050
6	6	6	10.948	4.65570
7	1	1	2.0196	0.97024
8	2	3	4.4450	2.34480
10	2	3	5.2980	3.18340
11	1	2	2.8710	1.80530
12	1	3	3.0980	2.01960
13	1	1	3.3290	2.23350
19	1	1	4.7700	3.48140
Total	46	54	77.569	29.4331

DS = $(29.4331)^{1/2} = 5.4252$
 S: Tamaño de la hermandad
 n_s : Número de hermandades de tamaño s

DISCUSIÓN

La incidencia de LH±PH en Antioquia, según estimaciones basadas en información obtenida a partir de los archivos del Hospital General de Medellín (López y Bravo, 1989), y de informaciones verbales suministradas por personal perteneciente a programas especiales del Servicio Seccional de Salud del departamento de Antioquia, es de aproximadamente un afectado por cada 1000 nacimientos. Esta frecuencia es mayor que la estimada en otras poblaciones, que presentan estimadores del orden de un afectado por cada 1500-3000 individuos (Morton *et al.*, 1967). En este estudio la distribución por sexos de la entidad no muestra variaciones significativas pues se observó una proporción aproximada de 1:1. Este resultado no concuerda con lo encontrado en algunos estudios epidemiológico genéticos que han descrito una proporción de dos varones afectados por cada mujer afectada (Hecht, 1990). Tampoco se encontró relación entre el grado de severidad del síndrome y el sexo masculino como lo han reportado otros autores (Hecht, 1990). Los anteriores hallazgos podrían indicar una conducta inusual en la distribución y manifestación de LH±PH para la población de Antioquia que podría estar posiblemente relacionada con la estructura genética de esta población, o ser consistente con la existencia de heterogeneidad en el desarrollo de la malformación.

Se encontró agregación familiar en el 54% de los casos (tabla 2), representada en antecedentes de afectados por vía paterna, por vía materna, o por vías paterna y materna, antecedentes de uniones consanguíneas y antecedentes tanto de consanguinidad como de relacionados biológicos afectados. Lo anterior fortalece la hipótesis de la intervención de factores genéticos en la aparición del fenotipo LH±PH. El análisis del modelo de herencia multifactorial dio una heredabilidad del 96%. Este valor es altamente compatible con lo encontrado por Chung *et al.* (1974) de 99% y por Hecht *et al.* (1991) de 93% y está de acuerdo con lo predicho por Morton *et al.* (1967) para la existencia de genes mayores. Valores altos de heredabilidad, cercanos a 1, sugieren la presencia de genes mayores.

Para verificar la verosimilitud del modelo multifactorial, se utilizaron pruebas de ajuste de los resultados obtenidos contra los esperados de acuerdo con las tesis extrapolables a partir del modelo del umbral multifactorial de Falconer. Estas tesis, que están bien descritas por Marazita *et al.* (1986), son: 1. La incidencia en relacionados biológicos se espera que sea menor en los

relacionados de segundo grado que en los de primer grado de coancestría; 2. Los relacionados biológicos en primer grado del sexo menos afectado se espera que tengan un riesgo más alto que los relacionados biológicos en primer grado del sexo más afectado; 3. La heredabilidad no debe ser mayor del 75%; resultados cercanos o mayores del 100% son incompatibles con el modelo; 4. La consanguinidad no debe ser mayor que la existente en la población general. Debe observarse que las tesis extrapolables que pueden someterse a prueba en este trabajo son la primera y la tercera. La segunda tesis no puede ser sometida a verificación, puesto que no se encontraron distorsiones de la distribución sexual. Igualmente la cuarta tesis tampoco puede verificarse puesto que hoy no se conoce el coeficiente de endogamia que existe en la población de Antioquia. Con relación a la tercera, los resultados de heredabilidad obtenidos son incompatibles con el modelo multifactorial.

El análisis de segregación para la hipótesis de locus mayor mostró que nuestros resultados se adaptan mejor al modelo recesivo con penetrancia incompleta ($p=0.25$) pero son significativamente diferentes (tabla 4; compárense los individuos afectados esperados y los casos afectados). Lo anterior puede aceptarse si se supone una penetrancia reducida. Estos hallazgos son compatibles con los encontrados por Chung *et al.* (1974) y Marazita *et al.* (1986). No obstante, los anteriores resultados son incompatibles con los encontrados por Hecht (1991), quien ha demostrado que sus genealogías se ajustan mejor al modelo dominante con una penetrancia muy reducida (20%).

Estos resultados, aparentemente incompatibles, coinciden en varios puntos: la acción de un gen mayor, un pequeño efecto medioambiental y penetrancia incompleta. Deducimos estas diferencias de penetrancia, en función de la existencia de variaciones de la expresividad para la entidad, lo que repercute en una apreciación subjetiva de penetrancia incompleta. En otras palabras, existe una mala clasificación de algunos individuos "afectados" que presentan microformas de la entidad (ausencia de incisivos laterales, por ejemplo). Con referencia a lo anterior, debe mencionarse que existen criterios encontrados. Por ejemplo, Wolf (1955) demostró que el incisivo lateral, anómalo o agenésico, se encuentra con una incidencia igual, tanto en la población general como en la población de relacionados biológicos de afectados con LH±PH. Crawford y Sofaer (1987) encontraron que la asimetría del primer molar, asociada a presencia de asimetría en los

dermatoglifos, constituye un criterio de predisposición individual para el desarrollo de LH±PH en la descendencia. Así mismo, Kurisu *et al.* (1974) mostraron una tendencia al hipertelorismo familiar como un indicador de predisposición en genealogías afectadas de LH±PH.

Otro aspecto que puede corroborar nuestra hipótesis de recesividad, tiene que ver con la observación empírica de los árboles genealógicos en los que se presenta un alto coeficiente de endogamia.

Suponiendo un modelo de locus mayor recesivo y penetrancia completa, se obtuvo una frecuencia de 0.037 del gen anormal para esta población. Esto permite determinar exactamente las probabilidades de afección de un próximo descendiente en una familia con riesgo, sin utilizar el riesgo empírico establecido por el modelo multifactorial.

La asociación significativa al genotipo *JKa/JKa* ($p < 0.01$) del grupo sanguíneo Kidd, con un riesgo relativo igual a 0.20 y una fracción etiológica igual a -0.32, catalogan a dicho genotipo (*JKa/JKa*) como un protector para el desarrollo de la entidad. Hasta ahora, no se han detectado asociaciones significativas para el cromosoma 18. Este hallazgo debe corroborarse mediante el uso de más familias en el análisis de ligamiento, porque los resultados de LOD SCORE que se obtuvieron no descartan ni confirman ligamiento a este grupo sanguíneo.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer infinitamente a las familias que colaboraron para la realización de este estudio. Mauricio Arcos-Burgos fue financiado por Colciencias y por el ICI becas Mutis durante el desarrollo de su doctorado. Este trabajo fue posible gracias a la colaboración de la Clínica Noel de Medellín y su grupo de LH±PH.

REFERENCIAS

Amos, C., D. Gasser & J. T. Hecht. 1996. Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: new BCL3 information. *Am. J. Hum. Genet.* 59:743-744.

Ardinger, H. H., B. K. Buetow, I. G. Bell, J. Bardach, D. R. van-Demark & C. J. Murray. 1989. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alfa gene with cleft lip and palate. *Am. J. Hum. Genet.* 45:348-353.

Clementi, M., R. Tenconi, P. Forabosco, E. Calzolari & M. Milan. 1997. Inheritance of cleft

palate in Italy. Evidence for a major autosomal recessive locus. *Hum. Genet.* 100:204-209.

Crawford, F. C. & J. A. Sofaer. 1987. Cleft lip with or without cleft palate: identification of sporadic cases with a high level of genetic predisposition. *J. Med. Genet.* 24:163-169.

Chung, C. S., G. H. S. Ching & N. E. Morton. 1974. A genetic study of cleft lip and palate in Hawaii. II. Complex segregation analysis and genetic risks. *Am. J. Hum. Genet.* 26:177-188.

Falconer, D. S. 1965. The inheritance of liability to certain diseases estimated from the incidence in relatives. *Ann. Hum. Genet.* 29: 51-71.

Hecht, J. T. 1990. Dominant cleft lip families. *J. Med. Genet.* 27:597.

Hecht, J. T., G. Y. Wang, S. H. Blanton, V. V. Michels & S. P. Daiger. 1991. Cleft lip and palate: no evidence of linkage to transforming growth factor alpha. *Am. J. Hum. Genet.* 49:682-686.

Ingalls, T. H., T. E. Taube & R. A. Klingberg. 1964. Cleft lip and palate: epidemiologic considerations. *Plast. Reconstr. Surg.* 34:1-10.

Juy, R. H. 1963. Congenital anomalies as recorded on birth certificates in the division of vital statistics of the Pennsylvania Department of Health for period 1956-1960. *Plast. Reconstr. Surg.* 32:361-367.

Kurisu, K., J. D. Niswander, M. C. Johnston & M. Mazaheri. 1974. Facial morphology as an indicator of genetic predisposition to cleft lip and palate. *Am. J. Hum. Genet.* 26:702-714.

Leck, I., S. Hay, J. J. Witte & J. C. Greene. 1969. Malformations recorded on birth certificates following A2 influenza epidemics. *Public Health Rep.* 84:971-979.

López, J. B. y M. L. J. Bravo. 1989. Incidencia de labio hendido con o sin paladar hendido en el Hospital General de Medellín. Biblioteca del Hospital General de Medellín.

Marazita, M. L., A. M. Goldstein, S. L. Smaley & M. A. Spence. 1986. Cleft lip with or without cleft palate: Reanalysis of a three-generation family study from England. *Genet. Epidemiol.* 3:335-342.

McKusick, V. A. 1983. *Mendelian inheritance in man.* Sixth edition, The John's Hopkins University Press. Baltimore and London.

- Metrakos, J. D., K. Metrakos & H. Baxter.** 1958. Clefts of the lip and palate in twins. *Plast. Reconstr. Surg.* 22:109-122.
- Morton, N. E.** 1955. Sequential tests for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.* 7:277-318.
- Morton, N. E.** 1959. Genetic test under incomplete ascertainment. *Am. J. Hum. Genet.* 11:1-16.
- Morton, N. E., C. S. Chung & M. P. Mi.** 1967. Genetics of interracial crosses in Hawaii. *En: Basel, S. K., N. E. Morton, C. J. Maclean, R. Lew & S. Yee, eds. Hawaii.*
- Pashayan, H., D. Pruzansky & S. Pruzansky.** 1971. Are anticonvulsivants teratogenic? *Lancet* 2:702-703.
- Safra, M. & G. P. Oakley.** 1975. Association between cleft lip with or without cleft palate and prenatal exposure to diazepam. *Lancet* 2:478-540
- Schinzel, A.** 1984. *Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man.* Walter de Gruyter, New York.
- Sussman, L. N.** 1976. *Patternity by blood grouping.* Springfield, CT Publishers.
- Trasler, D. G. & F. C. Fraser.** 1977. Time-position relationships with particular reference to cleft lip and cleft palate. *En: Wilson, J. G. & F. C. Fraser, eds. Handbook of teratology.* Vol 2. Plenum, New York.
- Wolf, B.** 1955. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann. Hum. Genet.* 19:251-253.