
ANÁLISIS MOLECULAR DE *SONIC HEDGEHOG* (*SHH*) EN LA ETIOLOGÍA DE LA FISURA LABIOPALATINA NO SINDRÓMICA EN TRÍOS CASO-PROGENITORES CHILENOS

MOLECULAR ANALYSIS OF *SONIC HEDGEHOG* (*SHH*) IN THE ETIOLOGY OF NONSYNDROMIC CLEFT LIP AND PALATE IN CHILEAN CASE-PARENT TRIOS

RAMIRO J. RINCÓN R.¹, JOSÉ SUAZO², RAFAEL BLANCO C.²

RESUMEN. Introducción: la fisura labio palatina no sindrómica, NSCLP (del inglés Nonsyndromic cleft lip and palate) es una de las malformaciones congénitas más frecuentes tanto en Chile como en el resto del mundo. Presenta un modo de herencia multifactorial, en la que interactúan varios genes y el medio ambiente. Evidencias experimentales han demostrado la participación de Sonic hedgehog (*Shh*) en la migración de las células de la cresta neural, en la transformación epitelio-mesénquima y en la formación de las estructuras medias craneofaciales durante el desarrollo embrionario, es probable una asociación entre variantes de *Shh* y la NSCLP. **Métodos:** el objetivo de este trabajo fue evaluar las regiones exónicas e intrónicas adyacentes de *Shh*, en una muestra de 150 tríos caso-progenitores para hallar la asociación con NSCLP. Se utilizó el método PCR-RFLP para determinar la presencia de heterodúplex. Luego, se utilizó la técnica de Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE) para ver la distorsión del ADN en los heterodúplex. Como método alternativo, se hizo un análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (del inglés single-nucleotide polymorphism SNP) para determinar asociación entre NSCLP y *Shh*, para lo cual se utilizaron los SNP: rs1233555 y rs1233556, ubicados en el primer intrón de *Shh*. **Resultados:** no se observaron heterodúplex en ninguno de los segmentos de *Shh* analizados en 150 tríos, el análisis de SNP tampoco mostró asociación con *Shh* y FLPNS. **Conclusión:** la no asociación puede deberse a que la frecuencia de distribución de los SNP en la población chilena es diferente a la de las poblaciones referidas, o a que el número de SNP analizados fue insuficiente, o la no inclusión para el análisis de otras regiones de *Shh*.

Palabras clave: labio y paladar hendido no sindrómico, Sonic hedgehog, SNP.

Rincón RJ, Suazo J, Blanco R. Análisis molecular de Sonic hedgehog (*Shh*) en la etiología de la fisura labiopalatina no sindrómica en tríos caso-progenitores chilenos. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2012; 24(1): 110-120.

ABSTRACT. Introduction: nonsyndromic cleft lip and palate (NSCLP) is one of the most common congenital malformations not only in Chile but also worldwide. It has a multifactorial inheritance pattern with interaction of several genes and the environment. Several experimental studies have proven the participation of Sonic hedgehog (*Shh*) in the migration process of cells from the neural crest, in the epithelium-mesenchyme transformation, and in the formation of middle craniofacial structures during embryo development; an association between *Shh* variants and NSCLP is probable. **Methods:** the goal of this study was to evaluate both exonic and intronic regions adjacent to *Shh*, in a sample of 150 case-parent trios in order to find possible associations with NSCLP. The PCR-RFLP method was used to determine the presence of heteroduplex. Afterwards, the Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE) technique was used to visualize DNA distortion at the heteroduplexes. As an alternative method, a single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis was performed in order to determine NSCLP-*Shh* associations, by means of these SNPs: rs1233555 and rs1233556, located at the first *Shh* intron. **Results:** no heteroduplexes were found in any of the analyzed *Shh* segments in 150 trios; SNP analysis did not show associations between *Shh* and NSCLP either. **Conclusions:** this lack of association may be due to the fact that SNP distribution frequency among Chilean population is different to that of reference populations, or because the number of SNPs analyzed was not sufficient, or even because this study did not include other *Shh* regions.

Key words: nonsyndromic cleft lip and palate, Sonic hedgehog, SNP.

Rincón RJ, Suazo J, Blanco R. Molecular analysis of Sonic hedgehog (*Shh*) in the etiology of nonsyndromic cleft lip and palate in Chilean case-parent trios. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2012; 24(1): 110-120.

1 Profesor Facultad de Odontología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

2 Profesores Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

1 Professor, School of Dentistry, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

2 Professors, School of Medicine, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

INTRODUCCIÓN

La fisura labiopalatina es una malformación congénita producida por la falta de fusión entre las estructuras que dan origen al labio superior y al paladar óseo secundario.¹⁻³ Aproximadamente a las cuatro semanas en mamíferos, la cara está formada por el proceso frontal rodeado por los primeros y segundos arcos branquiales. Posteriormente, el proceso frontal da origen a los procesos frontonasales mediales y laterales, y el primer arco branquial origina los procesos maxilares y mandibulares. Los procesos nasomediales crecen más que los laterales, fusionándose a los procesos maxilares para formar el labio superior y el paladar primario.⁴ En la parte interna de la boca primitiva, las láminas palatinas del proceso maxilar se elevan y se fusionan en la línea media con el *septum* nasal para formar el paladar óseo secundario.^{5,6} Fallas en la fusión de alguna de estas estructuras embrionarias generan fisuras.^{7,8} Esta patología es clasificada en fisura labiopalatina sindrómica⁷ y no sindrómica (NSCLP, OMIM 119530).

La NSCLP presenta características de una enfermedad de herencia compleja, generado por factores ambientales y genéticos, los cuales producen variabilidad en la expresión fenotípica.⁹ La NSCLP es la más frecuente en el mundo. La etnia amerindia y asiática son las que presentan mayores tasas NSCLP.^{10,11} En Chile, la NSCLP presenta tasa promedio de 1,5 por 1.000 recién nacidos vivos (RNV), afectando más a los hombres.¹² La población chilena de estrato socioeconómico bajo presenta mayor composición de etnia amerindia y altas tasas de NSCLP.^{13,14} Esta anomalía se convierte en Chile en un problema de salud pública por su impacto social y económico, al disminuir los costos en su atención y rehabilitación.

Durante el desarrollo del labio superior y el paladar están involucrados tres procesos: la migración de las células de la cresta neural (del inglés Cranial Neural Crest CNC),^{15,16} la transformación epitelio-mesénquima (del inglés: Epithelial-Mesenchymal transformation)¹⁷ y la formación de las estructuras medias craneofaciales.¹⁸⁻²⁰ Estos procesos están regulados por la expresión de factores de transcripción y moléculas de secreción o de superficie celular.^{2,9,17,21-25} *Sonic hedgedhog (Shh)*, es una vía de señalización que probablemente se encuentra relacionada con la formación del labio superior y el paladar.^{9,21,23,24,26,27}

INTRODUCTION

Nonsyndromic cleft lip and palate is a congenital malformation produced by lack of fusion among the structures that generate the upper lip and secondary palate development.¹⁻³ In mammals, by the fourth week the face is formed by the frontal processes surrounded by first and second branchial arches. Later, the frontal process originates medial and lateral frontal-nasal processes, and the first branchial arch originates maxillary and mandibular processes. Nasomedial processes grow more than the lateral ones, fusing with maxillary processes to form the upper lip and the primary palate.⁴ In the internal section of the primitive mouth, the palatal shelves of the maxillary process rise and fuse at the middle line with the nasal septum to form the secondary palate.^{5,6} Any disruptions during the fusion of these embryo structures produce fissures.^{7,8} This pathology is classified as syndromic⁷ and nonsyndromic cleft lip and palate (NSCLP, OMIM 119530).

NSCLP shows the characteristics of a complex hereditary disease produced by genetic and environmental factors, which create phenotypic expression variability.⁹ NSCLP is the most frequent worldwide. Amerindian and Asian races are the ones with the most rates of NSCLP.^{10,11} In Chile, NSCLP presents an average rate of 1.5 per 1.000 alive newborns, and it is most frequently found among males.¹² The Chilean population of lower socioeconomic status presents a greater composition of Amerindian ethnic groups and higher NSCLP rates.^{13,14} This anomaly has become a public health problem in Chile due to its social and economic impacts, as it increases its attention and rehabilitation costs.

The following processes are implicated in the development of upper lip and palate: cell migration from the Cranial Neural Crest (CNC),^{15,16} epithelial-mesenchymal transformation,¹⁷ and formation of middle craniofacial structures.¹⁸⁻²⁰ These processes are regulated by the expression of transcription factors and secretion- or cell-surface molecules.^{2,9,17,21-25} *Sonic hedgedhog (Shh)* is a form of signaling probably associated to the formation of upper lip and palate.^{9,21,23,24,26,27}

Evidencias en peces^{19,27} y ratones,²⁸ demuestran que alteraciones o deficiencias en *shh*, interfieren en la migración de las CNC generando fenotipos similares a la NSCLP en humanos. En ratones se observó que *shh* está relacionado con la transformación epitelio-mesénquima, generando fisuras palatinas cuando *shh* es mutado.²³ En pollos^{5,29} y peces³⁰ alteraciones de *shh* generan estructuras mediales craneofaciales deficientes, fenotipos compatibles con el síndrome de la holoprosencefalia,^{31,32} acompañado de fisura labiopalatina.

El gen *Shh* se ubica, en humanos, sobre la región del cromosoma 7q-36,3, está constituido por tres exones y dos intrones y tiene longitud de 29,4 kb*. Molecularmente, la proteína *Sonic hedgehog* (SHH),³³ se comporta como una molécula de señalización intercelular, la cual se sintetiza por un precursor que sufre clivaje autocatalítico³⁴ y el colesterol y ácido palmítico se unen covalentemente a SHH.³⁴⁻³⁸ Se cree que la adición de lípidos, colesterol y ácido palmítico restringe la movilidad de SHH en el ambiente extracelular.^{39,40} *Sonic hedgehog*, es esencial para el desarrollo normal de muchos órganos y es un factor causal de la holoprosencefalia.^{34,41} *Shh* se expresa en el epitelio de los arcos branquiales,^{42,43} cuando se presentan alteraciones de *shh* en el ratón conducen a fenotipos similares a la NSCLP.^{8,23}

Estos antecedentes conducen a la hipótesis que *Shh* estaría asociado al fenotipo NSCLP en humanos. Para contrastar esta hipótesis se utilizó una muestra de tríos caso-progenitores para identificar alelos, genotipos y haplotipos que fueron transmitidos de los progenitores a los descendientes y así determinar la asociación de *Shh* y NSCLP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra de pacientes. Luego de la firma voluntaria del consentimiento informado por todos los individuos del estudio, el cual fue previamente aprobado por el Comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, de muestras de sangre periférica se extrajo el ADN total a 150 pacientes masculinos que presentaban la NSCLP y sus respectivos progenitores utilizando el protocolo modificado descrito por Maniatis.⁴⁴ La NSCLP fue diagnosticada por un médico genetista.

Studies on fish^{19,27} and mice²⁸ have shown that alterations or deficiencies in *Shh* block migration of CNC, producing phenotypes similar to NSCLP in humans. It has been observed that *Shh* in mice is associated to the epithelial-mesenchymal transformation, creating palatal fissures when *Shh* is mutated.²³ In chicken^{5,29} and fish,³⁰ *Shh* alterations produce deficient middle craniofacial structures —phenotypes that are compatible to the holoprosencephaly syndrome,^{31,32} along with labial-palatal fissures.

In humans, the *Shh* gene is located on the 7q-36,3 chromosome region, it is constituted by three exons and two introns, and has a length of 29,4 kb³. Molecularly, the *sonic hedgehog* (*Shh*)³³ protein behaves like an intercellular signaling molecule, which is synthesized by a precursor that suffers self-catalytic reaction,³⁴ and both cholesterol and palmitic acid covalently adhere to *Shh*.³⁴⁻³⁸ It is believed that addition of lipids, cholesterol, and palmitic acid constrains *Shh* mobility in extracellular environments.^{39,40} *Sonic hedgehog* is essential to the normal development of many organs, and it is a factor for holoprosencephaly.^{34,41} *Shh* is expressed in the epithelium of the branchial arches.^{42,43} *Shh* alterations in mice lead to phenotypes similar to that of NSCLP.^{8,23}

These antecedents lead to the hypothesis that *Shh* would be associated to the NSCLP phenotype in humans. To verify this hypothesis, a sample of case-parent trios was used in order to identify alleles, genotypes, and haplotypes transmitted from parents to their descendants and therefore to establish *Shh*-NSCLP association.

MATERIALS AND METHODS

Patients sample. Once all the participants signed a consent form, previously approved by the Ethics Committee of Universidad de Chile's School of Medicine. DNA was extracted from peripheral blood samples of 150 male patients suffering NSCLP and from their parents by using the modified protocol described by Maniatis.⁴⁴ NSCLP was diagnosed by a geneticist.

* <http://www.ensembl.org>

3 <http://www.ensembl.org>

Se diseñaron cebadores o partidores para amplificar ocho segmentos entre 200 y 400 pb (tabla 1) de las regiones exónicas e intrónicas adyacentes a los exones de *Shh*. Se amplificaron estos segmentos utilizando PCR. Para el diseño de los partidores se utilizó el programa Primer 3.

Primers were designed to amplify eight segments between 200 and 400 pb (table 1) of the exonic and intronic regions adjacent to *Shh* exons. These segments were amplified by means of PCR. The Primer 3 software was used to design primers.

Tabla 1. Partidores para los exones de *Shh*

Gen	Exón	Segmento	Partidores	Tamaño (pb)	Tm
Shh	1	A	F: CGGGCAAGGTTATATAGGAAG R: TGGGGATAAACTGCTTGAGG	327	60
		B	F: AAGAGGAGGCACCCCAAAA R: GAAGTGTTCCGGCTTCTCGTAA	275	60
	2	A	F: GGTGCCCAGGCTAACGTGT R: GCGGTCAGACGTGGTGATGT	209	60
		B	F: AAGGACAAGTTGAACGCTTTG R: CCCAGGTTCTTTTCTCTTGA	341	60
	3	A	F: TTCTTTCCCTTCTCCTCACC R: GTCTCGATCACGTAGAAGACC	233	57
		B	F: ACAGCGACTTCCTCACTTTCCT R: ACCCGGTTGATGAGAATGGT	374	63
		C	F: AGGGCACCATTCTCATCAACC R: CAGGAGCCAGGTGCCTATTTG	204	63
		D	F: AGAGTAGCCCTAACCGCTCCA R: CGCCTTTTCCGAGTGCTTTT	242	63

Segmentos, partidores y Tm de amplificación para las secuencias correspondientes a ocho segmentos de los tres exones y a las secuencias intrónicas adyacentes a los exones del gen *Shh*.

Table 1. Primers for *Shh* exons

Gene	Exon	Segment	Primers	Size (pb)	Tm (Melting temperature)
Shh	1	A	F: CGGGCAAGGTTATATAGGAAG R: TGGGGATAAACTGCTTGAGG	327	60
		B	F: AAGAGGAGGCACCCCAAAA R: GAAGTGTTCCGGCTTCTCGTAA	275	60
	2	A	F: GGTGCCCAGGCTAACGTGT R: GCGGTCAGACGTGGTGATGT	209	60
		B	F: AAGGACAAGTTGAACGCTTTG R: CCCAGGTTCTTTTCTCTTGA	341	60
	3	A	F: TTCTTTCCCTTCTCCTCACC R: GTCTCGATCACGTAGAAGACC	233	57
		B	F: ACAGCGACTTCCTCACTTTCCT R: ACCCGGTTGATGAGAATGGT	374	63
		C	F: AGGGCACCATTCTCATCAACC R: CAGGAGCCAGGTGCCTATTTG	204	63
		D	F: AGAGTAGCCCTAACCGCTCCA R: CGCCTTTTCCGAGTGCTTTT	242	63

Segments, primers, and Tm (melting Temperature) for amplification of the sequences corresponding to eight segments of the three exons and to the intronic sequences adjacent to gene *Shh* exons.

Las muestras amplificadas se desnaturalizaron a 94 °C y renaturalizaron a 64, las posibles mutaciones presentes en la renaturalización conforman apareamientos de bases no complementarias, generando una deformación en la conformación de los amplificadas los cuales son detectados en geles sensibles a estas deformaciones, geles MDE-CSG.

The amplified samples were denaturalized at 94 °C and annealed at 64 °C. Possible mutations during the annealing step form mismatch creating deformations in the conformation of amplified segments which are detected by gels sensitive to these deformations, MDE-CSG gels.

En el caso de encontrarse heterodúplex se procedió a la secuenciación del amplificado respectivo.

Análisis de SNP. El análisis de SNP fue alternativo al análisis de heterodúplex. Se analizaron dos SNP y para su selección se utilizó la base de datos NCBI y Proyecto Internacional HapMap, teniendo en cuenta las frecuencias de estos SNP en la población asiática y europea, dada la composición étnica de la población chilena. Se utilizó el programa *DNA for Windows*, para hallar las enzimas de restricción de los dos SNP. Además, se diseñaron los cuatro partidores para amplificar estos dos SNP. Para determinar la presencia de los SNP en las muestras de los tríos caso-progenitores, se utilizaron las endonucleasas de restricción *NlaIII* para rs1233 555 y *Sau3A1* para rs 1233556 (tabla 2).

Análisis estadístico. Se hizo un análisis de alelos, genotipos y haplotipos para determinar la asociación de *Shh* y la FLPNS utilizando los test de desequilibrio de ligamiento (del inglés transmission-disequilibrium Test TDT), odd ratio y prueba de razón de verosimilitud. Para estos análisis se utilizó el programa UNPHASED.

In case of finding heteroduplexes, sequencing of the respective amplified segment was performed.

SNP analysis. SNP analysis was an alternative to heteroduplex analysis. Two SNPs were analyzed and their selection was performed by using the NCBI database and the International Project HapMap, having into account their frequency among Europeans and Asians, given the ethnic composition of Chilean population. The software *DNA for Windows* was used to find the restriction enzymes of these two SNPs. Also, the four primers for amplification of these two SNPs were designed. In order to determine presence of these two SNPs in our case-parent trios samples, we used *NlaIII* restriction endonucleases for rs1233 555 and *Sau3A1* for rs 1233556 (table 2).

Statistical analysis. Analysis of alleles, genotypes, and haplotypes was performed in order to determine *Shh*-NSCLP associations, by means of Transmission-Disequilibrium Test (TDT), odd ratio, and likelihood function. The UNPHASED software was used for these analyses.

Tabla 2. Características de los SNPs seleccionados para el gen *Shh*

Gen	Región	Posición	SNP	Partidores	Alelo	Het.	Enzima
Shh	intrón1	475279	rs1233556	F: CCTCTGCGAGAAGTCACTTGAA R: CCTCAGATAAGGATGCGACAGA	C > T	0,259	<i>Nla III</i>
	intrón1	474162	rs1233555	F: AGAAAGGCCCCAGCTCTAC R: GGACACGTTAGCCTGGGCTA	C > T	0,499	<i>Sau3A1</i>

Se describe la posición de cada SNP en el intrón 1, los partidores diseñados para su amplificación, los alelos polimórficos, la frecuencia de heterocigocidad y las endonucleasas de restricción utilizadas.

Table 2. Characteristics of the SNP chosen for the *Shh* gene

Gene	Region	Position	SNP	Primers	Allele	Het	Enzyme
Shh	Intron 1	475279	rs1233556	F: CCTCTGCGAGAAGTCACTTGAA R: CCTCAGATAAGGATGCGACAGA	C > T	0.259	<i>Nla III</i>
	Intron 1	474162	rs1233555	F: AGAAAGGCCCCAGCTCTAC R: GGACACGTTAGCCTGGGCTA	C > T	0.499	<i>Sau3A1</i>

These items are described: position of each SNP in intron 1; the designed amplification primers, polymorphic alleles, heterozygosis frequency, the restriction endonucleases used.

RESULTADOS

Para determinar la asociación entre *Shh* y FLPNS se hizo un análisis de tríos caso-progenitores para determinar los alelos, haplotipos y genotipos transmitidos de padres a hijos mediante la técnica de heterodúplex. En la muestra de 150 tríos caso-progenitores, el análisis de los geles MDE-CSG no mostraron bandas retardadas en su migración.

RESULTS

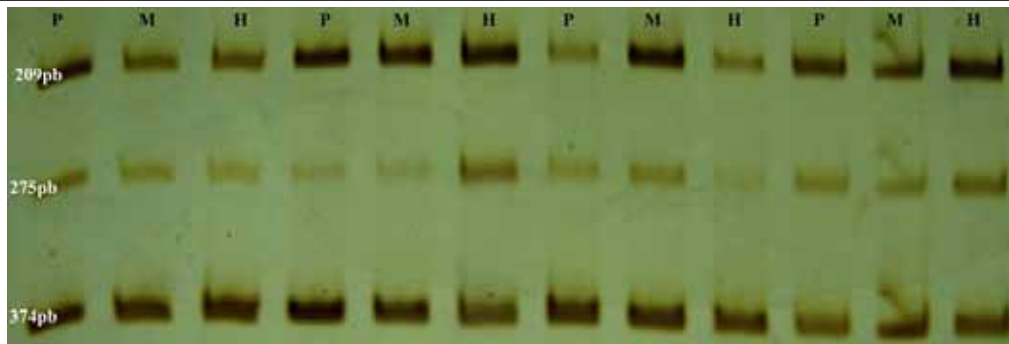
In order to establish *Shh*-NSCLP associations, a case-parent trio analysis was performed to identify alleles, haplotypes, and genotypes transmitted from parents to children, by means of the heteroduplex technique. In the sample of 150 case-parent trios, analysis of MDE-CSG gels did not show bands delayed in their migration.

La ausencia de bandas retardadas es sinónimo de ausencia de heterodúplex, lo cual indica que no se detectaron apareamientos erróneos de bases (mismatches) para los diferentes segmentos amplificados de las tres regiones exónicas e intrónicas adyacentes de *Shh* analizadas (figura 1).

Estos dos SNP se encuentran en el intrón 1 (el primer recuadro de color fucsia de izquierda a derecha en la figura 2) de *Shh*, fueron seleccionados por su mayor frecuencia en la población asiática y europea utilizando las bases de datos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI) y Proyecto Internacional HapMap. *Shh*: *Sonic hedgedhog*.

Absence of delayed bands means absence of heteroduplex, suggesting that no mismatches were detected on the amplified segments of the three analyzed exonic and intronic regions adjacent to *Shh* (figure 1).

These two SNPs are located in intron 1 of *Shh* (the first fuchsia box from left to right in figure 2). They were selected due to their high frequency in Asian and European populations by using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database and the International Project HapMap. *Shh*: *Sonic hedgedhog*.



Dado los resultados obtenidos de este primer análisis, se hizo un análisis alternativo de dos SNP (rs1233555 y rs1233556) (figura 2). Estos SNP fueron seleccionados apoyados en las bases de datos descritas en materiales y métodos. El criterio de selección se basó en la frecuencia heteromórfica de estos SNP en la población asiática y europea, dada la composición étnica de la población chilena. Estos SNP estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Given the results obtained in this first analysis, an alternative analysis of two SNPs (rs1233555 and rs1233556) was performed (figure 2). These SNPs were selected from databases described in the materials and methods section. The selection criteria included heteromorphic frequency of these SNPs in Asian and European populations, given the ethnic composition of Chilean population. These SNP were in Hardy-Weinberg equilibrium.

Figura 1. Gel MDE para tres segmentos de *Shh*
Figure 1. MDE gel for three *Shh* segments



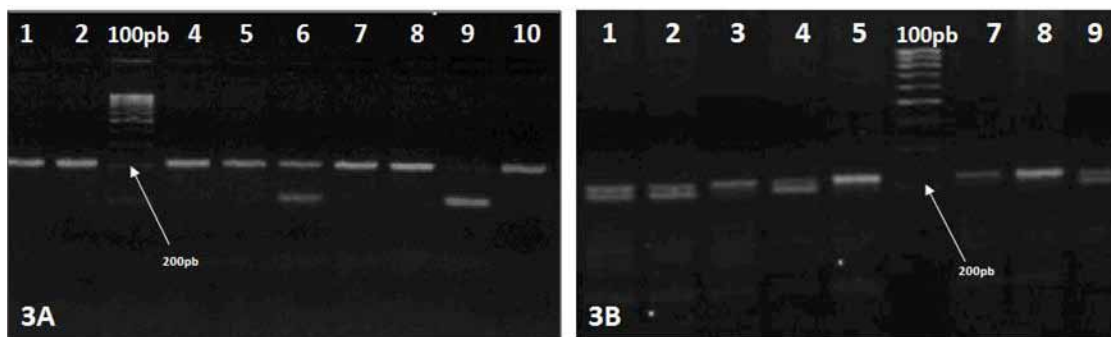
En cada carril se corrieron tres segmentos amplificados exónicos e intrónicos de *Shh* para cada uno de los individuos. P: padre, M: madre y H: hijo. No se observaron segmentos con movilidad alterada, tanto para este grupo como para el total de la muestra.

Three amplified *Shh* exonic and intronic segments were run on each lane for every individual. F: father, M: Mother, and C: child. No segments with altered mobility were observed in these groups or the whole sample.

Figura 2. SNPs rs1233555 y rs1233556
Figure 2. SNPs rs1233555 and rs1233556

Los alelos de los SNP rs1233555 y rs1233556 fueron C > T y C > T, respectivamente. En las figuras 3A y 3B, se observan los resultados de la endonucleasa de restricción NlaIII para nueve amplificados del SNP rs1233555 y Sau3A1 para ocho amplificados del SNP rs 1233556.

The alleles of SNPs rs1233555 and rs1233556 were C > T and C > T, respectively. Figures 3A and 3B show the results of NlaIII and Sau3A1 restriction endonuclease enzyme digests on nine amplified segments of SNP rs1233555 and eight amplified segments of SNP rs1233556 respectively.



En la figura 3A se observa un gel de agarosa con los resultados de la endonucleasa NlaIII sobre el SNP rs1233556. Se observa, en el carril 6 la muestra de un paciente con genotipo CT, en el carril 9 un genotipo TT y los otros carriles tienen genotipos CC. En la figura 3B se observan los resultados de Sau3A1 sobre el SNP rs1233555. En los carriles 1, 2, 4 y 9 se obtuvieron genotipos CT y en los carriles 3, 5, 6 y 7 genotipos CC.

Figure 3A shows an agarose gel and the result of NlaIII endonuclease enzyme digest on SNP rs1233556. Lane 6 shows the sample of a patient with genotype CT, lane 9 shows a TT genotype, and the other lanes represent CC genotypes. Figure 3B shows the action of Sau3A1 on SNP rs1233555. lanes 1, 2, 4, and 9 yielded CT genotypes, while lanes 3, 5, 6, and 7 show CC genotypes.

Figura 3. Acción de las endonucleasas sobre los SNPs rs1233555 y rs1233556

Figure 3. Endonucleases enzyme action on SNPs rs1233555 and rs1233556

En el gel de agarosa, de la figura 3A, se observa el resultado de Nla III sobre amplificados del SNP rs1233556, en donde se obtuvieron los genotipos CT, TT y CC. En el gel de agarosa, de la figura 3B, se observa el resultado de Sau3A1 sobre amplificados del SNP rs1233555, obteniéndose los genotipos CT y CC. La combinación de los genotipos de los dos SNP conformó los haplotipos CC, CT, TC y TT. Estos haplotipos no mostraron resultados significativos de asociación con la NSCLP (tabla 3).

NlaIII digest of the amplified segments of SNP rs1233556 may be observed in the agarose gel of figure 3A; the obtained genotypes were CT, TT and CC. Sau3A1 digest of the amplified segments of SNP rs1233555 may be observed in the agarose gel of figure 3B; the obtained genotypes were CT and CC. Combination of genotypes of both SNPs resulted in haplotypes CC, CT, TC and TT. These haplotypes did not show significant results in terms of association to NSCLP (table 3).

Tabla 3. Análisis de asociación alélica y haplotípica entre dos SNP de Shh y FLPNS

SNP	Alelo	Odds ratio (95% IC)	p a
s1233556	C	---	0,6393
	T	0,8636 (0,4526-1,648)	
rs1233555	C	---	0,5101
	T	0,8115 (0,4118-1,599)	

Haplotipo	Odds ratio (95% IC)	Ji cuadrado	p b
CC	---	0,7767	0,3781
CT	0,8075 (0,407-1,602)	0,511	0,4747
TC	0,8658 (0,4517-1,66)	0,2163	0,6419
TT	0,6992 (0,2718-1,799)	0,689	0,4065

a = valor de p de prueba de razón de verosimilitud (likelihood ratio test)

b = valor de p de Ji cuadrado

Table 3. Analysis of allele and haplotype association between two SNPs of Shh and NSCLP

SNP	Allele	Odds ratio (95% CI)	p a
s1233556	C	---	0.6393
	T	0.8636 (0.4526-1.648)	
rs1233555	C	---	0.5101
	T	0.8115 (0.4118-1.599)	

Haplotype	Odds ratio (95% CI)	Chi square	p b
CC	---	0.7767	0.3781
CT	0.8075 (0.407-1.602)	0.5110	0.4747
TC	0.8658 (0.4517-1.66)	0.2163	0.6419
TT	0.6992 (0.2718-1.799)	0.6890	0.4065

a = value of p of likelihood ratio test.

b = value of p of Chi square.

El análisis estadístico de alelos, genotipos y haplotipos no mostraron una transmisión preferencial de los mismos desde los progenitores a la progenie afectada. Estos resultados indican que no se detectó desequilibrio de ligamiento para los dos SNP analizados y por lo tanto no se detectó asociación entre la NSCLP y los marcadores utilizados (tabla 3).

DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue demostrar que *Shh* está asociado a NSCLP. Al inicio se utilizaron geles MDE-SGS en donde no se observaron bandas retardadas en la migración del ADN de ocho segmentos de *Shh* de 150 tríos. Lo que condujo a un análisis de dos SNP en el primer intrón de este gen, el cual presentó evidencias experimentales en el desarrollo del labio superior y paladar. El análisis de SNP no mostró ninguna asociación entre *Shh* y NSCLP.

La no asociación entre el gen *Shh* y la NSCLP entre alelos, genotipo y haplotipo pudo deberse a que las regiones analizadas no están involucradas en esta asociación, pero es posible que las regiones regulatorias corriente arriba o abajo no analizadas tengan alguna injerencia directa o indirecta en la asociación de *Shh* y NSCLP. Esta injerencia fue sugerida por las evidencias en estudios experimentales que han demostrado que *Shh* está involucrado en los eventos de la migración de las células de la cresta neural craneales (CNCC —del inglés Cranial Neural Crest Cells), en la formación de las estructuras medial craneales y en la transformación epitelio-mesénquima. Estos eventos intervienen en la diferenciación y formación de las estructuras embrionarias que dan origen al labio superior y paladar.

Mutaciones y haploinsuficiencias de este gen en peces, pollos y ratas alteran la migración de las células de la cresta neural craneal o la inducción posicional de las células ectomesenquimales craneales, lo cual afecta los mecanismos de inducción, iniciación y ejecución de los programas específicos de diferenciación entre las CNCC, generando fenotipos similares a NSCLP en humanos.^{16, 23, 27} Pero no solo mutaciones de *Shh* afectan estos eventos, también estarían modulados por reguladores transcripcionales que activan varios genes, los cuales interactúan con *Shh*.

The statistical analysis of alleles, genotypes, and haplotypes did not show their preferential transmission from parents to the affected progeny. These results suggest that no linkage disequilibrium was detected between the two SNPs analyzed in this study. Therefore there was not detected an association between NSCLP and the selected markers (table 3).

DISCUSSION

The purpose of this study was to demonstrate that *Shh* is associated to NSCLP.

Initially, we used MDE-SGS gels but did not observe bands delayed to ADN migration of eight segments of *Shh* of 150 trios. This led to the analysis of two SNPs on the first intron of this gene, which presented experimental evidences in the development of upper lip and palate. Analyses of the SNPs did not show *Shh*-NSCLP associations.

This lack of association between gene *Shh* and NSCLP among alleles, genotype and haplotype may be due to the fact that the analyzed regions are not involved in such association, but maybe the non-analyzed regulatory regions up and downstream have a direct or indirect influence on *Shh*-NSCLP associations. This influence has been suggested by experimental studies which demonstrated that *Shh* is implicated in cell migrations from Cranial Neural Crest Cells (CNCC), in the formation of middle cranial structures, and in the epithelial-mesenchymal transformation. These events intervene in the differentiation and formation of embryo structures that originate the upper lip and palate.

Mutations and haploinsuficiencias of this gene in fish, chicken, and rats alter cell migration from the cranial neural crest or the positional induction of cranial ecto-mesenchyme cells, affecting the mechanisms of induction, initiation, and execution of specific programs of differentiation among CNCCs and generating phenotypes similar to that of NSCLP in humans.^{16, 23, 27} But mutations of *Shh* are not the only ones that influence these conditions, there are also the ones modulated by transcriptional regulators which activate several genes that interact with *Shh*.

Por ejemplo, en una etapa posterior a la migración e inducción de las CNCC, la interacción de *Shh* con el factor de crecimiento fibroblástico 10 (FGF10) afecta la transformación epitelio-mesénquima, proceso clave en la producción de la fisura labiopalatina.⁷ Otro ejemplo es el caso de la proteína morfogenética ósea 4 (BMP4), que induce la expresión de *Shh* a nivel del epitelio del borde medial de las láminas palatinas, permitiendo su crecimiento y fusión.²¹ Por lo tanto, mutaciones o deficiencias funcionales de estos genes que interactúan con *Shh*, podrían alterar dichas relaciones y producir el fenotipo NSCLP, sin que esté afectado *Shh*. También es probable que modificaciones leves de *Shh* influyan drásticamente en la regulación de otros genes que intervienen en la etiología de la NSCLP. Estas regulaciones por otros genes sobre *Shh* o viceversa, insinúan una relación epistática entre esos genes en la etiología de NSCLP.^{45, 46} También, otro aspecto importante de considerar, es la presencia de este gen en el síndrome de la holoprosencefalia en humanos, interpretándose que *Shh* podría ser clave en el desarrollo craneofacial dependiendo del tiempo y ambiente embrionario. Mutaciones de *Shh* severas o en estadios embrionarios tempranos podrían ser conducidas hacia síndromes acompañados de fisuras labiopalatinas, mientras que mutaciones o interacciones débiles con otros genes en estadios embrionarios tardíos, se derivarían en solo NSCLP. Podríamos especular entonces que las mutaciones o haploinsuficiencia en *Shh* no es un requisito único para producir NSCLP. Sin embargo, a diferencia de este estudio, Orioli y colaboradores encontraron mutaciones y polimorfismos de *Shh* relacionados con NSCLP.⁴⁷ Por otra parte, es posible que el tamaño muestral y la rigurosidad en el control de algunos factores inherentes a la población chilena produzca las diferencias en los resultados de asociación de *Shh* y NSCLP entre las dos poblaciones utilizadas en los dos estudios.

Por otro lado, el número de SNP utilizados pudo ser insuficiente, o faltó incluir otros ubicados en regiones regulatorias de *Shh* para determinar la asociación de este gen con NSCLP, o que la distribución de estos SNP en la población chilena presentan una frecuencia diferente a las poblaciones referidas en este estudio, lo que no permitió detectar fehacientemente un posible rol de *Shh* en la NSCLP.

For instance, at a later stage of migration and induction of CNCCs, interaction of *Shh* with fibroblast growth factor 10 (FGF10) affects epithelial-mesenchymal transformation, a key process in the production of labial-palatal fissures.⁷ Another example is the case of bone morphogenetic protein 4 (BMP4), that induces *Shh* expression in the epithelium of the medial edge epithelia of the palatal shelves enabling their growth and fusion.²¹ Therefore, mutations or functional deficiencies of these *Shh*-interacting genes may alter such relations and produce the NSCLP phenotype, even if the *Shh* is not affected. It is also probable that slight *Shh* modifications severely influence regulation of other genes that participate in the etiology of NSCLP. These regulations of *Shh* by other genes or vice versa indicate an epistatic relation among these genes in the etiology of NSCLP.^{45, 46} Another important aspect to consider is the presence of this gene in the holoprosencephaly syndrome in humans, suggesting that *Shh* would be critical for craniofacial development, depending on the embryo's stage and environment. *Shh* severe mutations or during early embryo stages could lead towards syndromes accompanied by labial-palatal fissures, while mutations or weak interactions with other genes in advanced embryo stages would result in NSCLP only. We could therefore speculate that mutations or haploinsufficiencies of *Shh* are not the only requisites for producing NSCLP. Nevertheless, in disagreement with the present study, Orioli et al found out *Shh* mutations and polymorphisms associated to NSCLP.⁴⁷ It is possible, however, that sample size and a rigorous control of some factors inherent to the Chilean population were the factors that produced different results in terms of *Shh*-NSCLP associations among the study populations in both studies.

Similarly, maybe the number of SNPs used was insufficient, or it was necessary to include other SNPs located at *Shh*-regulating regions in order to determine associations of this gene with NSCLP, or distribution of these SNPs in Chilean population present a frequency that differs from that of the reference populations, so it impeded clearly detecting a possible role of *Shh* in NSCLP.

No obstante, se considera necesario analizar las regiones reguladoras cis y promotora de *Shh*, donde también podrían ubicarse variantes que influyan en el fenotipo de la NSCLP.

Podemos concluir que la falta de asociación puede deberse a que la frecuencia de distribución de los SNP en la población chilena se diferencia de las poblaciones referidas, o que el número de SNP analizados fue insuficiente, o que faltó incluir las regiones no analizadas de *Shh*.

CORRESPONDENCIA

Ramiro J. Rincón R.
Facultad de Odontología
Universidad de Antioquia. Colombia
Correo electrónico: ramirojrr@gmail.com

Nevertheless, it is necessary to analyze cis-regulatory regions and *Shh*-promoting regions which could also contain variants that influence the NSCLP phenotype.

We could then conclude that this lack of association may be due to the fact that SNP distribution frequency among the Chilean population differs from that of reference populations, or that the number of SNP used was not sufficient, or that other non-analyzed *Shh* regions needed to be included.

CORRESPONDING AUTHOR

Ramiro J. Rincón R.
School of Dentistry
Universidad de Antioquia. Colombia
Email Address: ramirojrr@gmail.com

REFERENCIAS / REFERENCES

1. Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet* 2002; 61(4): 248-256.
2. Helms JA, Cordero D, Tapadia MD. New insights into craniofacial morphogenesis. *Development* 2005; 132: 851-861.
3. Chai Y, Maxson RE. Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn* 2006; 235: 2353-2375.
4. Radlanski RJ, Renz H. Genes, forces, and forms: mechanical aspects of prenatal craniofacial development. *Dev Dyn* 2006; 235(5): 1219-1229.
5. Hu D, Marcucio RS, Helms JA. A zone of frontonasal ectoderm regulates patterning and growth in the face. *Development* 2003; 130(9): 1749-1758.
6. Vasiri Sani F, Hallberg K, Harfe BD, McMahon AP, Linde A, Gritli-Linde A. Fate-mapping of the epithelial seam during palatal fusion rules out epithelial-mesenchymal transformation. *Dev Biol* 2005; 285(2): 490-495.
7. Murray JC, Schutte BC. Cleft palate: players, pathways, and pursuits. *J Clin Invest* 2004; 113(12): 1676-1678.
8. Rice R, Spencer-Dene B, Connor EC, Gritli-Linde A, McMahon AP, Dickson C et al. Disruption of *Fgf10/Fgfr2b*-coordinated epithelial-mesenchymal interactions causes cleft palate. *J Clin Invest* 2004; 113(12): 1692-1700.
9. Gritli-Linde A. Molecular control of secondary palate development. *Dev Biol* 2007; 301(2): 309-326.
10. Tolarová MM, Cervenka J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. *Am J Med Genet* 1998; 75(2): 126-137.
11. Vanderas AP. Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. *Cleft Palate J* 1987; 24(3): 216-225.
12. Nazer J, Aravena T, Cifuentes L. Malformaciones congénitas en Chile: un problema emergente (periodo 1995-1999). *Rev Med Chile* 2001; 129(8): 895-904.
13. Palomino HM, Palomino H, Cauvi D, Barton SA, Chakraborty R. Facial clefting and Amerindian admixture in populations of Santiago, Chile. *Am J Hum Biol* 1997; 9(2): 225-232(a).
14. Palomino H, Cerda-Flores RM, Blanco R, Palomino HM, Barton SA, De Andrade M et al. Complex segregation analysis of facial clefting in Chile. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1997; 17(2): 57-64(b).
15. Santagati F, Rijli FM. Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4(10): 806-818.
16. Jeong J, Mao J, Tenzen T, Kottmann AH, McMahon AP. Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes Dev* 2004; 18(8): 937-951.
17. Kang P, Svoboda KKH. Epithelial-Mesenchymal transformation during craniofacial development. *J Dent Res* 2005; 84(8): 678-690.
18. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 1995; 203: 253-310.

19. Brand M, Heisenberg C-P, Warga RM, Pelegri F, Karlstrom RO, Beuchle D et al. Mutations affecting development of the midline and general body shape during zebrafish embryogenesis. *Development* 1996; 123: 129-142.
20. Schilling TF, Kimmel CB. Musculoskeletal patterning in the pharyngeal segments of the zebrafish embryo. *Development* 1997; 124(15): 2945-2960.
21. Zhang Z, Song Y, Zhao X, Zhang X, Fermin C, Chen Y. Rescue of cleft palate in *Msx1*-deficient mice by transgenic *Bmp4* reveals a network of BMP and SHH signaling in the regulation of mammalian palatogenesis. *Development* 2002; 129(17): 4135-4146.
22. Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L et al. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *N Engl J Med* 2004; 351(8): 769-780.
23. Rice R, Connor E, Rice DPC. Expression patterns of hedgehog signalling pathway members during mouse palate development. *Gene Expr Patterns* 2006; 6(2): 206-212.
24. Haworth KE, Wilson JM, Grevellec A, Cobourne MT, Healy C, Helms JA et al. Sonic hedgehog in the pharyngeal endoderm controls arch pattern via regulation of *Fgf8* in head ectoderm. *Dev Biol* 2007; 303: 244-258.
25. Zhang W, Kang JS, Cole F, Yi MJ, Krauss RS. *Cdo* Functions at multiple points short article in the Sonic hedgehog pathway, and *cdo*-deficient mice accurately model human holoprosencephaly. *Dev Cell* 2006; 10(5): 657-665.
26. Helms JA, Kim CH, Hu D, Minkoff R, Thaller C, Eichele G et al. Sonic hedgehog participates in craniofacial morphogenesis and is down-regulated by teratogenic doses of retinoic acid. *Dev Biol* 1997; 187: 25-35.
27. Wada N, Javidan Y, Nelson S, Carney TJ, Kelsh RN, Schilling TF. Hedgehog signaling is required for cranial neural crest morphogenesis and chondrogenesis at the midline in the zebrafish skull. *Development* 2005; 132: 3977-3988.
28. Chiang C, Litington Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H et al. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 1996; 383: 407-413.
29. MacDonald ME, Abbott UK, Richman JM. Upper beak truncation in chicken embryos with the cleft primary palate mutation is due to an epithelial defect in the frontonasal mass. *Dev Dyn* 2004; 230(2): 335-349.
30. Takamiya M, Campos-Ortega JA. Hedgehog signalling controls zebrafish neural keel morphogenesis via its level-dependent effects on neurogenesis. *Dev Dyn* 2006; 235(4): 978-997.
31. Cordero D, Marcucio R, Hu D, Gaffield W, Tapadia M, Helms JA. Temporal perturbations in Sonic hedgehog signaling elicit the spectrum of holoprosencephaly phenotypes. *J Clin Invest* 2004; 114(4): 485-494.
32. Maity T, Fuse N, Beachy PA. Molecular mechanisms of Sonic hedgehog mutant effects in holoprosencephaly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(47): 17026-17031.
33. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog signaling. *J Cell Sci* 2007; 120: 3-6.
34. Nanni L, Ming JE, Bocian M, Steinhaus K, Bianchi DW, Die-Smulders C et al. The mutational spectrum of the Sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: *Shh* mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. *Hum Mol Genet* 1999; 8(13): 2479-2488.
35. Chamoun Z, Mann RK, Nellen D, Von Kessler DP, Bellotto M, Beachy PA et al. Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science* 2001; 293: 2080-2084.
36. Lee JD, Treisman JE. Sightless has homology to transmembrane acyltransferases and is required to generate active hedgehog protein. *Curr Biol* 2001; 11(14): 1147-1152.
37. Amanai K, Jiang J. Distinct roles of central missing and dispatched in sending the hedgehog signal. *Development* 2001; 128: 5119-5127.
38. Micchelli CA, The I, Selva E, Mogila V, Perrimon N, Rasp, a putative transmembrane acyltransferase, is required for Hedgehog signaling. *Development* 2002; 129(4): 843-851.
39. Gallet A, Rodríguez R, Ruel L, Therond PP. Cholesterol modification of hedgehog is required for trafficking and movement, revealing an asymmetric cellular response to hedgehog. *Dev Cell* 2003; 4: 191-204.
40. Chen MH, Lin Y-J, Kawakami T, Xu SM, Chuang PT. 2004. Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev* 2004; 18: 641-659.
41. Nieuwenhuis E, Hui CC. Hedgehog signaling and congenital Malformations. *Clin Genet* 2005; 67(3): 193-208.
42. Moore-Scott BA, Manley NR. Differential expression of Sonic hedgehog along the anterior-posterior axis regulates patterning of pharyngeal pouch endoderm and pharyngeal endoderm-derived organs. *Dev Biol* 2005; 278(2): 323-335.
43. Yamagishi C, Yamagishi H, Maeda J, Tsuchihashi T, Ivey K, Hu T et al. Sonic hedgehog is essential for first pharyngeal arch development. *Pediatr Res* 2006; 59(3): 349-354.
44. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
45. Ferguson MWJ. Craniofacial malformations: towards a molecular understanding. *Nature Genet* 1994; 6: 329-330.
46. Ito Y, Yeo JY, Chytil A, Han J, Bringas P Jr, Nakajima A et al. Conditional inactivation of *Tgfb β 2* in cranial neural crest causes cleft palate and calvaria defects. *Development* 2003; 130: 5269-5280.
47. Orioli IM, Vieira AR, Castilla EE, Ming JE, Muenke M. Mutational analysis of the Sonic hedgehog in 220 newborns with oral clefts in a south American (ECLAMC) population. *Am J Med Genet* 2002; 108(1): 12-15.