

Análisis mutacional del gen Homeobox de segmento muscular 1 (MSX1) en chilenos con fisuras orales

Alexandre R Vieira^a, Silvia Castillo Taucher, Teresa Aravena, Carmen Astete, Patricia Sanz, María Eugenia Tastets^b, Luis Monasterio, Jeffrey C Murray

Mutational analysis of the muscle segment homeobox gene 1 (MSX1) in Chilean patients with cleft lip/palate

Background: Mutations of the MSX1 gene may contribute to non-syndromic forms of cleft lip and/or cleft palate. **Aim:** To search for mutations of MSX1 coding regions, including one highly conserved non-coding region in the single intron, among Chilean patients with cleft lip/palate. **Patients and Methods:** We studied 45 patients with cleft lip/palate and their parents. Oral mucosa samples were obtained with a swab. DNA was extracted and amplified by PCR. **Results:** Two missense mutations (G16D and G34A) were identified in this study that may be useful for future admixture studies. The G16D mutation appears to disrupt a possible splicing site and may contribute to clefting in this population. **Conclusions:** Rare MSX1 mutations are found in some cases of cleft lip and/or cleft palate but others remain to be found most likely in other regulatory regions of the gene (Rev Méd Chile 2004; 132: 816-22). (**Key Words:** Abnormalities, multiple; Cleft lip; Genome library; MSX1 gene; Mutation, missense).

Recibido el 18 de junio, 2003. Aceptado en versión corregida el 27 de enero, 2004.
Financiamiento por proyectos NIH DE 08559-12, P60 DE 13076-02 y DK 25295.
ARV es becario NIH 5 D43 TW05503.
Department of Pediatrics, University of Iowa, Iowa City, IA, USA.
Sección Genética, Hospital Clínico Universidad de Chile, Santiago, Chile.
Fundación Atención Integral Malformaciones Craneofaciales «Dr. Alfredo Gantz Mann»
^aCirujano Dentista
^bEnfermera

Correspondencia a: Jeffrey C Murray. Department of Pediatrics, University of Iowa. ML 2182. Iowa City, IA 52242. Fono: (319) 335-6897. Fax: (319) 335-6970. E-mail: jeff-murray@uiowa.edu

La fisura de labio con o sin fisura palatina (FL/P), y paladar fisurado aislado (FPA) no sindrómicos, son defectos comunes y de etiología diversa. Ocurren en 1/690 nacimientos en poblaciones sudamericanas^{1,2}. La población chilena ha sido intensamente estudiada en cuanto a las fisuras. Los cálculos de riesgo de recurrencia y análisis de segregación compleja para FL/P apoyan la hipótesis de genes mayores involucrados en la susceptibilidad de FL/P y FPA, en Chile³⁻⁷. Estudios previos han investigado posibles asociaciones entre FL/P y MSX1, TGFA (*transforming growth factor alpha*), TGFB3 (*transforming growth factor beta 3*), y marcadores para microsatélites ubicados en 4q, 6p, 17q y 19q⁷⁻¹⁸.

MSX1 ha sido propuesto como un candidato especialmente poderoso, basado en el fenotipo del ratón knockout (con ausencia del gen)¹⁹. Estudios de asociación de MSX1 con FL/P y FPA apoyan, adicionalmente, un rol de MSX1 en fisuras no sindrómicas^{17,18,20-23}. Un reporte en una familia holandesa con una mutación sin sentido en posición 105 en MSX1, que segrega en una forma autosómica dominante para fisura y agenesia dental, sugiere que, particularmente en casos familiares, pueden identificarse mutaciones en MSX1²⁴. Más recientemente, un tamizaje poblacional para mutaciones en MSX1 en 917 individuos fisurados, encontró mutaciones potencialmente etiológicas en 16, incluyendo mutaciones sin sentido en aminoácidos conservados y mutaciones puntuales en regiones conservadas no identificadas en algunos de 500 individuos controles secuenciados en este estudio²⁵.

Buscamos mutaciones en MSX1 en un grupo de pacientes con fisuras orales, para determinar si mutaciones en MSX1 pueden ser etiológicas (como aquella descrita en la familia holandesa)²⁴ en una parte sustancial de casos chilenos con fisura de labio y paladar.

MATERIAL Y MÉTODO

Fueron colectadas muestras de mucosa oral tomadas con un hisopo especialmente diseñado (Cytosoft Brush CP-5B) de 45 pacientes afectados y sus padres en la Fundación «Dr. Alfredo Gantz Mann» y la Sección Genética del Hospital Clínico Universidad de Chile, desde noviembre de 2000 hasta

diciembre de 2001. Este proyecto tuvo la aprobación institucional local del Comité de Revisión y consentimiento informado de todos los sujetos.

El ADN fue extraído de acuerdo a protocolos publicados²⁶ en el *Craniofacial Anomalies Research Center, University of Iowa*. Se realizaron PCRs en 10-25 µl volúmenes conteniendo 10-20 ng ADN/µl; 200 µM cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM Tris/HCl pH 8,3; 50 mM KCl; 0,001% (w/v) gelatina; 0,25-1,0 µM de cada partidor; y 0,01-0,02 unidades Taq polimerasa/µl. A continuación del ensamblaje, las reacciones fueron cubiertas con 50 µl de aceite mineral.

Siguiendo la amplificación del ADN, ocho pares de partidores traslapados, abarcando los dos exones de MSX1, fueron amplificados y revisados en todas las muestras de los casos y sus padres, en búsqueda de polimorfismos de conformación de única hebra (SSCPs)²¹. Además, también se examinó una sección de 400 pares de bases del intrón con 80% de homología de nucleótidos del ratón^{16,25}. Se realizó secuenciamiento directo de la región intrónica y de la primera serie del partidor del exón 1 y 2. No fueron posibles más secuenciaciones debido a limitaciones en la calidad de la muestra. Partidores de PCR no incorporados y trifosfatos de deoxinucleótidos en la muestra fueron eliminados antes de la secuenciación, por aislamiento de la banda deseada en un gel de agarosa al 2% acoplado a una columna de purificación²⁷. El ciclo de secuenciación fue realizado en una reacción de 20 µl, usando 4 µl de reactivo de secuenciación ABI Big Dye Terminator (versión 2 o versión 3), 1 µl de 5 µM de partidor de secuenciación, 1 µl DMSO, 4 µl de 2,5 X Buffer, y 2,5 ng/100 bp de templado de ADN. Siguiendo el paso de denaturación a 96°C por 30 s, las reacciones fueron secuenciadas en ciclo a 96°C por 10 s, 50°C por 5 s, y 60°C por 4 min por 40 ciclos. El aseo de químicos de la versión 2 fue realizado utilizando columnas de giro Centriprep (Princeton Separations, Adelphia, NJ). Los productos fueron evaporados hasta secarlos bajo presión (Savant Instruments, Farmingdale, NY), resuspendidos en 2-4 µl buffer de carga, calentados por 4 min a 95°C y 1 µl cargado en un secuenciador Applied Biosystems 373SL. El aseo de los químicos versión 3 fue realizado en una plancha Multiscreen Sequence, 384 *well format* (Millipore,

Bedford, MA), resuspendido en 40 ul, y 2,5 ul inyectado en un secuenciador Applied Biosystems 3700.

Se utilizó el *software* de secuenciación ABI (versión 2.1.2) para localizar sendas y *first pass base calling* (Perkin Elmer). Los cromatogramas fueron transferidos a una estación de trabajo Unix (Sun Microsystems Inc., Mountain View, CA), de referencia con PHRED (versión 0.961028), ensamblado con PHRAP (versión 0.960731), escaneado por POLYPHRED (versión 0.970312) y los resultados visualizados con el programa CONSED (versión 4.0)²⁸.

RESULTADOS

Había 27 pacientes con fisura labiopalatina, siete con fisura palatina aislada, tres con fisura labial únicamente, cuatro con una fisura submucosa de paladar,

dos con secuencia de Robin, uno con fisura palatina y anomalías de VATER (alteraciones vertebrales, atresia anal, fistula traqueoesofágica, alteraciones renales) y uno con una fisura facial como una de las manifestaciones de un síndrome orofaciodigital. Un resumen de las variantes de MSX1 encontrados en este estudio puede verse en la Tabla 1.

Se encontraron dos mutaciones sin sentido: G16D y G34A. La mutación G34A fue descrita antes en individuos no afectados y es un sitio polimórfico conocido²¹. La mutación G16A también fue descrita previamente pero sólo en dos individuos no afectados^{7,25}. En el presente estudio, cuatro individuos presentaron la mutación G16D y sólo uno tenía una fisura (su madre también es portadora de la variante). Sin embargo, el individuo afectado no tenía copias del alelo común. Este paciente era un heterocigoto para el sitio polimórfico de repetición CA (alelos 173 bases pares -171 bases pares)²⁹. La Figura 1

Tabla 1. Polimorfismos del gen MSX1 en pacientes chilenos con fisuras orales

Sitio	Frecuencia*	Cambio nucleótido	Aminoácido	Detectado antes
36 bases pares de la iniciación de la traducción del codón	0,1375	G → A	--	Si ²¹
Exón 1	0,027	G → A	Gly16Asp	Si ^{16,25}
Exón 1	0,025	C → G	Gly34Ala	Si ^{21,37}
Exón 2	0,0625	G → A	Leu181Leu	Si ²¹
6 bases pares después del codón de término	0,265	C → T	--	Si ^{21,37}

*Las frecuencias han derivado de los padres no afectados disponibles para el estudio.

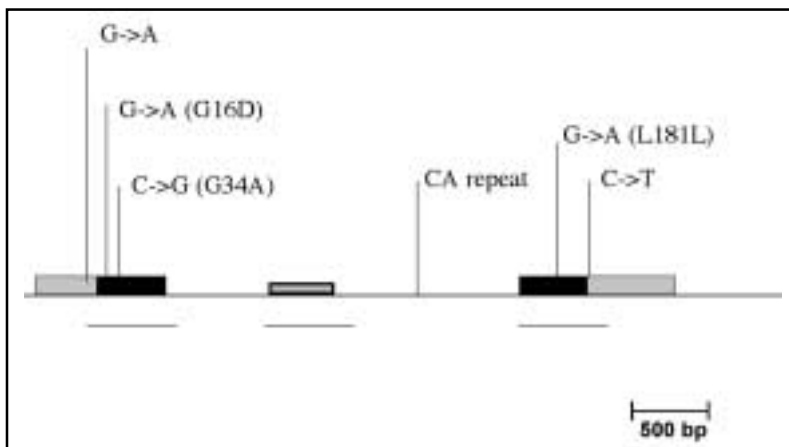


FIGURA 1. Representación esquemática del gen humano MSX1 y ubicación de las variantes encontradas en este estudio. Cajas negras son exones, cajas grises son regiones 5' and 3' no traducidas, caja gris con márgenes negros es la región intrónica homóloga humano-ratón. Subrayados indican regiones del gen que fueron revisados en este estudio.

muestra un diagrama del gen MSX1, indicando las regiones estudiadas para mutaciones y los sitios polimórficos encontrados.

Para la mutación G16D, se realizaron dos experimentos bioinformáticos, intentando validar el potencial rol etiológico de esta variante. Usamos el *software* ESEfinder disponible en línea en <http://www.exon.cshl.org/ESE/> para predecir la presencia de incrementadores de clivaje exónico (ESEs), que parecen ser muy prevalentes, y podrían estar presentes en la mayoría, si no en todos los exones^{30,31}. Para el sitio de la variante G47A (G16D), la secuencia silvestre parece contener una secuencia exónica incrementadora TTCGGC que, se piensa, sirve como sitio de unión para una proteína específica rica en serina/arginina - SRp55 (score= 3.018034; mínimo umbral= 2.676). La secuencia mutada destruye esta secuencia exónica incrementadora y crea una nueva (CGACAAG; score= 4.578333; mínimo umbral= 2.67) para una proteína diferente, rica en serina/arginina, SRp40.

Segundo, usamos el servidor analizador de secuencia de proteínas (PAS) (<http://bmerc-www.bu.edu/psa/>) para predecir probables estructuras secundarias de la proteína y comprobar si la mutación G16D alteraría la estructura vaticinada³²⁻³⁴. MSX1 parece tener una hebra desde los aminoácidos 8 a 11 que forman un lazo desde los aminoácidos 12 a 27 y luego un espiral que comienza en la posición 28. No hay cambios sustanciales de este patrón en la secuencia mutante G16D.

DISCUSIÓN

Las muestras incluidas en este estudio provenían principalmente de individuos con fisura labiopalatina aislada. A pesar de que, históricamente, la fisura palatina aislada ha sido separada etiológica y embriológicamente de las fisuras que comprometen el labio o el labio y la porción anterior del paladar óseo, trabajos recientes sugieren que esto puede no ser una división absoluta. Muchos estudios han desarrollado análisis separados para FL/P y FPA, pero una mutación sin sentido en MSX124 tenía ambas, fisura aislada de labio y fisura palatina aislada en la misma genealogía. También el síndrome van der Woude³⁵, una forma

mendeliana monogénica de fisura, incluye ambas, fisura aislada de labio y fisura palatina, sugiriendo al menos que algunos mecanismos para fisura labial pueden ser compartidos para fisura palatina. Tampoco excluimos casos de fisurados con anomalías asociadas porque creemos que mutaciones en MSX1 podrían contribuir tanto a formas aisladas como sindrómicas de fisuras como se evidencia en una mutación de término que causa el síndrome de Witkop³⁶.

Este trabajo muestra que mutaciones en las regiones codificantes de MSX1 no son una causa común de fisuras en la población chilena. En un caso, quizá, un defecto en MSX1 contribuye a la fisura en asociación con otra variante en un gen diferente. Este paciente es un heterocigoto para la mutación en G16D y para el sitio polimórfico de repeticiones CA (alelos de 173 bases pares - 171 bases pares)²⁹. El alelo de 173 bases pares había sido asociado con fisura en estudios previos en la población chilena^{12,16}.

El aminoácido 16 de la proteína MSX1 no está conservado entre humanos y ratones, sin embargo, ambos, humanos y ratones, tienen un aminoácido no polar en esta posición (ambos *Mus musculus* y *Ratus norvegicus* tienen una alanina). *Bos Taurus* (vaca) tiene también una glicina en esta posición, y *Gallus gallus* (gallina) tiene una serina, un aminoácido polar no cargado del grupo hidroxilo. La mutación en G16D cambia un aminoácido polar no cargado por un ácido polar cargado, y teniendo dos copias del alelo mutado, o ninguna copia del alelo normal podría ser el defecto causante de la enfermedad.

La mutación G16D no parece alterar la estructura proteica de MSX1 de acuerdo a la predicción del servidor PAS³²⁻³⁴, sin embargo, el cambio de guanina a adenina en la posición 47 parece interferir un posible incrementador exónico y puede crear un nuevo sitio de clivaje del ADN. Se piensa que los incrementadores exónicos sirven como sitios de unión para proteínas específicas ricas en serina/arginina, una familia de factores de clivaje estructuralmente relacionados y altamente conservados, caracterizados por uno o dos motivos de reconocimiento de ARN y por un dominio C-terminal distintivo altamente enriquecido en dipéptidos arginina/serina (el dominio RS). Los motivos de reconocimiento de ARN median unio-

nes secuencia-específicas al ARN, y así determinan especificidad de sustrato, mientras el dominio RS parece estar comprometido principalmente en interacciones proteína-proteína. Las proteínas ricas en serina/arginina que ligan a incrementadores exónicos de clivaje pueden promover definición exónica por reclutamiento directo de la maquinaria de clivaje a través de su dominio RS o por antagonizar la acción de elementos silenciadores cercanos^{30,31}. El cambio G47A podría contribuir a la fisura si desbarata la especificidad del mecanismo de clivaje. Debido a que los individuos heterocigotos típicamente no presentan fisura, se requeriría ya sea la mutación G16D junto con otra variante genética en otro gen para producir fisura o la forma homocigota de la mutación podría producir el defecto.

Frecuencias presentadas en la Tabla 1, proceden de padres sanos de casos fisurados y pueden tener un sesgo de selección. Un grupo control chileno no afectado y sin historia familiar de fisuras podría presentar frecuencias diferentes. La asociación entre fisuras orales y la repetición MSX1-CA previamente descrita en Chile^{12,16} podría estar reflejada en frecuencias sesgadas hacia el aumento, si las variantes descritas en la Tabla 1 están en desequilibrio de ligamiento con la variante de repeticiones MSX1-CA.

La frecuencia del cambio 6 bases pares después del codón de finalización es de 26,5% en el presente estudio (Tabla 1), lo que es mayor que las frecuencias reportadas anteriormente para sudamericanos (13,4%), norteamericanos de Iowa (23%), y filipinos (7,1%)^{7,25}. Se ha demostrado que esta variante está en completo desequilibrio de ligamiento con la repetición en una población de Iowa²⁵, en un moderado desequilibrio de ligamiento en una población sudamericana⁷, y en un débil desequilibrio de ligamiento en filipinos²⁵.

La frecuencia de G34A en nuestro estudio (2%, Tabla 1) es mayor que la frecuencia reportada en estudios previos con poblaciones sudamericanas (que eran menores a 1%)^{7,25}, sin embargo, es mucho más baja que la frecuencia de 20% reportada por el CEPH (*Centre d'étude du polymorphisme*

humain) en población procedente de Europa³⁷. Se ha mostrado que la variante G34A está en moderado desequilibrio de ligamiento con la repetición MSX1-CA en los filipinos, pero en débil desequilibrio de ligamiento en poblaciones de Iowa y sudamericanas^{7,25}.

Estas diferencias pueden estar dadas por sesgos de selección, pero pueden reflejar diferencias reales encontradas específicamente en Chile.

Hasta la fecha, la rara mutación G16D sólo ha sido encontrada en sudamericanos^{7,25} (más de 500 individuos no afectados de muchas poblaciones diferentes fueron investigados en estos estudios previos). Esto es un indicio de que este polimorfismo es población-específico, probablemente relacionado al ancestro amerindio. Las primeras dos personas descritas con esta variante pertenecían a la tribu Karatiana localizada en el estado de Rondônia en Brasil y la segunda al estado de São Paulo, Brasil^{7,25}. Trabajos previos realizados en Chile correlacionan el ancestro amerindio y el riesgo a las fisuras³⁸, y quizá las variantes G16D y G34A pudieran ser marcadores de miscegenación que puedan ser utilizados en estudios futuros.

Estudios previos en la población chilena apoyan la hipótesis que la variación genética en el *locus* MSX1 es un gen predisponente involucrado en la susceptibilidad, dependiente del sexo a las fisuras y que también diferencia familias simplex (con un solo afectado) de multiplex (varios afectados)^{12,15}. Los hallazgos positivos para la asociación entre el *locus* MSX1 y fisura^{7,18,20-23} sugieren que hay más mutaciones a ser encontradas en MSX1, y así, regiones regulatorias conservadas adicionales serán importantes de identificar en el futuro. Alternativamente, una de las variantes polimórficas descritas mostrando desequilibrio de ligamiento, ya sea por sí mismas (la repetición CA intrónica) o en desequilibrio con aquella variante, puede ser el alelo predisponente. Repeticiones de dinucleótidos y tetranucleótidos pueden ocasionalmente alterar la expresión génica en líneas celulares humanas y de ratas^{39,40}, sugiriendo que el análisis funcional de esta región será importante.

REFERENCIAS

1. LÓPEZ-CAMELO JS, ORIOLI IM. Heterogeneous rates for birth defects in Latin America: hints on causality. *Genet Epidemiol* 1996; 13: 469-81.
2. NAZER H, HÜBNER G, CATALÁN M, CIFUENTES O. Incidencia de labio leporino y paladar hendido en la maternidad del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y en las maternidades chilenas participantes en el Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas (ECLAMC) período 1991-1999. *Rev Méd Chile* 2001; 129: 285-93.
3. BLANCO R, PALOMINO H, RAMEAU MX, IÑIGUEZ RUIZ A, JARA L. Evidencia de un gen mayor en la susceptibilidad a la fisura labiopalatina mediante análisis segregacional en la población chilena. *Rev Méd Chile* 1993; 121: 1258-68.
4. PALOMINO H, CERDA-FLORES RM, BLANCO R, PALOMINO HM, BARTON SA, ANDRADE M ET AL. Complex segregation analysis of facial clefting in Chile. *J Craniofac Genet Develop Biol* 1997; 17: 57-64.
5. BLANCO R, ARCOS-BURGOS M, PAREDES M, PALOMINO H, JARA L, CARREÑO ET AL. Complex segregation analysis of nonsyndromic cleft lip/palate in a Chilean population. *Genet Mol Biol* 1998; 21: 139-44.
6. PALOMINO H, GUZMÁN E, BLANCO R. Recurrencia familiar de labio leporino con o sin fisura velopalatina de origen no sindrómico en poblaciones de Chile. *Rev Méd Chile* 2000; 128: 286-93.
7. VIEIRA AR. *Estudos epidemiológico, genético e molecular de fendas orais em populações latino-americanas*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.
8. JARA L, BLANCO R, CHIFFELLE I, PALOMINO H, CURTIS D. Fisura labiopalatina en población chilena: asociación con polimorfismo BamH1 del gen factor transformante del crecimiento alfa (TGFA). *Rev Méd Chile* 1993; 121: 390-5.
9. JARA L, BLANCO R, CHIFFELLE I, PALOMINO H, CARREÑO H. Association between alleles of the transforming growth factor alpha locus and cleft lip and palate in the Chilean population. *Am J Med Genet* 1995; 57: 548-51.
10. JARA L, BLANCO R, CHIFFELLE I, PALOMINO H, CARREÑO H. Evidence for an association between RFLPs at the transforming growth factor alpha (locus) and nonsyndromic cleft lip/palate in a South American population. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 339-41.
11. BLANCO R, JARA L, VILLASECA C, OBREQUE V, CARREÑO H. Cleft lip/palate: allele frequencies of MSX-1, TGFA and D17S579 in cases their relatives and controls in the Chilean population. *Rev Bras Genet* 1996; 19: 219.
12. BLANCO R, JARA L, VILLASECA MC. Asociación entre la variación genética de MSX1 (Hox-7) y la fisura labiopalatina no sindrómica en población chilena. *Rev Méd Chile* 1998; 126: 637-45.
13. BLANCO R, JARA L, VILLASECA C, PALOMINO H, CARREÑO H. La variación genética de MSX1 presenta un dimorfismo sexual en la fisura labiopalatina no sindrómica en la población chilena. *Rev Méd Chile* 1998; 126: 781-7.
14. CARREÑO H, PAREDES M, TELLEZ G, PALOMINO H, BLANCO R. Estudio de asociación entre la fisura labiopalatina no sindrómica y marcadores de microsatélite ubicados en 6p. *Rev Méd Chile* 1999; 127: 1189-98.
15. PAREDES M, CARREÑO H, SOLÁ JA, SEGU J, PALOMINO H, BLANCO R. Asociación entre el fenotipo fisura labiopalatina no sindrómico y marcadores de microsatélite ubicados en 4q. *Rev Méd Chile* 1999; 127: 1431-8.
16. BLANCO R, CHAKRABORTY R, BARTON SA, CARREÑO H, PAREDES M, JARA L ET AL. Evidence of a sex-dependent association between the MSX1 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Chilean population. *Hum Biol* 2001; 73: 81-9.
17. CARREÑO H, SUAZO J, PAREDES M, SOLÁ J, VALENZUELA J, BLANCO R. Asociación entre el fenotipo fisura labiopalatina no sindrómica y marcadores de microsatélites ubicados en 6p, 17q y 19q. *Rev Méd Chile* 2002; 130: 35-44.
18. VIEIRA AR, ORIOLI IM, CASTILLA EE, COOPER ME, MARAZITA ML, MURRAY JC. MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America. *J Dent Res* 2003; 82: 289-92.
19. SATOKATA I, MAAS R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nature Genet* 1994; 6: 348-55.
20. MAESTRI NE, BEATY TH, HETMANSKI J, SMITH EA, MSINTOSH I, WYSZYNSKI DF ET AL. Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: including candidate genes and environmental exposures in the models. *Am J Med Genet* 1997; 73: 337-44.
21. LIDRAL AC, ROMITTI PA, BASART AM, DOETSCHMAN T, LEYSSENS NJ, DAACK-HIRSCH S ET AL. Association of

- MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 557-68.
22. ROMITTI PA, LIDRAL AC, MUNGER RG, DAACK-HIRSCH S, BURNS TL, MURRAY JM. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology* 1999; 59: 39-50.
 23. BEATY TH, WANG H, HETMANSKI JB, FAN YT, ZEIGER JS, LIANG KY ET AL. A case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland. *Ann Epidemiol* 2001; 11: 434-42.
 24. VAN DEN BOOGAARD MJH, DORLAND M, BEEMER FA, VAN AMSTEL HKP. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nature Genet* 2000; 24: 342-3.
 25. JEZEWSKI P, VIEIRA AR, NISHIMURA C, LUDWIG B, JOHNSON M, O'BRIEN SE ET AL. Complete sequencing demonstrates a role for MSX1 in nonsyndromic cleft lip and palate. *J Med Genet* 2003; 40: 399-407.
 26. RICHARDS B, SKOLETSKY J, SHUBER AP, BALFOUR R, STERN RC, DORKIN HL ET AL. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 159-63.
 27. PARKER LT, ZAKERI H, DENG Q, SPURGEON S, KWOK PY, NICKERSON DA. AmpliTaq DNA polymerase, FS dye-terminator sequencing: analysis of peak height patterns. *Biotechniques* 1996; 21: 694-9.
 28. NICKERSON DA, TOBE VO, TAYLOR SL. PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 2745-51.
 29. PADANILAM BJ, STADLER HS, MILLS KA, MCLEOD LB, SOLURSH M, LEE B ET AL. Characterization of the human Hox7 cDNA and identification of polymorphic markers. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 407-10.
 30. BLENCOWE BJ. Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 106-10.
 31. GRAVELEY BR. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* 2000; 6: 1197-211.
 32. STULTZ CM, WHITE JV, SMITH TF. Structural analysis based on state-space modeling. *Protein Sci* 1993; 2: 305-14.
 33. WHITE JV, STULTZ CM, SMITH TF. Protein classification by stochastic modeling and optimal filtering of amino-acid sequences. *Mathematical Biosci* 1994; 119: 35-75.
 34. STULTZ CM, NAMBUDRIPAD R, LATHROP RH, WHITE JV. Predicting protein structure with probabilistic models. In: Allewell N, Woodward C, ed. *Protein structural biology in bio-medical research*, Greenwich: JAI Press, 1997; 447-506.
 35. SCHUTTE BC, MURRAY JC. The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1853-9.
 36. JUMLONGRAS D, BEI M, STIMSON JM, WANG WF, DEPALMA SR, SEIDMAN CE ET AL. A nonsense mutation in MSX1 causes Witkop syndrome. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 67-74.
 37. HOLLWAY GE, MULLEY JC. Polymorphic variants within the homeobox gene MSX1: a candidate gene for developmental disorders. *Clin Genetics* 1998; 54: 152-4.
 38. 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: 225-32.
 39. ALBANESE V, BIGUET NF, KIEFER H, BAYARD E, MALLET J, MELONI R. Quantitative effects on gene silencing by allelic variation at a tetranucleotide microsatellite. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1785-92.
 40. ROTHENBURG S, KOCH-NOLTE F, RICH A, HAAG F. A polymorphic dinucleotide repeat in the rat nucleolin gene forms Z-DNA and inhibits promoter activity. *Proc Nat Acad Sci* 2001; 98: 8985-90.

Agradecimientos

Queremos agradecer especialmente la buena voluntad de los individuos afectados y sus familiares a participar en este estudio. La referencia 7 está disponible por solicitud para los lectores.