

Asociación entre polimorfismos del gen NAT2 y fisura labiopalatina no sindrómica en Argentina

MARÍA RITA SANTOS^{1,a}, VIRGINIA RAMALLO^{1,a}, MARINA MUZZIO^{1,a},
JORGE S. LÓPEZ CAMELO^{1,2,b}, GRACIELA BAILLIET^{1,a}

Association between NAT2 polymorphisms with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in Argentina

Background: NAT genes are considered candidate genes for the genetic predisposition to non-syndromic Cleft lip with or without cleft palate (NSCLP), since they codify for N-acetyltransferases, enzymes responsible for the biotransformation of arylamines, hydrazine drugs, and a great number of toxins and carcinogens present in diet, cigarette smoke, and environment. **Aim:** To determine the association between alleles determining slow acetylator phenotype and the risk of NSCLP. **Material and Methods:** We analyzed *5 (481C>T), *6 (590G>A) and *7 (857G>A) alleles which determine the slow acetylator phenotype and *4 (wild type) allele by polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism in 97 progenitor-case trios of NSCLP in Argentinian Obstetric Wards. We evaluated the transmission disequilibrium (TDT). **Results:** TDT showed a positive association between allele *5 and NSCLP (odds ratio = 1,6; $p = 0,03$). **Conclusions:** The presence of *5 allele is significantly higher in cases with congenital NSCLP.

(Rev Med Chile 2015; 143: 444-450)

Key words: Arylamine N-Acetyltransferase; Cleft lip; Cleft palate.

¹Instituto de Biología Celular y Molecular (IMBICE). Centro de Investigaciones Científicas-Provincia de Buenos Aires (CICPBA). Centro Científico Tecnológico La Plata-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CCT-CONICET) La Plata, Argentina.

²Centro de Educación Médica e Investigación Clínicas "Norberto Quirno" (CEMIC), Buenos Aires, Argentina.

^aDoctor en Ciencias Naturales.

^bDoctor en Ciencias, especialidad Genética.

Fuente de apoyo financiero: CICPBA, CONICET, ANCyP.

Recibido el 16 de enero de 2014, aceptado el 6 de marzo de 2015.

Correspondencia a:

Dra. María Rita Santos
526 s/n entre 10 y 11.

Casilla 403.

Teléfono: 54 (0221) 4210112.

Celular: 54 (0221) 154005281.

mitasantos@yahoo.com.ar

La fisura labiopalatina no sindrómica (FLPNS) es un defecto congénito que presenta etiología multifactorial. Entre las probables causas que generan fisuras orales se encuentran factores genéticos (genes candidatos), factores ambientales o una combinación de ambos¹. La prevalencia de las fisuras orofaciales varía de 1/500 a 1/2.500, dependiendo del origen geográfico, la ancestría^{2,3} y de las condiciones socioeconómicas⁴. Las mayores frecuencias se registran en poblaciones asiáticas, 12-13/10.000 nacimientos para China, 16/10.000 en Japón. En Sudamérica, 10/10.000 nacidos vivos poseen alguna de estas afecciones (www.eclamc.org). En las poblaciones europeas la frecuencia es intermedia, en afro-descendientes se registran las más bajas, 3/10.000 nacimientos²⁻⁶.

A la fecha, existen una gran cantidad de estudios de factores ambientales y FLPNS. Sin embargo, ningún factor de riesgo ha demostrado una asociación contundente⁷. Un meta-análisis de 24 estudios caso-control y de cohortes evaluó la asociación entre el consumo materno de tabaco y el riesgo de fisuras orales en los nacimientos e identificó significancia estadística para consumo materno de tabaco y FLPNS (RR = 1,34; 95%; IC = 1,25-1,44) y consumo materno de tabaco y fisura palatina (RR = 1,22; 95%; IC = 1,10-1,35)⁸. La *N-acetiltransferasa 2* (NAT2) es una enzima metabolizadora de aminoras presentes en el humo del tabaco, participa en la detoxificación y/o activación de arilamidas encontradas en el medio ambiente, y algunas aminoras aromáticas producidas

durante la cocción de carnes⁹. La acción de las enzimas *NAT* puede producir iones electrofílicos capaces de inducir mutaciones en el ADN¹⁰. Nuestro objetivo es evaluar la asociación entre los alelos *5(481C>T), *6(590G>A) y *7(857G>A) del gen *NAT2* que determinan fenotipo acetilador lento y el riesgo de aparición de FLPNS. El alelo *4 salvaje es de referencia. Se utilizará un diseño de base familiar de tríos (caso, padre y madre) como un método adecuado para evaluar asociaciones genotipo-enfermedad y minimizar el efecto de la estructuración étnica de la muestra¹¹.

Materiales y Métodos

Los casos seleccionados presentan FLPNS como única anomalía. Los criterios de exclusión fueron casos sindrómicos, nacidos muertos y casos sindrómicos y no sindrómicos con paladar hendido solo. La muestra está conformada por 97 tríos caso-progenitores reunidos de un total de 423 individuos de maternidades argentinas participantes del Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas (ECLAMC)¹². La Tabla 1 muestra la composición de la muestra de tríos y progenitores según hospital, región y ciudad de localización. Los donantes voluntarios brinda-

ron su Consentimiento Informado. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del CEMIC.

Análisis molecular

Se extrajeron 10 ml de sangre periférica a cada caso y a sus respectivos progenitores. La purificación de ADN se realizó mediante *QiaAMP ADN blood midi kit de Quiagen* (<http://www.qiagen.com/system/404.aspx>). La identificación de las variantes alélicas se realizó mediante la técnica de PCR-RFLP de acuerdo a un protocolo previamente descrito (13). *5 (481C>T, rs1799929), *6 (590G>A, rs1799930) y *7 (857G>A, rs1799931) y el alelo de referencia *4¹⁴.

Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas y genotípicas se obtuvieron por conteo directo. Para la prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) se consideraron sólo los individuos no emparentados. Para determinar si existen diferencias genéticas entre poblaciones de distinto origen geográfico se realizó el análisis de la varianza molecular (AMOVA). Ambas pruebas fueron realizadas mediante el programa Arlequin (ver 3.0)¹⁵.

Para evaluar la asociación de los alelos con la malformación estudiada se empleó la Prueba de desequilibrio de transmisión (TDT, "Transmission

Tabla 1. Progenitores y tríos caso-progenitores participantes de las maternidades argentinas del ECLAMC

Hospital	Región	Ciudad	Progenitores	Tríos
318	Metropolitana	Buenos Aires	70	25
322	Metropolitana	Buenos Aires	6	-
325	Metropolitana	Lomas de Zamora	7	1
332	Metropolitana	Lanús Este	5	1
413	Pampa	Rosario	36	12
416	Pampa	La Plata	8	3
418	Patagonia	Bahía Blanca	13	4
614	Cuyo	San Luis	10	1
803	Nordeste	S.M de Tucumán	75	23
906	Patagonia	Esquel	10	2
907	Patagonia	El Bolsón	62	15
909	Patagonia	Bariloche	24	10
Total			326	97

Tabla 2. Frecuencias alélicas relativas del gen *NAT2* en maternidades Argentinas del ECLAMC

Hospital	Alelo *4		Alelo *5		Alelo *6		Alelo *7		N
	FR	n	FR	n	FR	n	FR	n	
318	0,35 ± 0,04	49	0,33 ± 0,04	46	0,12 ± 0,03	17	0,20 ± 0,03	28	140
322	0,33 ± 0,14	4	0,25 ± 0,13	3	0,25 ± 0,13	3	0,17 ± 0,11	2	12
325	0,43 ± 0,14	6	0,28 ± 0,12	4	0,08 ± 0,07	1	0,21 ± 0,11	3	14
332	0,10 ± 0,10	1	0,40 ± 0,16	4	0,10 ± 0,10	1	0,40 ± 0,16	4	10
413	0,29 ± 0,05	21	0,46 ± 0,06	33	0,12 ± 0,04	9	0,13 ± 0,04	9	72
416	0,12 ± 0,08	2	0,44 ± 0,13	7	0,25 ± 0,11	4	0,19 ± 0,10	3	16
418	0,20 ± 0,08	5	0,38 ± 0,10	10	0,27 ± 0,09	7	0,15 ± 0,07	4	26
614	0,60 ± 0,11	12	0,00	0	0,15 ± 0,08	3	0,25 ± 0,10	5	20
803	0,34 ± 0,04	51	0,37 ± 0,04	56	0,14 ± 0,03	21	0,15 ± 0,03	22	150
906	0,60 ± 0,11	12	0,20 ± 0,09	4	0,15 ± 0,08	3	0,05 ± 0,05	1	20
907	0,47 ± 0,04	58	0,25 ± 0,04	32	0,14 ± 0,03	17	0,14 ± 0,03	17	124
909	0,44 ± 0,07	21	0,33 ± 0,07	16	0,19 ± 0,06	17	0,04 ± 0,03	17	48
FR total	0,37 ± 0,02	242	0,33 ± 0,02	215	0,15 ± 0,02	95	0,15 ± 0,02	100	652

FR: Frecuencia relativa (n/N). n: Número de cromosomas con la variante alélica por Hospital. N: Número total de cromosomas por Hospital.

disequilibrium test)¹⁶. Esta prueba compara el número de veces que se transmite un alelo versus el número de veces que no se transmite de progenitores heterocigotos a la progenie afectada. Tiene la ventaja de ser robusta, aun cuando los datos no se encuentren en equilibrio de Hardy-Weinberg. El análisis de asociación se realizó con el programa informático Métodos Iterativos (programa desarrollado en el Departamento de Epidemiología Genética del CEMIC).

Resultados

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los progenitores se detallan en las Tablas 2 y 3 respectivamente. La prueba de H-W (Tabla 4) fue significativa en el hospital 318 ($p = 0,035$), este resultado puede deberse a que este hospital funciona como un Centro Perinatólogico de alta complejidad que recibe derivación de otros nosocomios y atiende grupos poblacionales diversos.

Al estudiar la distribución de frecuencias de las variantes alélicas de *NAT2* en las maternidades del ECLAMC, se pudo determinar que el coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) entre hospitales fue bajo (0,02). El 98% de variabilidad fue encontrada dentro de las maternidades y la

diferenciación entre grupos menor a 0,2% (datos no mostrados).

La Tabla 5 muestra el número absoluto de transmisiones y no transmisiones a los casos, a partir de los progenitores heterocigotos. De un total de 137 transmisiones parentales, el alelo *4 se transmitió 43 veces (30,9%), los alelos *5, *6 y *7 se transmitieron 53 (39,0%); 22 (16,1%) y 19 veces (14,0%), respectivamente. A partir de este análisis sólo observamos asociación positiva entre el alelo *5 y FLPNS (OR = 1,61; $p = 0,031$).

Discusión

Se sabe que la población contemporánea argentina es el resultado de múltiples interacciones ocurridas entre la población nativa del continente con poblaciones europeas y africanas^{17,18}. Para controlar el factor de confusión ancestralidad en nuestra muestra empleamos un diseño de tríos caso-progenitores donde el caso es comparado con un pseudocontrol pareado étnicamente¹¹.

Nuestros resultados evidencian la asociación significativa del alelo *5 y la malformación FLPNS. Los resultados hallados en la literatura son contradictorios. Lammer et al.¹⁹, en una muestra de la población de California (Estados Unidos

Tabla 3. Frecuencias relativas de los genotipos del gen *NAT2* en maternidades Argentinas del ECLAMC

Hospital	44		45		46		47		55		56		57		66		67		77		N
	FR	n	FR	n	FR	n	FR	n	FR	n	FR	n	FR	n	FR	n	FR	n	FR	n	
803	0,13	10	0,23	17	0,12	9	0,07	5	0,13	10	0,12	8	0,15	11	0,01	1	0,03	2	0,03	2	75
318	0,10	7	0,28	20	0,06	4	0,16	11	0,11	8	0,01	1	0,13	9	0,04	3	0,09	6	0,01	1	70
413	0,11	4	0,22	8	0,08	3	0,06	2	0,22	8	0,11	4	0,14	5	0,03	1	0,00	0	0,03	1	36
325	0,29	2	0,00	0	0,14	1	0,14	1	0,14	1	0,00	0	0,29	2	0,00	0	0,00	0	0,00	0	7
322	0,00	0	0,00	0	0,33	2	0,33	2	0,17	1	0,17	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	6
332	0,00	0	0,2	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,60	3	0,00	0	0,20	1	0,00	0	5
614	0,30	3	0,00	0	0,20	2	0,40	4	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,10	1	0,00	0	10
416	0,00	0	0,12	1	0,12	1	0,00	0	0,25	2	0,25	2	0,00	0	0,00	0	0,12	1	0,12	1	8
418	0,08	1	0,00	0	0,07	1	0,15	2	0,153	2	0,31	4	0,15	2	0,08	1	0,00	0	0,00	0	13
906	0,30	3	0,30	3	0,20	2	0,10	1	0,00	0	0,1	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	10
907	0,22	13	0,24	15	0,14	9	0,13	8	0,05	3	0,08	5	0,10	6	0,01	1	0,01	1	0,01	1	62
909	0,17	4	0,33	8	0,12	3	0,08	2	0,12	3	0,08	2	0,00	0	0,08	2	0,00	0	0,00	0	24
FR total	0,14	47	0,22	74	0,11	37	0,12	38	0,12	38	0,09	29	0,12	38	0,03	9	0,03	12	0,02	6	326
Fenotipos	Metabolizadores rápidos										Metabolizadores lentos										

FR: Frecuencia relativa (n/N). n: Número genotipos por Hospital. N: Número total de genotipos por Hospital.

Tabla 4. Prueba de Hardy-Weinberg en maternidades argentinas del ECLAMC

Hospital	Genotipos	Heterocigotas		p
		Observados	Esperados	
318	70	0,73	0,75	0,035
322	6	0,83	0,71	1,000
325	7	0,57	0,86	0,271
332	5	1,00	0,73	0,391
413	36	0,61	0,71	0,702
416	8	0,62	0,74	0,457
418	13	0,69	0,81	0,254
614	10	0,70	0,73	1,000
803	75	0,69	0,74	0,777
906	10	0,70	0,74	1,000
907	62	0,71	0,76	0,959
909	24	0,62	0,73	0,517

Tabla 5. Transmisión alélica de padres heterocigotas en 97 tríos caso-progenitores

Alelos	Transmitido	No transmitido	OR (95% IC)	TDI	P
*4	43	49	0,90 (0,59-1,35)	0,27	0,603
*5	53	33	1,61 (1,04-2,47)	4,65	0,031
*6	22	24	0,88 (0,50-1,56)	0,19	0,663
*7	19	31	0,61 (0,35-1,08)	2,88	0,090

*4: alelo salvaje.

de Norteamérica) no detectaron asociación entre FLPNS y variantes fetales del gen *NAT2* (OR = 0,85; IC = 0,57-1,3). También, Van Rooij et al.²⁰ determinaron el estatus acetilador a partir de la medición de metabolitos de cafeína en la orina, concluyendo que los individuos caracterizados como acetiladores lentos no presentaban riesgo para fisuras orales (OR = 1,0; IC = 0,4-2,3) en comparación con los acetiladores rápidos. Ambos estudios utilizaron metodología caso-control, susceptible de sesgo debido a la estratificación genética o mezcla racial de la población.

En estudios combinados caso-control y de tríos caso-progenitores en Noruega, Dinamarca y Iowa, se evidenció una transmisión preferencial de haplotipos portadores del SNP G590A (*6) en individuos con FLPNS^{21,22}. Zöllner et al.²³, utilizando análisis de ligamiento en 148 familias, demostraron evidencia de transmisión diferencial en varias regiones del genoma humano, en una de las cuales se encuentra ubicado el cromosoma 8, coincidiendo con la ubicación cromosómica de *NAT2*.

Los resultados discordantes de *NAT2* en los estudios de asociación podrían deberse a la existencia de heterogeneidad genética interpoblacional. Es probable que los diferentes genes candidatos involucrados en esta patología difieran en su importancia relativa en cada población analizada dependiendo de su origen étnico o geográfico.

No es posible descartar una asociación funcional de *NAT2* y FLPNS, sustentado por los resultados experimentales de expresión de *Nat* en la ventana temporal crítica del desarrollo del labio y el paladar^{24,25} y por ser *N-acetiltransferasa 2* una enzima involucrada en la detoxificación del tabaco, un factor que ha sido demostrado en la bibliografía como de riesgo para el desarrollo de esta anomalía⁸.

Dado el carácter multifactorial de la FLPNS, el análisis de las variantes del gen *NAT2* podría no ser suficiente como herramienta de evaluación de susceptibilidad. Sin embargo, nuestros resultados muestran que existe una transmisión preferencial del alelo *NAT2* *5 en niños con FLPNS de maternidades argentinas del ECLAMC.

Consideramos que el significado de una asociación positiva puede deberse a:

a) El alelo por sí mismo es el responsable de la susceptibilidad a la anomalía o b) el alelo asociado está en desequilibrio de ligamiento con el alelo de susceptibilidad.

En relación con la opción a), en Patagonia, en la misma población que hemos analizado este trabajo, a partir de un estudio de segregación compleja, Poletta²⁶ sugiere el efecto de un gen principal en la ocurrencia de FLPNS, cuya acción podría ser modificada por la acción de otro locus y/o de un factor de exposición ambiental. Este gen principal dominante tendría una baja penetrancia (6 a 15%) y la frecuencia del alelo de riesgo sería entre 1 y 9%, sumada a la de un componente multifactorial (o varianza residual familiar no explicada por el gen principal). Otro aporte, relevante para la interpretación de nuestros resultados, y que significó un hallazgo trascendental en el estudio de FLPNS, fue la evidencia de la contribución de *IRF6* a FLPNS²⁷. Estos autores evaluaron 8.003 individuos en 1.968 familias de poblaciones asiáticas, europeas y de Norte y Sudamérica. Este trabajo reveló que todos los genes que contribuyen a la anomalía FLPNS, que aún no han sido identificados, tienen efectos muy pequeños comparados con el de *IRF6* en la ocurrencia de FLPNS. En relación con los estudios de segregación de Poletta²⁶ y la evidencia reportada por Zuchero et al.²⁷, *NAT2* no es un factor necesario ni suficiente para la producción de FLPNS. Sin embargo, no podemos desestimar alguna participación en la generación de fisuras como parte de ese componente multifactorial o varianza residual no explicada por el gen principal.

Cuando el alelo asociado está en desequilibrio de ligamiento con el alelo de susceptibilidad, significa específicamente que existe una asociación no al azar entre dos marcadores alélicos heredados. En ausencia de selección, el grado de desequilibrio de ligamiento depende de dos factores: la distancia entre el marcador y la mutación que confiere susceptibilidad y el tiempo transcurrido tanto para la mutación que confiere susceptibilidad como para el marcador. Una reciente mutación que confiere susceptibilidad estará en desequilibrio de ligamiento con su adyacente marcador genético en relación con la distancia que los separe. La extensión de estas regiones cromosómicas en desequilibrio de ligamiento disminuye en cada generación, producto de recombinación y conversión génica. En base a los resultados hallados, creemos que lo más probable es que el alelo *NAT2* *5 no constituye una variante funcionalmente relevante sino que estaría actuando como un marcador. Quizás sirva como tal en ciertas poblaciones y en otras no, pues no estaría en desequilibrio de ligamiento con

el gen causal, situación que depende de la historia particular de cada población.

En relación con nuestros resultados, nuestro próximo trabajo consistirá en el mapeo fino, saturando la región donde se ubica *NAT2* con más marcadores genéticos con el fin de contribuir con la identificación de genes de susceptibilidad. El avance en el conocimiento de los genes que estarían operando en la producción de FLPNS tiene como finalidad el incremento del uso rutinario de análisis genéticos con fines diagnósticos y terapéuticos, permitiendo de este modo el desarrollo de estrategias preventivas más eficaces en la identificación de individuos genéticamente susceptibles al padecimiento de esta anomalía.

Referencias

- van Rooij IA, Vermeij-Keers C, Kluijtmans LA, Ocké MC, Zielhuis GA, Goorhuis-Brouwer SM, et al. Does the interaction between maternal folate intake and the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms affect the risk of cleft lip with or without cleft palate? *Am J Epidemiol* 2003; 157 (7): 583-91.
- Bender PL. Genetics of cleft lip and palate. *J Pediatr Nurs* 2000; 15 (4): 242-9.
- Tolarova MM, Cervenka J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. *Am J Med Genet* 1998; 75 (2): 126-37.
- Schutte BC, Murray JC. The many faces and factors of orofacial clefts. *Human Mol Genet* 1999; 8 (10): 1853-9.
- Croen LA, Shaw GM, Wasserman CR, Tolarova MM. Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California, 1983-1992. *Am J Med Genet* 1998; 79 (1): 42-7.
- López-Camelo JS, Orioli IM. Heterogeneous rates for birth defects in Latin America: Hints on causality. *Genet Epidemiol* 1996; 13 (5): 469-81.
- Hayes C. Environmental risk factors and oral clefts. En: Wyszynski DF, Editor. *Cleft Lip and Palate: from Origin to Treatment*. New York, EEUU: Oxford University Press; 2002. p. 159-69.
- Little J, Cardy A, Munger RG. Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Bull World Health Organ* 2004; 82 (3): 213-8.
- Gooderham NJ, Murray S, Lynch AM, Yadollahi-Farsani M, Zhao K, Boobis AR, et al. Food-derived heterocyclic amine mutagens: variable metabolism and significance to humans. *Drug Metab Dispos* 2001; 29 (4 Parte 2): 529-34.
- Hein DW, Doll MA, Fretland AJ, Leff MA, Webb SJ, Xiao GH, et al. Molecular Genetics and Epidemiology of the NAT1 and NAT2 Acetylation Polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2000; 9: 29-42.
- Santos JL, Pérez F, Carrasco E, Albala C. Uso de tríos caso-padres en estudios epidemiológicos de asociación entre polimorfismos genéticos y enfermedades complejas. *Rev Med Chile* 2002; 130 (11): 1307-15.
- Castilla EE, Orioli IM. El Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas: ECLAMC/MONITOR. *Interciencia* 1983; 271-8.
- Hou SM, Lambert B, Hemminki K. Relationship between hprt mutant frequency, aromatic DNA adducts and genotypes for GSTM1 and NAT2 in bus maintenance workers. *Carcinogenesis* 1995; 16: 1913-7.
- Grant DM, Blum M, Demierre A, Meyer UA. Nucleotide sequence of an intronless gene for a human arylamine N-acetyltransferase related to polymorphic drug acetylation. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 3978.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (Ver. 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 2005; 1: 47-50.
- Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin dependent diabetes mellitus. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 506-16.
- Avena S, Via M, Ziv E, Pérez-Stable EJ, Gignoux CR, Dejean C, et al. Heterogeneity in Genetic Admixture across Different Regions of Argentina. *PLoS ONE* 2012; (4): e34695. doi:10.1371/journal.pone.0034.
- Corach D1, Lao O, Bobillo C, van Der Gaag K, Zúñiga S, Vermeulen M, et al. Inferring continental ancestry of argentineans from Autosomal, Y-chromosomal and mitochondrial DNA. *Annals of Human Genetics* 2010; 74: 65-76.
- Lammer EJ, Shaw GM, Iovannisci DM, Van Waes J, Finnell RH. Maternal smoking and the risk of orofacial clefts: Susceptibility with NAT1 and NAT2 polymorphisms. *Epidemiology* 2004; 15: 150-6.
- van Rooij IA, Groenen PM, Van Drongele M, Te Morsche RH, Peters WH, Steegers-Theunissen RP. Orofacial clefts and spina bifida: N-acetyltransferase phenotype, maternal smoking, and medication use. *Teratology* 2002; 66: 260-6.
- Lie RT, Wilcox AJ, Taylor J, Gjessing HK, Saugstad OD, Aabyholm F, et al. Maternal Smoking and Oral Clefts: The Role of Detoxification Pathway Genes. *Epidemiology* 2008; 19 (4): 606-15.
- Shi M, Christensen K, Weinberg CR, Romitti P, Bathum L, Lozada A, et al. Orofacial cleft risk is increased with

- maternal smoking and specific detoxification-gene variants. *Am J Hum Genet* 2007; 80 (1): 76-90.
24. Zöllner S, Wen X, Hanchard NA, Herbert MA, Ober C, Pritchard JK. Evidence for extensive transmission distortion in the Human Genome. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 62-72.
 25. Mitchell MK, Futscher BW, Mcqueen CA. Developmental expression of N-acetyltransferases in C57BI/6 mice. *Drug Metab Dispos* 1999; 27: 261-4.
 26. Stanley LA, Copp AJ, Pope J, Rolls S, Smelt V, Perry VH, et al. Immunochemical detection of arylamine N-acetyltransferase during mouse embryonic development and in adult mouse brain. *Teratology* 1998; 58 (5): 174-82.
 27. Poletta FA, Orioli IM, Mereb JC, Carvalho FM, Brandon CA, Resick JM, et al. A South American Cluster of Cleft Lip: Familial Relative Risks and Complex Segregation Analysis. *PLoS ONE* 2011.
 28. Zucchero 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* 2014; 351 (8): 769-80.