



EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS C677T, A1298C DE LA MTHFR, C699T DE LA CBS Y A66G DE LA MTRR CON LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL



**EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS C677T,
A1298C DE LA MTHFR, 844INS68, C699T DE LA CBS Y A66G DE LA MTRR
CON LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL**

OLGA LUCÍA SOPÓ RINCÓN

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CON ENFASIS EN GENÉTICA HUMANA**



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BOGOTÁ. D.C
Enero de 2012**



**EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS C677T,
A1298C DE LA MTHFR, 844INS68, C699T DE LA CBS Y A66G DE LA
MTRR CON LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL**

OLGA LUCÍA SOPÓ RINCÓN

DIRECTOR

**DR. IGNACIO MANUEL ZARANTE MONTOYA. PhD.
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA
VIGILANCIA DE MALFORMACIONES CONGENITAS
GRUPO GAF**

ASESORA CIENTÍFICA

**DRA. PAOLA ANDREA AYALA
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA**



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BOGOTÁ. D.C
Enero de 2012**



**EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS C677T,
A1298C DE LA MTHFR, 844INS68, C699T DE LA CBS Y A66G DE LA
MTRR CON LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL**

JURADO

**DR. JUAN CARLOS PRIETO RIVERA
ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA**

JURADO

**DR. JUAN DIEGO ROJAS BARRERA
DEPARTAMENTO GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN IGNACIO**

JURADO

**DRA. PAOLA PAEZ ROJAS
DOCENTE INVESTIGADORA
UNIVERSIDAD DEL BOSQUE**



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BOGOTÁ. D.C
Enero de 2012**



**EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS C677T,
A1298C DE LA MTHFR, 844INS68, C699T DE LA CBS Y A66G DE LA
MTRR CON LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL**

**DRA. INGRID SCHULLER
DECANA ACADEMICA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**DR. MANUEL FRANCO
DIRECTOR DE POSGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS**



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BOGOTÁ. D.C
Enero de 2012**



NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución No 13 de julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velara porque no se publique nada contrario al dogma y la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo por buscar verdad y justicia”



Este trabajo fue realizado con el apoyo del Instituto de Genética Humana y el Hospital Universitario San Ignacio de la Pontificia Universidad Javeriana y la colaboración de las Directivas y pacientes de la Fundación Mónica Uribe por Amor.



AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la fortaleza necesaria para poder asumir con esperanza las dificultades y desalientos presentados en el camino.

Al doctor Ignacio Zarante por el acompañamiento, sus enseñanzas y la confianza depositada en mí, para llevar a cabo la realización de este proyecto.

A la doctora Paola Andrea Ayala, por su paciencia, orientación y apoyo incondicional.

Al doctor Reggie García por su valiosa colaboración en el análisis estadístico y su asesoría científica.

A las doctoras Viviana Vizcaíno y María Consuelo Casas, del Instituto de Referencia Andino, por la comprensión y apoyo brindados para la culminación de este trabajo de grado.

A todos los pacientes, compañeros y personas que de alguna u otra manera hicieron posible la realización de este trabajo, reciban mi afecto, mis oraciones y mi inmensa gratitud.



DEDICATORIA

A mi hijo Simón, por ser mi compañero incondicional y el entusiasmo de vida que alimenta mi alma.

A mis padres Gladys y Ángel, a quienes les estoy inmensamente agradecida por brindarme su amor y apoyo moral para seguir adelante en la realización de mis proyectos académicos.

A mi hermana, que aunque en la distancia siempre me alienta a seguir a delante.



TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| GLOSARIO..... | 22 |
| RESUMEN | 24 |
| SUMMARY | 26 |
| 1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN | 1 |
| 1.1. Justificación | 3 |
| 2. MARCO TEORICO..... | 3 |
| 2.1. Revisión Histórica | 3 |
| 2.2. Definición..... | 4 |
| 2.3. Embriología..... | 5 |
| 2.3.1. Neurulación Primaria: | 6 |
| 2.3.2. Neurulación Secundaria: | 6 |
| 2.4. Desarrollo craneocaudal de la neurulación | 8 |
| 2.4.1. Teoría de la Cremallera..... | 8 |
| 2.4.2. Teoría de los múltiples puntos de cierre | 9 |
| 2.5. Patogenia..... | 11 |
| 2.6. Clasificación..... | 12 |
| 2.6.1. Anencefalia | 12 |
| 2.6.2. Iniencefalia: | 13 |
| 2.6.3. Encefalocele:..... | 14 |
| 2.6.4. Craneorraquisquisis..... | 15 |
| 2.6.5. Espina Bífida (OMIM 182940) | 16 |
| 2.6.5.1. Espina Bífida Oculta | 16 |



| | | |
|------------|--|----|
| 2.6.5.2. | Espina Bífida Quística..... | 17 |
| 2.6.6. | Mielomeningocele (Defecto abierto)..... | 18 |
| 2.6.7. | Meningocele..... | 19 |
| 2.6.8. | Lipomeningocele..... | 20 |
| 2.6.9. | Mielocistocele..... | 20 |
| 2.7. | Epidemiología..... | 20 |
| 2.8. | Metabolismo del folato y la homocisteína y su relación con los defectos del tubo neural 22 | |
| 2.8.1. | Ácido Fólico..... | 22 |
| 2.8.1.1. | Estructura del ácido fólico..... | 22 |
| 2.8.1.2. | Metabolismo del Folato..... | 22 |
| 2.8.1.3. | Transporte del folato en el organismo..... | 23 |
| 2.8.1.4. | Funciones metabólicas del folato..... | 23 |
| 2.8.2. | Metabolismo de la homocisteína..... | 25 |
| 2.8.2.1. | Variabilidad biológica de la homocisteína..... | 25 |
| 2.9. | Etiología..... | 27 |
| 2.9.1. | Factores moduladores de la frecuencia de los DTN..... | 27 |
| 2.9.1.1. | Factores ambientales..... | 28 |
| 2.9.1.1.1. | Factores étnicos y raciales..... | 28 |
| 2.9.1.1.2. | Altitud..... | 28 |
| 2.9.1.1.3. | Variaciones estacionales..... | 29 |
| 2.9.1.1.4. | Embarazos múltiples..... | 29 |
| 2.9.1.1.5. | Sexo fetal..... | 29 |
| 2.9.1.1.6. | Antecedentes familiares..... | 30 |
| 2.9.1.1.7. | Condición socioeconómica..... | 31 |
| 2.9.1.1.8. | Altas temperaturas..... | 31 |
| 2.9.1.1.9. | Diabetes..... | 31 |



| | |
|---|----|
| 2.9.1.1.10. Peso materno | 32 |
| 2.9.1.1.11. Exposición a agentes químicos..... | 32 |
| 2.9.1.1.12. Fármacos..... | 33 |
| 2.9.1.1.13. Ingesta de ácido fólico | 33 |
| 2.9.1.1.14. Ingesta de zinc y otros elementos..... | 35 |
| 2.9.2. Factores genéticos | 35 |
| 2.9.2.2. Genes involucrados en el metabolismo del folato | 36 |
| 2.9.2.2.1. Gen del Receptor Alfa del Folato Reducido (<i>RFα</i>)..... | 36 |
| 2.9.2.2.2. Gen de la Metilendetetrahidrofolato Deshidrogenasa (<i>MTHFD</i>)..... | 36 |
| 2.9.2.2.3. Gen de la Metilendetetrahidrofolato Reductasa (<i>MTHFR</i>)..... | 37 |
| 2.9.2.2.3.1. Polimorfismo C677T | 37 |
| 2.9.2.2.3.2. Polimorfismo A1298C | 38 |
| 2.9.2.3. Genes involucrados en el metabolismo de la homocisteína..... | 39 |
| 2.9.2.3.1. Gen de la Betaína-Homocisteína metiltransferasa (<i>BHMT</i>)..... | 40 |
| 2.9.2.3.2. Gen de la Metionina Sintasa (<i>MTR</i>)..... | 41 |
| 2.9.2.3.3. Gen de la Metionina Sintasa Reductasa (<i>MTRR</i>)..... | 41 |
| 2.9.2.3.4. Gen de la Cistationina β Sintasa (<i>CBS</i>)..... | 42 |
| 2.9.2.3.5. Gen de la Serina Hidroximetiltransferasa (<i>SHMT</i>) | 42 |
| 2.9.3. Niveles preventivos..... | 44 |
| 2.9.3.1. Diagnóstico prenatal | 44 |
| 2.9.3.2. Diagnóstico bioquímico de los DTN | 45 |
| 2.9.3.3. Diagnóstico Ecográfico | 45 |
| 2.9.3.4. Cirugía Intrauterina | 46 |
| 2.9.3.5. Asesoría genética y manejo clínico..... | 46 |
| 2.9.4. Impacto de las medidas preventivas en la frecuencia de las anomalías del tubo neural | 47 |
| 2.9.5. Costos de manejo de los DTN | 48 |



| | |
|--|----|
| 3. OBJETIVOS | 49 |
| 3.1. Objetivo General..... | 49 |
| 3.2. Objetivos Específicos | 49 |
| 4. FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS | 49 |
| 5. METODOLOGÍA..... | 50 |
| 5.1. Población de estudio | 50 |
| 5.1.1.1. Criterios de Inclusión | 50 |
| 5.1.1.1.1. Criterios de inclusión (Madres de Casos con DTN) | 50 |
| 5.1.1.1.2. Criterios de inclusión (Madres Controles) | 51 |
| 5.1.1.2. Criterios de exclusión..... | 51 |
| 5.1.1.2.1. Criterios de exclusión (Casos -Madres de Casos con DTN)..... | 51 |
| 5.1.1.2.2. Criterios de exclusión (Controles) | 51 |
| 5.1.2. Variables | 51 |
| 5.1.2.1. Variables independientes cualitativas | 51 |
| 5.2. Obtención y recolección de las muestras..... | 52 |
| 5.3. Extracción de ADN a partir de muestras de sangre total con EDTA..... | 52 |
| 5.4. Extracción de ADN a partir de gotas de sangre impregnadas en papel de filtro..... | 53 |
| 5.5. Cuantificación de ADN | 53 |
| 5.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) | 53 |
| 5.7. Visualización de productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa | 54 |
| 5.8. Digestión Enzimática de productos amplificados (RFLPs) | 54 |
| 5.9. Manejo Estadístico de los datos..... | 56 |
| 6. RESULTADOS | 57 |
| 6.1. Descripción de la población | 57 |
| 6.2. Distribución Alélica y Genotípica de la población | 57 |
| 6.2.1.1. MTHFR C677T | 58 |



| | | |
|----------|---|----|
| 6.2.1.2. | MTHFR A1298C | 58 |
| 6.2.1.3. | CBS 844ins68..... | 59 |
| 6.2.1.4. | CBS C699T | 60 |
| 6.2.1.5. | MTRR A66G | 60 |
| 6.2.2. | Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas | 61 |
| 6.2.2.1. | MTHFR C677T | 61 |
| 6.2.2.2. | MTHFR A1298C | 63 |
| 6.2.2.3. | CBS 844ins68..... | 65 |
| 6.2.2.4. | CBS C699T..... | 67 |
| 6.2.2.5. | MTRR A66G | 69 |
| 6.3. | Comparación entre genotipos..... | 73 |
| 6.3.1. | Genotipo MTHFR C677T | 73 |
| 6.3.2. | Genotipo MTHFR A1298C..... | 73 |
| 6.3.3. | Genotipo CBS 844ins68 | 73 |
| 6.3.4. | Genotipo CBS C699T | 73 |
| 6.3.5. | Genotipo MTRR A66G..... | 73 |
| 6.4. | Análisis de asociación de riesgo de DTN y los polimorfismos estudiados..... | 74 |
| 6.4.1. | Polimorfismo C677T MTRR | 74 |
| 6.4.1.1. | <i>Casos DTN vs Controles.....</i> | 74 |
| 6.4.1.2. | <i>Madres Hijos DNT vs Madres Controles</i> | 74 |
| 6.4.1.3. | <i>Diadas DTN vs Diadas Controles.....</i> | 75 |
| 6.4.1.4. | <i>Total Madres DTN vs Madres Controles</i> | 75 |
| 6.4.2. | Polimorfismo A1298C MTHFR | 75 |
| 6.4.2.1. | <i>Casos DTN vs Controles.....</i> | 75 |
| 6.4.2.2. | <i>Madres Hijos DNT vs Madres Controles</i> | 75 |
| 6.4.2.3. | <i>Diadas DTN vs Diadas Controles.....</i> | 76 |



| | | |
|----------|---|----|
| 6.4.2.4. | <i>Total Madres DTN vs Madres Controles</i> | 76 |
| 6.4.3. | Polimorfismo 844ins68 CBS | 78 |
| 6.4.3.1. | <i>Casos DTN vs Controles</i> | 78 |
| 6.4.3.2. | <i>Madres Hijos DNT vs Madres Controles</i> | 78 |
| 6.4.3.3. | <i>Diadas DTN vs Diadas Controles</i> | 78 |
| 6.4.3.4. | <i>Total Madres DTN vs Madres Controles</i> | 78 |
| 6.4.4. | Polimorfismo C699T CBS..... | 78 |
| 6.4.4.1. | <i>Casos DTN vs Controles</i> | 78 |
| 6.4.4.2. | <i>Madres Hijos DNT vs Madres Controles</i> | 79 |
| 6.4.4.3. | <i>Diadas DTN vs Diadas Controles</i> | 79 |
| 6.4.4.4. | <i>Total Madres DTN vs Madres Controles</i> | 79 |
| 6.4.5. | Polimorfismo A66G MTRR | 79 |
| 6.4.5.1. | <i>Casos DTN vs Controles</i> | 79 |
| 6.4.5.2. | <i>Madres Hijos DNT vs Madres Controles</i> | 80 |
| 6.4.5.3. | <i>Diadas DTN vs Diadas Controles</i> | 80 |
| 6.4.5.4. | <i>Total Madres DTN vs Madres Controles</i> | 80 |
| 6.5. | Combinación genotípica de los polimorfismo MTHFR C677T y A1298C..... | 80 |
| 6.5.1. | Distribución de los genotipos combinados en los grupos de estudio. | 80 |
| 6.5.1.1. | <i>Casos DTN vs Controles</i> | 80 |
| 6.5.1.2. | <i>Madres DTN vs Madres Control</i> | 81 |
| 6.6. | Análisis de riesgo de las interacciones genotípicas entre los polimorfismos MTHFR C677T y A1298C..... | 82 |
| 6.6.1. | <i>Casos DTN vs Controles</i> | 83 |
| 6.6.2. | <i>Madres DTN vs Madres Control</i> | 83 |
| 7. | DISCUSIÓN | 84 |
| 7.1. | Polimorfismo MTHFR C677T | 84 |
| 7.1.1. | <i>Casos DTN vs Controles</i> | 85 |



| | |
|--|----|
| 7.1.2. <i>Madres Hijos DTN vs Madres Control</i> | 86 |
| 7.1.3. <i>Diadas DTN vs Diadas Control</i> | 86 |
| 7.1.4. <i>Total Madres DTN vs Madres Control</i> | 87 |
| 7.2. Polimorfismo MTHFR A1298C..... | 87 |
| 7.2.1. Hijos DTN vs Hijos Control | 87 |
| 7.2.2. <i>Madres Hijos DTN vs Madres Control</i> | 87 |
| 7.2.3. <i>Diadas DTN vs Diadas Control</i> | 88 |
| 7.2.4. <i>Total Madres DTN vs Madres Control</i> | 88 |
| 7.3. CBS 844ins68..... | 89 |
| 7.3.1. Hijos DTN vs Hijos Control | 89 |
| 7.3.2. <i>Madres Hijos DTN vs Madres Control</i> | 89 |
| 7.3.3. <i>Diadas DTN vs Diadas Control</i> | 89 |
| 7.3.4. <i>Total Madres DTN vs Madres Control</i> | 89 |
| 7.4. CBS C699T | 90 |
| 7.4.1. Hijos DTN vs Hijos Control | 90 |
| 7.4.2. <i>Madres Hijos DTN vs Madres Control</i> | 90 |
| 7.4.3. <i>Diadas DTN vs Diadas Control</i> | 90 |
| 7.4.4. <i>Total Madres DTN vs Madres Control</i> | 90 |
| 7.5. MTRR A66G | 91 |
| 7.5.1. Hijos DTN vs Hijos Control | 91 |
| 7.5.2. <i>Madres Hijos DTN vs Madres Control</i> | 91 |
| 7.5.3. <i>Diadas DTN vs Diadas Control</i> | 91 |
| 7.5.4. <i>Total Madres DTN vs Madres Control</i> | 92 |
| 7.6. Combinación genotípica de los polimorfismo MTHFR C677T y A1298C..... | 93 |
| 7.6.1. Distribución de los genotipos combinados en los grupos de estudio. | 93 |
| 7.6.1.1. Casos <i>DTN vs Controles</i> | 93 |



| | |
|--|----|
| 7.6.1.2. <i>Madres Hijos DTN vs Madres Controles</i> | 93 |
| 8. CONCLUSIONES..... | 94 |
| 9. PRESPECTIVAS Y APLICACIONES..... | 95 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA..... | 97 |



INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| TABLA 1 - Descripción de los estadios de evolución de la neurulación primaria humana..... | 7 |
| TABLA 2 - Descripción de los puntos de cierre del tubo neural humano..... | 11 |
| TABLA 3 - Alteraciones neurológicas de la espina bífida según el nivel de lesión medular..... | 18 |
| TABLA 4 - Descripción de las principales anomalías cromosómicas numéricas asociadas con los Defectos del Tubo Neural..... | 42 |
| TABLA 5 - Descripción de las principales características de los primers utilizados en la PCR..... | 54 |
| TABLA 6 - Distribución de los alelos para el polimorfismo MTHFR C677T en los grupos de estudio..... | 61 |
| TABLA 7 - Distribución de las frecuencias alélicas MTHFR C677T en los grupos de estudio..... | 61 |
| TABLA 8 - Distribución de los genotipos para el polimorfismo MTHFR C677T en los grupos de estudio..... | 62 |
| TABLA 9 - Distribución de las frecuencias genotípicas MTHFR C677T en los grupos de estudio..... | 62 |
| TABLA 10 - Distribución de los alelos para el polimorfismo MTHFR A1298C en los grupos de estudio..... | 63 |
| TABLA 11 - Distribución de las frecuencias alélicas MTHFR A1298C en los grupos de estudio..... | 63 |
| TABLA 12 - Distribución de los genotipos para el polimorfismo MTHFR A1298C en los grupos de estudio..... | 64 |
| TABLA 13 - Distribución de las frecuencias genotípicas MTHFR A1298C en los grupos de estudio..... | 64 |
| TABLA 14 - Distribución de los alelos para el polimorfismo CBS 844ins68 en los grupos de estudio..... | 65 |
| TABLA 15 - Distribución de las frecuencias alélicas CBS 844ins68 en los grupos de estudio..... | 65 |



| | |
|---|----|
| TABLA 16 - Distribución de los genotipos para el polimorfismo CBS 844ins68 en los grupos de estudio..... | 66 |
| TABLA 17 - Distribución de las frecuencias genotípicas CBS 844ins68 en los grupos de estudio..... | 66 |
| TABLA 18 - Distribución de los alelos para el polimorfismo CBS C699T en los grupos de estudio..... | 67 |
| TABLA 19 - Distribución de las frecuencias alélicas CBS C699T en los grupos de estudio..... | 67 |
| TABLA 20 - Distribución de los genotipos para el polimorfismo CBS C699T en los grupos de estudio..... | 68 |
| TABLA 21 - Distribución de las frecuencias genotípicas CBS C699T en los grupos de estudio..... | 68 |
| TABLA 22 - Distribución de los alelos para el polimorfismo MTRR A66G en los grupos de estudio..... | 69 |
| TABLA 23 - Distribución de las frecuencias alélicas MTRR A66G en los grupos de estudio..... | 69 |
| TABLA 24 - Distribución de los genotipos para el polimorfismo MTRR A66G en los grupos de estudio..... | 70 |
| TABLA 25 - Distribución de las frecuencias genotípicas MTRR A66G en los grupos de estudio..... | 70 |
| TABLA 26 - Distribución alélica y genotípica de los polimorfismos en la población de estudio..... | 71 |
| TABLA 27 - Análisis de riesgo de los Defectos del Tubo Neural y los polimorfismos estudiados..... | 76 |
| TABLA 28 - Distribución de genotipos combinados (C677T+A1298C) y sus respectivas frecuencias en el grupo de Casos DTN..... | 80 |
| TABLA 29 - Distribución de genotipos combinados (C677T+A1298C) y sus respectivas frecuencias en el grupo de Controles..... | 80 |
| TABLA 30 - Distribución de genotipos combinados (C677T+A1298C) y sus respectivas frecuencias en el grupo de Madres Hijos DTN..... | 81 |
| TABLA 31 - Distribución de genotipos combinados (C677T+A1298C) y sus respectivas frecuencias en el grupo de Madres Control..... | 81 |



TABLA 32 - Odds Ratios estimados para los genotipos combinados (C677T+A1298C) en el grupo de Casos DTN vs Controles.....82

TABLA 33 - Odds Ratios estimados para los genotipos combinados (C677T+A1298C) en el grupo de Madres Hijos DTN vs Madres Control.....83



INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - Primera descripción de un caso con espina bífida..... | 4 |
| FIGURA 2 - Diagrama y microfotografía del cierre del tubo neural..... | 7 |
| FIGURA 3 - Teoría de la cremallera en diferentes estadios de cierre del tubo neural..... | 9 |
| FIGURA 4 - Teoría de los cinco puntos de cierre..... | 10 |
| FIGURA 5 - Anencefalia..... | 13 |
| FIGURA 6 - Iniencefalia..... | 14 |
| FIGURA 7 - Encefalocele..... | 15 |
| FIGURA 8 - Craneorraquisquisis..... | 15 |
| FIGURA 9 - Espina Bífida Oculta..... | 17 |
| FIGURA 10 - Espina Bífida Quística..... | 17 |
| FIGURA 11 - Mielomeningocele..... | 19 |
| FIGURA 12 - Lipomeningocele..... | 19 |
| FIGURA 13 - Ruta Bioquímica del metabolismo de la Homocisteína – Metionina..... | 26 |
| FIGURA 14 - Distribución genotípica del polimorfismo MTHFR C677T..... | 58 |
| FIGURA 15 - Distribución genotípica del polimorfismo MTHFR A1298C..... | 58 |
| FIGURA 16 - Distribución genotípica del polimorfismo CBS 844ins68..... | 59 |
| FIGURA 17 - Distribución genotípica del polimorfismo CBS C699T..... | 59 |
| FIGURA 18 - Distribución genotípica del polimorfismo MTRR A66G..... | 60 |



INDICE DE ANEXOS

| | |
|--|-----|
| ANEXO 1 - Consentimiento informado para participar en el proyecto de investigación..... | 110 |
| ANEXO 2 - Consentimiento informado para participar en el proyecto de investigación para toma de muestra Laboratorio..... | 114 |
| ANEXO 3 - Extracción de ADN a partir de sangre total con EDTA..... | 118 |
| ANEXO 4 - Extracción de ADN a partir de muestras de sangre impregnada en papel de filtro..... | 121 |
| ANEXO 5 - Protocolos de amplificación polimorfismos asociados con los DTN..... | 122 |
| ANEXO 6 - Protocolos de digestión de los productos de amplificación de polimorfismos asociados con los DTN..... | 127 |



GLOSARIO

| | |
|----------------|---|
| DTN | Defectos del Tubo Neural. |
| EB | Espina Bífida. |
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico. |
| EDTA | Ácido Etilendiaminotetraacético. |
| AFP | Alfa Feto Proteína |
| MTHFR | Enzima Metilenetetrahidrofolato Reductasa. |
| C/C (677) | Genotipo Homocigoto para el polimorfismo C677T del gen normal de la MTHFR, genotipo silvestre, WT. |
| C/T (677) | Genotipo Heterocigoto para el polimorfismo C677T del gen de la MTHFR. |
| T/T (677) | Genotipo Homocigoto para el polimorfismo C677T del gen mutado de la MTHFR. |
| A/A (1298) | Genotipo Homocigoto para el polimorfismo A1298C del gen normal de la MTHFR, genotipo silvestre, WT. |
| A/C (1298) | Genotipo Heterocigoto para el polimorfismo A1298C del gen de la MTHFR. |
| C/C (1298) | Genotipo Homocigoto para el polimorfismo A1298C del gen mutado de la MTHFR. |
| CBS | Cistationina Beta Sintasa |
| WT/WT (ins68) | Genotipo Homocigoto para el polimorfismo 844ins68 del gen normal de la CBS, genotipo silvestre, WT. |
| WT/INS (ins68) | Genotipo Heterocigoto para el polimorfismo 844iins68 del gen de la CBS. |



| | |
|-----------------|---|
| INS/INS (ins68) | Genotipo Homocigoto para el polimorfismo 844ins68 del gen mutado de la CBS. |
| C/C (699) | Genotipo Homocigoto para el polimorfismo C699T del gen normal de la CBS, genotipo silvestre, WT. |
| C/T (699) | Genotipo Heterocigoto para el polimorfismo C699T del gen de la CBS. |
| T/T (699) | Genotipo Homocigoto para el polimorfismo C699T del gen mutado de la CBS. |
| MTRR | Metionina Sintasa Reductasa. |
| A/A (66) | Genotipo Homocigoto para el polimorfismo A66G del gen normal de la MTRR, genotipo silvestre, WT. |
| A/G (66) | Genotipo Heterocigoto para el polimorfismo A66G del gen de la MTRR |
| G/G (66) | Genotipo Homocigoto para el polimorfismo A66G del gen mutado de la MTRR. |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i> , ingles) |
| RFLPs | Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> , ingles). |
| ECLAMC | Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas |
| PRIMERS | Secuencias Cortas de ADN, Cebadores. (<i>Primers</i> , ingles). |
| OR | Razón de momios (<i>Odd Ratio</i> , ingles) |



RESUMEN

Resumen: Los defectos del tubo neural (DTN) son un grupo de malformaciones congénitas comunes que resultan en el cierre incompleto del tubo neural en las primeras semanas de desarrollo y pueden terminar en discapacidades severas o inclusive en la muerte. Los DTN parecen ser el resultado de la interacción de numerosos genes y factores ambientales. Los polimorfismos de los genes involucrados en el metabolismo del folato y la homocisteína, como la variante termolábil C677T y A1298C de la enzima 5,10 Metilendetetrahidrofolato Reductasa (*MTHFR*), 844ins68 y C699T de la Cistationina β -Sintasa (*CBS*) y el A66G de la Metionina Sintasa Reductasa (*MTRR*) son conocidos como factor de riesgo para los DTN en algunas poblaciones. Esta malformación impacta en la discapacidad personal y representa un serio problema de salud pública en el mundo, afectando 1 niño por cada 1000 nacidos vivos en la mayoría de poblaciones incluyendo Colombia, donde esta malformación congénita contribuye significativamente a la mortalidad y discapacidad de los niños. El objetivo de este estudio es evaluar la asociación entre los polimorfismos y el riesgo de DTN en una población colombiana. **Métodos:** Con el fin de evaluar el rol de estos polimorfismos y su interacción en el riesgo de DTN, se genotificaron los polimorfismos en 100 casos (hijos y madres) y 200 controles para desarrollar un estudio de casos y controles mediante la técnica de PCR-RFLPs. La investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Pontificia Universidad Javeriana y formatos de consentimiento informados fueron obtenidos de todos los participantes en el estudio. Las frecuencias alélicas en los casos y los controles fueron determinadas mediante conteo alélico y las diferencias entre las frecuencias alélicas y genotípicas fueron evaluadas mediante test de χ^2 con un 95% IC para el análisis de Equilibrio de Hardy –Weinberg (HWE). Estudios de asociación fueron usados para estimar los Odds Ratios (OR) con un 95%CI para determinar el factor de riesgo asociado de los polimorfismos con los DTN. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el paquete estadístico Epidat 3.1. **Resultados:** La asociación entre los polimorfismos 677T en los casos y el riesgo de los DTN fue encontrado (OR= 1.98 [1.21 – 3.23], 95% CI; $p=0.005$) y en las diadas (OR= 1.77 [1.24 – 2.52], 95% CI; $p=0.001$), Así como también en las madres de hijos con DTN y el polimorfismos 66G (OR= 2.06 [1.20 – 3.53], 95% CI; $p=0.008$). Un riesgo aumentado fue encontrado en las madres de casos para el 677T/T (OR= 2.50 [0.48 – 12.88], 95% CI; $p=0.05$) y para el genotipo 66G/G (OR= 2.0 [1.20 – 3.53]; $p=0.01$). Una asociación estadísticamente significativa al riesgo fue encontrada en la madres cuando al combinar los genotipos



677 C/C y 677 C/T (OR=5.44 [1.01– 29.13]; $p=0.02$). Cuando se aplicó el modelo genético recesivo (CC/CT vs TT) un riesgo significativo fue encontrado (OR=5.44 [1.01– 29.13], 95% CI; $p=0.02$). Una asociación entre el polimorfismo A1298C y el riesgo de los DTN fue encontrado cuando se aplicó el modelo dominante (CC/AC vs AA) (OR= 1.90 [1.09 – 3.32], 95% CI; $p=0.02$) en el grupo del total de madres de hijos con DTN. Un riesgo aumentado también fue encontrado en las madres cuando se combina el genotipo 66G/G y 66G/A vs AA en el modelo recesivo (OR=2.78 [1.37 – 5.61], 95CI; $p=0.003$) y cuando se analizó el total de las madres de casos (OR= 1.84 [1.07 – 3.16]; $p=0.02$). Adicionalmente, también se encontró asociación entre el polimorfismo 66A y el riesgo de DTN en las madres de casos (OR= 2.06 [1.20– 3.53], 95CI; $p=0.008$) y en el total de madres de hijos con DTN (OR= 1.58 [1.01 – 2.47], 95CI; $p=0.04$). No se observó asociación estadísticamente significativa entre las frecuencias alélicas y genotípicas entre los casos y controles para los otros polimorfismos analizados ($p>0.05$). **Conclusión:** El presente estudio brinda la primera evidencia de la asociación de los polimorfismos MTHFR C677T y MTRR A66G y la influencia de riesgo de DTN. Sin embargo, aunque no existe evidencia de asociación de la presencia de los otros polimorfismos y los DTN, futuras investigaciones son necesarias en estos polimorfismos y otros ubicados en otros genes, con el fin de evaluar el impacto de esta patología polimórfica. Estos resultados son consistentes con otros reportados en el mundo para los polimorfismos MTHFR C677T y MTRR A66G, pero pueden también resultar contradictorios con los hallazgos de otros estudios, lo que puede ser debido a las diferencias étnicas en la distribución de los genotipos, la heterocigosidad de los fenotipos y a la etiología multifactorial de los DTN.

Palabras Clave: *Neural Tube Defects, Methylene tetrahydrofolate Reductase (MTHFR), Cystathionine β -Synthase (CBS), Methionine Synthase Reductase, polymorphisms, genetic association.*



SUMMARY

Background: Neural tube defects (NTDs) are a group of common congenital malformations that result in an incomplete closure of the neural tube in the first weeks of development and can lead to severe disability or even death. NTDs are likely to result from an interaction of several genes and environmental factors. Gene polymorphisms of the folate and homocysteine pathway, such as the thermolabile variant C677T and A1298C of the enzyme 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*), 844ins68 and C699T of the Cystathionine β -Synthase (*CBS*) and A66G of the Methionine Synthase Reductase (*MTRR*) are known as a risks factors for NTDs in some populations. These malformations impact in personal disability and represent a serious problem of public health in the world, affecting 1 infant per 1000 births in most of the countries, including Colombia, where these congenital abnormalities contribute significantly to the mortality and disability of the children. The aim of this study is to evaluate the association between the polymorphisms and NTDs and the risk of the malformation in the offspring in a Colombian population. **Methods:** In order to evaluate the role of these polymorphisms and their interaction in NTD risk, we genotyped the polymorphisms in 100 NTDs cases (cases and mothers) and 200 healthy controls (controls and mothers) for case-control study by performing PCR – RFLPs method. The study was approved by the Ethical Committee of the Pontificia Universidad Javeriana and informed consent was obtained from all participants. Allele frequencies in the NTDs cases and controls were determined by counting alleles and differences in genotype and allele frequency were evaluated by χ^2 test with 95% confidence interval (CI) for the Hardy –Weinberg equilibrium (HWE) analysis. Association analysis was used to estimate the Odds Ratio (OR) with 95% confidence interval to determine the risk factor association of the polymorphisms and NTD. Statistical analysis was performed using the Epidat 3.1. **Results:** An association between the polymorphisms 677T in cases and the risk for NTDs malformation were found (OR= 1.98 [1.21 – 3.23], 95% CI; $p=0.005$) and in dyads (OR= 1.77 [1.24 – 2.52], 95% CI; $p=0.001$), mother cases and 66G polymorphism (OR= 2.06 [1.20 – 3.53], 95% CI; $p=0.008$). An increased risk was found in cases mothers for the homozygous 677T/T (OR= 2.50 [0.48 – 12.88], 95% CI; $p=0.05$) and 66G/G genotype (OR= 2.0 [1.20 – 3.53]; $p=0.01$). Significant association was also found in the mothers when combined 677 C/C and 677 C/T genotypes (OR=5.44 [1.01– 29.13]; $p=0.02$). When applied the recessive genetic model (CC/CT vs TT) a significant risk was found (OR=5.44 [1.01– 29.13], 95% CI; $p=0.02$). An association between the polymorphism A1298C and the risk for NTDs was found when applied to the dominant genetic model (CC/AC vs AA) (OR= 1.90 [1.09 – 3.32], 95% CI; $p=0.02$) in the total group of cases mothers. An increased risk was also found in cases of mothers 66G/G and 66G/A were combined vs AA genotypes (Recessive model) (OR=2.78 [1.37 – 5.61], 95CI; $p=0.003$) and when analyzed the



total group of cases mothers (OR= 1.84 [1.07 – 3.16]; $p=0.02$). We also found association between the polymorphisms 66A and the risk for NTDs in the cases mothers (OR= 2.06 [1.20– 3.53], 95CI; $p=0.008$) and in the total of the mothers (OR= 1.58 [1.01 – 2.47], 95CI; $p=0.04$). We did not observe any statistically significant difference in the genotypic or allelic frequencies between cases and controls for the other polymorphisms ($p>0.05$). **Conclusion:** This study provides the first evidence of the MTHFR C667 and MTRR A66G polymorphisms significantly influences the risk of NTDs. Even though, there is no evidence of association of the presence of the other polymorphisms and NTDs, further investigations are necessary about those polymorphisms in this and other genes in order to evaluate the impact of this polymorphic pathology. Those results are consistent with others reported in the world for the polymorphism MTHFR C677T and MTRR A66G, but can result contradictories with the findings of the other studies, but it could be due to the ethnical differences in the genotypes distribution, the heterozygosity of the phenotype and the multifactorial etiology of the NTDs.

Key words: *Neural Tube Defects, Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR), Cystathionine β -Synthase (CBS), Methionine Synthase Reductase, polymorphisms, genetic association.*



1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El tubo neural es la estructura celular que más tarde se diferencia en el cerebro y la medula espinal y su desarrollo se completa aproximadamente a las cuatro semanas de gestación durante el proceso de neurulación, mediante el cual el tubo neural se cierra (1,2). El cierre incompleto del tubo neural resulta finalmente en un defecto morfológico del mismo, que puede tener lugar a nivel cerebral (anencefalía o encefalocele) o a nivel de la columna vertebral (esпина bífida). No se conocen las causas exactas de estas malformaciones, pero los expertos creen que probablemente tienen un origen multifactorial: genético y ambiental, ya que se ha comprobado que ambos factores juegan un papel importante en la etiología de la malformación (3). A nivel genético pueden estar involucradas variantes en algunos genes que contribuyen a la formación y cierre anormal del tubo neural, como los involucrados en el metabolismo del folato y la homocisteína (4,5,6). La presencia del genotipo mutado para los polimorfismos C677T y A1298C de la MTHFR y su heterocigosidad combinada se han considerado factores de riesgo en determinadas poblaciones (7); la variante termolábil (677T) de la MTHFR es conocida como el principal factor de riesgo para los DTN en algunas poblaciones, ya que esta reduce la actividad de la enzima (6,8). La relación entre un segundo polimorfismo de la MTHFR (A1298C) y el riesgo de desarrollar DTN no ha sido comprobada en algunas poblaciones (7), pero está siendo objeto de algunos estudios en otras poblaciones (9). A su vez, otros genes involucrados en la vía metabólica del folato y la homocisteína como el polimorfismo 844ins68 de la Cistationina β Sintasa (CBS) han sido implicados en la etiología de los DTN (6). Las enzimas MTHFR y la Cistanionina β Sintasa (CBS) participan en el metabolismo de la homocisteína, dependiente de folato, y se sabe que los defectos genéticos en estas enzimas pueden causar la hiperhomocisteinemia presente en las madres de casos con defectos a nivel del tubo neural, lo que sugiere que estas alteraciones en el metabolismo son un factor de riesgo para los



DTN (6). Por otra parte, la Metionina Sintasa Reductasa (MTRR), es la responsable de la regulación de la Metionina Sintasa (MS) y se ha comprobado que los defectos en su actividad catalítica pueden generar también niveles altos de homocisteína, lo que puede llevar a un riesgo de presentar DTN; el polimorfismo más común en el gen de la MTRR, es la sustitución A66G y aunque este polimorfismo no cambia la actividad enzimática de la enzima, se ha encontrado que la frecuencia de este genotipo A66G es mayor en poblaciones afectadas con DTN y sus madres (5). Entre las causas ambientales identificadas, el déficit de ácido fólico es el factor de riesgo ambiental más asociados con la salud de la madre, adicional a el uso de medicamentos, la nutrición y el nivel socioeconómico (4). Además existe una relación entre los DTN y los desórdenes que afectan el metabolismo de la glucosa, como diabetes y obesidad en la madre, ingesta de drogas, alcohol y la exposición de otros teratógenos, puede incrementar el riesgo de defectos en el tubo neural (7). De esta manera, se ha encontrado que los factores ambientales pueden modular la expresión génica de la enfermedad lo que se correlaciona con las diferentes frecuencias encontradas en los casos de DTN en diferentes regiones geográficas. Las frecuencias de DTN son mayores en los grupos con menor estatus económico, educativo, y en territorios en donde la población tiene deficiencias alimentarias (4). Así, al generar un cambio en el suplemento vitamínico de la población se puede influir en la expresión génica (5), tal como se ha evidenciado con las investigaciones que han demostrado que el uso prenatal de ácido fólico puede disminuir la prevalencia de los DTN de un 50% a 70% y actúa como un factor protector ante la presencia de la malformación (2,10,11,12). El mecanismo exacto de este efecto protector aún no está muy claro, pero se relaciona con las enzimas metabólicas que intervienen en el metabolismo del folato (3), al generar sustratos esenciales para el metabolismo celular.



1.1. Justificación

En América Latina las anomalías congénitas ocupan entre el segundo y quinto lugar como causa de muerte en menores de un año, y contribuyen de manera significativa a la morbilidad y mortalidad infantil (13). Los defectos del tubo neural (NTD), hacen parte de las malformaciones congénitas más frecuentes en nuestra población, con una prevalencia general estimada al nacimiento de 1:1000, siendo consideradas, la segunda causa de mortalidad infantil en el país (12). Hasta el momento existen pocas publicaciones en nuestro país, en las que se estudie la interacción de los polimorfismos genéticos con los DTN en la población, por lo que es necesaria la realización de nuevos estudios que permitan entender mejor los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad y contar con marcadores moleculares predictivos para caracterizar la población en riesgo. De esta manera, será posible generar mejores estrategias para una óptima prevención y manejo apropiado de los pacientes con DTN.

2. MARCO TEORICO

2.1. Revisión Histórica

Los DTN (OMIM 601634), tienen una larga historia y han sido reconocidos desde la antigüedad, encontrándose a través del tiempo, momias en sepulcros en el antiguo Egipto con restos óseos con espina bífida y un feto humano anencefálico (1). De igual manera, el mielomeningocele y la hidrocefalia asociada a estos defectos, fueron reconocidos por Hipócrates, Aristóteles y otros antiguos pensadores en sus postulados científicos (2).

El termino espina bífida fue propuesto inicialmente por Nicolás Tulp en 1651, para designar incorrectamente la anomalía vertebral como una duplicación del proceso espinoso de la vértebra y a pesar de la mala interpretación de la malformación, el término espina bífida es aun utilizado en la actualidad (14).



Figura 1. Primera descripción de un caso con espina bífida. *Observationum medicarum* (Third book) publicado por Nicolas Tulp en 1651 (Ludovicum Elzevirium Editor, Amsterdam) (14).

Los DTN son considerados como unas de las malformaciones congénitas más comunes, teniendo varios grados de incidencia dependiendo de condiciones genéticas y ambientales (1,2,3,4). Los DTN son causados por formaciones embriológicas anormales del tubo neural durante el desarrollo embrionario alrededor de la cuarta semana de gestación, afectando las estructuras que dan protección al sistema nervioso central y alterando el desarrollo del mismo (1,2,3,10,15).

2.2. Definición

El tubo neural es formado durante la vida intrauterina, dando lugar al encéfalo y a la médula espinal. Los DTN son causados por formaciones embriológicas anormales, derivadas del cierre defectuoso del tubo neural (disrafias espinales) que van desde alteraciones estructurales graves secundarias y cierre incompleto del tubo, hasta deficiencias funcionales debidas a la acción de factores desconocidos en las fases tardías del embarazo (1,10,15). La mayor parte de los defectos de la médula espinal son consecuencias del cierre anormal de los



pliegues neurales, en el curso de la tercera y cuarta semana del desarrollo, lo cual no sólo afecta al desarrollo del sistema nervioso central, sino que también interfiere con la inducción y morfogénesis de los arcos vertebrales y la bóveda craneal, viéndose afectados las meninges, las vértebras, el cráneo, los músculos y la piel (1,2,3,6,10,15).

En general, este tipo de malformaciones afectan las estructuras del sistema músculo esquelético que dan protección al sistema nervioso central y que pueden ocurrir en forma aislada o formando parte de un síndrome de múltiples malformaciones congénitas. A su vez, la falta de cierre del tubo neural altera la inducción de los esclerotomos de forma que los arcos vertebrales que lo recubren, no se desarrollan por completo ni se fusionan a lo largo de la línea media dorsal para cerrar el canal raquídeo, generando un canal vertebral abierto que recibe el nombre de espina bífida (1,2,3,10).

2.3. Embriología

Los procesos que llevan a la correcta formación de los primordios de los órganos y la conformación de la estructura vertebrada básica del organismo ocurren durante la cuarta semana de gestación, cuando se produce la diferenciación de los somitos y del sistema nervioso (1,2,10). El tubo neural se diferencia en el cerebro y la medula espinal y está formado por dos procesos embriológicos diferentes llamados neurulación primaria y secundaria, mediante los cuales el tubo neural se cierra (1,2,3,10,16). La formación del tubo neural es un fenómeno complejo en el cual las células necesitan cambiar, migrar y diferenciarse y se inicia en la región donde aparecen los primeros somitas (1,2,17) y la posterior conversión de la placa neural en el tubo neural ocurre mediante un proceso de plegamiento y fusión de los pliegues neurales en la línea media (10,14,15).

La embriogénesis de esta estructura concluye aproximadamente a los 26-30 días de post ovulación, antes de que la mujer sea consciente de su estado de gestación, de ahí, la necesidad de que cualquier actividad preventiva tenga que iniciarse antes de la concepción (12,18).

2.3.1. Neurulación Primaria:

Es un proceso dinámico que involucra eventos morfológicos complejos controlados por distintos mecanismos moleculares para formar el encéfalo, la médula cervical, torácica y lumbar. Se inicia con la conversión de la placa neural en el tubo, mediante un proceso de elevación de los pliegues neurales, fusión y superposición de los bordes que forman el neuroepitelio (1,2,15,16,19). Los labios de los pliegues neurales establecen su primer contacto en el vigésimo segundo día de gestación y esta fusión se produce en direcciones craneal y caudal hasta quedar unas pequeñas zonas no fusionadas en ambos extremos, formando el tubo neural. La formación del tubo neural se ve completa con la fusión de la placa neural mediada por procesos de señalización de polaridad celular y de proteínas morfogenéticas que regulan el plegamiento neural (1,2,3,10,15,20).

2.3.2. Neurulación Secundaria:

Comienza posterior al cierre del neuroporo y tiene lugar de la tercera a la sexta semana de gestación, a partir de la eminencia caudal que aumenta de tamaño y posteriormente forma la cavidad que se une a la parte más caudal de la neurulación primaria (1,2,15). Después de la formación del tubo neural el ectodermo se envuelve alrededor del tubo para convertirse en piel. Si bien la neurulación primaria concluye a las cuatro-cinco semanas post ovulatorias, la neurulación secundaria continúa al menos hasta las siete semanas (19,21).

a.



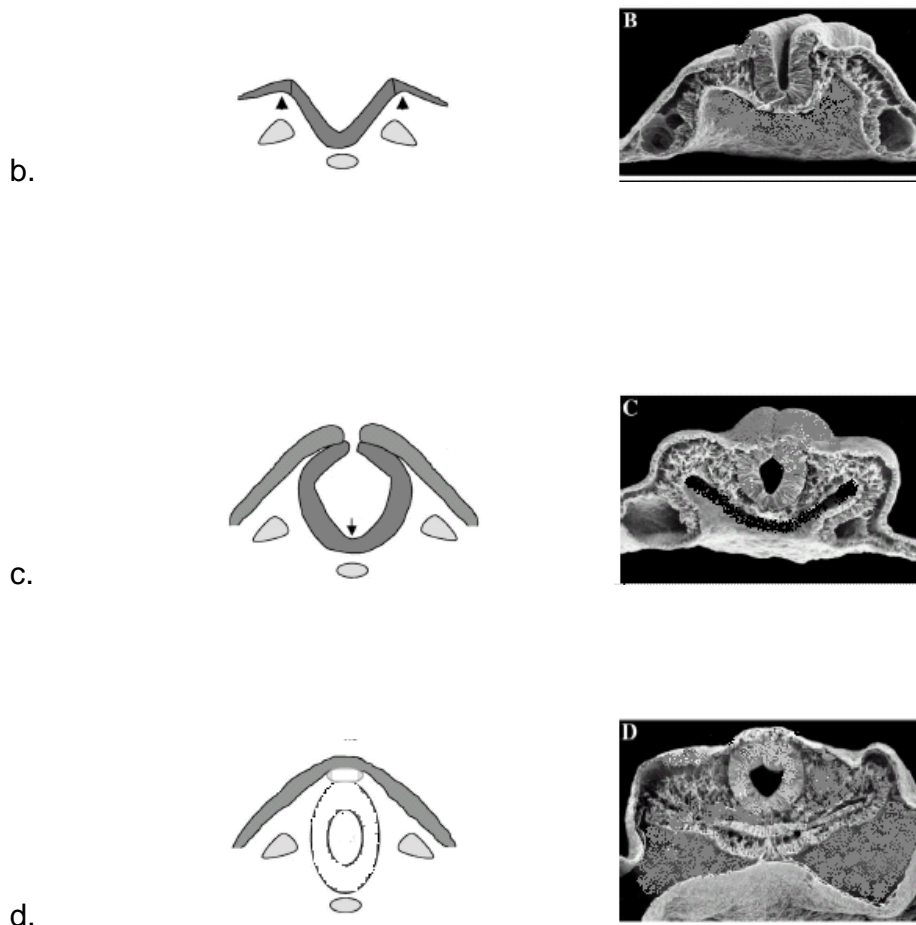


Figura 2. Diagrama y microfotografía del cierre del tubo neural. a-A. Formación de los pliegues neurales en los extremos de la placa neural (Indicados mediante flechas), dispuestos en los límites entre el futuro cerebro y la médula espinal. b-B. Fusión y superposición de los bordes que forman el neuroepitelio. c-C. A medida que los extremos de los pliegues neurales se acercan a la línea media dorsal, los epitelios se fusionan y remodelan. d-D. Cierre del tubo neural mediante la formación de la superficie ectodérmica externa (epidermis) y el neuroepitelio interno (sistema nervioso central) (1,2,21).

| Estadios de Carnegie | Etapas de la neurulación |
|--|---|
| <i>Estadio 8 (18 días postovulatorios)</i> | Se evidencian los pliegues neurales y el surco neural. |
| <i>Estadio 9 (20 días postovulatorios)</i> | Ya se pueden distinguir el cerebro anterior, el medio y el posterior, aunque el surco neural está completamente abierto. |
| <i>Estadio 10 (22 días post ovulatorios)</i> | Los pliegues neurales se empiezan a fusionar en el punto de unión entre el cerebro y la médula espinal. Las células de la cresta neural proceden principalmente del neuroectodermo. |
| <i>Estadio 11 (24 días post ovulatorios)</i> | El neuroporo cefálico o rostral se cierra en unas pocas horas. Los dos sitios de cierre bidireccional son los labios dorsal y terminal. En |

| | |
|---|--|
| | el labio dorsal la fusión puede ocurrir en distintos puntos a la vez. |
| <i>Estadio 12 (26 días post ovulatorios)</i> | El neuroporo posterior se cierra en el transcurso de un día, el nivel de cierre corresponde al futuro nivel S2. Se inicia la neurulación secundaria. |
| <i>Estadio 13 (28 - 32 días post ovulatorios)</i> | El tubo neural se ha cerrado en su totalidad. |

Tabla 1- Descripción de los estadios de evolución de la neurulación primaria humana (22)

2.4. Desarrollo craneocaudal de la neurulación

La fusión de los pliegues neurales para formar el tubo neural primario se inicia en sitios distintos según dos teorías: la clásica o de la cremallera y la de los múltiples puntos de cierre (1,3,17,21,22,23,24).

2.4.1. Teoría de la Cremallera

Este modelo surge del estudio en embriones humanos, correlacionados con los hallazgos procedentes de animales. Los pliegues neurales contactan primero en la región cervical entre el segundo y el sexto par de somitas, esto es, en la parte más caudal del encéfalo y la médula espinal (17,21). La fusión de los pliegues progresa posteriormente tanto en dirección cefálica como caudal, los extremos (cefálico y caudal) del tubo permanecen abiertos de forma temporal (neuroporos anterior y posterior) (1,3,17,21,10,15). El cierre anterior se completa mediante la fusión bidireccional que procede del mesencéfalo y el diencéfalo por una parte y del telencéfalo adyacente a la placa quiasmática; estos dos sitios de fusión se denominan labios dorsal y terminal del neuroporo anterior, respectivamente (1,2,10,14,25).

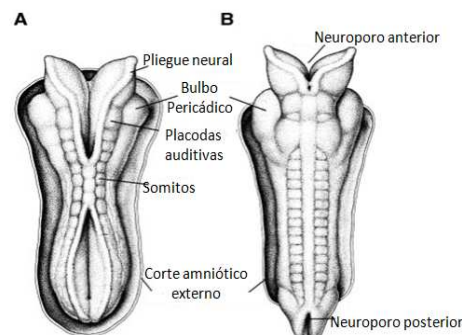




Figura 3. Teoría de la cremallera en diferentes estadios de cierre del tubo neural (posfertilización). A- El cierre comienza al final de la región craneocaudal posterior cerca a la unión con la espina dorsal. La fusión de los pliegues neurales progresa posteriormente tanto en ambas direcciones (cefálica y caudal). B- Antes de que el proceso de cierre este completo, un segundo sitio de cierre aparece en la región anterior para cerrarse bidireccionalmente a nivel craneal y caudal encontrándose finalmente con la región de cierre que se inicio en la región posterior (2).

2.4.2. Teoría de los múltiples puntos de cierre

Se ha establecido una correspondencia entre los múltiples puntos de cierre observados en modelos de ratones con una serie de fetos humanos afectados por DTN (1,2,10,15,25,26). La fusión del tubo neural craneal acontece en tres sitios y progresa a partir de cada punto, de forma que existen dos neuroporos anteriores. La fusión de los pliegues neurales correspondientes a la médula también es segmentaría. Los siguientes son los puntos de cierre (3,10,15,21,27):

1. **Punto 1:** el primer contacto y fusión de los pliegues en aposición tiene lugar entre los pares de somitas 2 y 4, en la presunta frontera entre la médula espinal y el mielencéfalo. La progresión es bidireccional, es decir, cranealmente sobrepasa las placodas auditivas y caudalmente forma la médula espinal torácica y el neuroporo posterior.
2. **Punto 2:** se inicia en el punto de unión entre el prosencéfalo y el mesencéfalo, avanza también bidireccionalmente y forma dos neuroporos craneales, uno prosencefálico y otro mesencefálico.
3. **Punto 3:** empieza en el extremo más rostral del pliegue neural, adyacente al estomodeo o boca primitiva. Su avance es unidireccional, en dirección caudal hasta encontrarse con el punto 2 y cerrar el neuroporo prosencefálico. El extremo más craneal corresponde al labio superior facial.
4. **Punto 4:** en el ratón se inicia en el extremo caudal del rombencefalo y es unidireccional rostral hasta encontrarse con el punto 2, cerrando el cráneo. A diferencia del resto de los puntos, la fusión se realiza con el concurso de una

membrana que eventualmente cubre el rombenecefálo. La formación de esta membrana es hoy por hoy una incógnita.

5. **Punto 5:** presente en humanos y no en ratones, es responsable de la fusión del tubo neural entre L2 y la segunda vértebra sacra (S2). La neurulación secundaria es la responsable de la neurulación por debajo de S2.

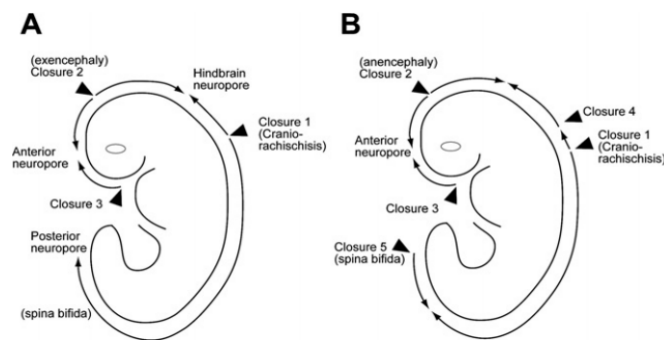


Figura 4. Teoría de los cinco puntos de cierre. 1. Romboencéfalo y médula espinal. 2. Prosencéfalo y mesencéfalo. 3. Extremidad rostral del pliegue neural. 4. Extremo caudal del romboencéfalo. 5. Responsable de la fusión del tubo neural entre L2 y S2 (10).

La teoría de los múltiples puntos de cierre goza de mayor respaldo en la actualidad, puesto que parece explicar satisfactoriamente los distintos riesgos de recurrencia, la frecuencia de otras anomalías asociadas y la especificidad de localización de las lesiones (10,26). Las modalidades de la malformación generadas por los fallos aislados o asociados en la fusión de los distintos puntos de cierre, se describen a continuación (10,15,22):

- **Punto 1:** espina bífida cervical y/o torácica.
- **Punto 2:** ausencia de los huesos parietales con los occipitales y el frontal intactos. Es el tipo de anencefalia más frecuente.
- **Punto 3:** se concreta en faciosquisis con hendidura facial que alcanza el labio superior.



- **Punto 4:** la escama occipital está ausente y el cerebro es anormal. En la craneosquisis occipital la ausencia de la membrana es completa.
- **Punto 5:** espinas bífidas entre L2 y S2.

| Punto de cierre | Iniciación del cierre | Dirección de fusión |
|-----------------|--|---------------------|
| 1 | 2° - 4° par de somitas, cierre de médula rostral y caudal. | ↑ |
| 2 | Punto de unión del prosencéfalo y del mesencéfalo. | ↑ |
| 3 | Extremo más cefálico del tubo neural (estomodeo). | ↓ |
| 4 | Cierre del rombencéfalo por una membrana. | ↑ |
| 5 | Extremo más caudal del tubo neural primario (S2) | ↑ |

Tabla 2- Descripción de los puntos de cierre del tubo neural humano (22)

Sin embargo, aunque los múltiples sitios de cierre del tubo neural han sido observados a nivel mundial en una amplia variedad de modelos animales, otras investigaciones han encontrado que el proceso de iniciación de los cierres del tubo neural no parece ser el mismo entre los humanos y otras especies animales (25).

2.5. Patogenia

La teoría de la cremallera según la cual el tubo neural se cierra de forma continua en su porción media y después en sus extremos, ha sido sustituida por la teoría de los múltiples puntos de cierre. Tal como se mencionó anteriormente, esta última hipótesis, que compara la embriogénesis del tubo neural de los humanos con el de los ratones, permite clasificar los DTN de acuerdo con los puntos de cierre involucrados (2,10,15,19). En este contexto, es posible que el cierre de cada punto se vea regulado por distintos genes, cada uno con diferente susceptibilidad a factores exógenos (nutricionales, ambientales o teratógenos) (25,28). La patogenia permite dividir los DTN según la etapa afectada de la neurulación, el momento de la apertura del tubo neural, el mecanismo de producción del mismo su coexistencia con otras anomalías (19).



2.6. Clasificación

Los DTN ocurren en varios niveles y pueden clasificarse en dos grupos: defectos abiertos y defectos cerrados. La falla en el cierre del tubo neural durante la neurulación primaria a cualquier nivel del cuerpo axial desde el cerebro hasta la espina dorsal da lugar a un defecto abierto en donde el tejido neural está expuesto al aire (15,23). Los defectos cerrados en los que la piel cubre completamente el tejido neural, comprenden la presencia de fallas a nivel de la zona anterior del neuroporo dando lugar a craneorraquisis o anencefalia y las fallas en el cierre en la zona del neuroporo posterior dan lugar a la mielosquisis o espina bífida (1,2,10).

Teniendo en cuenta el modelo de la cremallera, la hipótesis indica que los DTN son la consecuencia de la falla del cierre de los neuroporos anterior (anencefalia), posterior (espina bífida) o de la fusión de los pliegues neurales (raquisquisis, craneorraquisquisis) (1,2,10,15).

2.6.1. Anencefalia

Es el DTN más severo, donde parte o ambos hemisferios cerebrales están ausentes y no están cubiertos por cráneo, caracterizándose por la falta de cierre de la porción cefálica del tubo neural, dejando al descubierto el cerebro malformado. La anencefalía es una malformación grave y mortal, porque no hay desarrollo de hemisferios cerebrales, donde hay presencia de estructuras mínimas de lo que sería el cerebro (10,25,28). Los signos incluyen ausencia de huesos en las regiones lateral y anterior de la cabeza, plegamiento de las orejas, paladar hendido y defectos cardíacos congénitos. Los ojos y los pabellones auriculares son prominentes mientras que el resto de las estructuras faciales parecen normales. Este defecto es letal, aunque algunas veces las estructuras del tallo cerebral pueden estar conservadas, lo que permite tener funciones vitales para sobrevivir un corto tiempo, pero la mayoría de las veces los niños mueren pocos días después de nacer (1,2,28,29).



Figura 5. Anencefalia: Ausencia total o parcial del cerebro como resultado de fracaso del cierre de la porción cefálica del tubo neural que da lugar a una protrusión del cerebro a través del cráneo. El defecto ocurre cuando el extremo encefálico del tubo neural no logra cerrarse dando como resultado la ausencia de una parte del cerebro, cráneo y cuero cabelludo (105).

2.6.2. Iniencefalia:

Disrafismo en la región occipital donde el foramen mágnum es adyacente a la fontanela posterior con ausencia total o parcial de las vértebras cervicales y torácicas que permite al cerebro y cerebelo estar en contacto con la espina dorsal (1,2,28). Externamente los fetos tienen la cabeza hiperextendida y su occipucio parece fusionarse con la parte alta del raquis. En el 50-85% de los casos, la iniencefalia acompaña a otros defectos, entre los cuales se destacan la anencefalía, el encefalocele, las malformaciones genito-urinarias, las cardiopatías congénitas, la hernia diafragmática, entre otros. La letalidad de este defecto es muy alta y existen reportados muy pocos sobrevivientes (1,2,10,15,22,28).



Figura 6. Iniencefalia: Defecto de occipucio sumado a ausencia total o parcial de las vértebras cervicales y torácicas que permite al cerebro y cerebelo estar en contacto con la espina dorsal. La cabeza se encuentra en retro flexión extrema, la cara mira hacia arriba, también presenta



lordosis cervicotorácica y ausencia de cuello reflejado en la continuidad de la piel de la mandíbula y del tórax (105).

2.6.3. Encefalocele:

Es el defecto abierto del tubo neural menos frecuente, donde el contenido típico de la herniación es líquido cefalorraquídeo y tejido neural que se conecta al cerebro a través de un estrecho pedículo (1,2,23). La cubierta del saco herniario puede variar desde una capa bien formada con piel y cabellos, a una delgada capa meníngea, por lo que la lesión puede estar totalmente cubierta por piel, o alternar con zonas desprovistas de ésta. El encefalocele se localiza en la región occipital en el 75% de los casos y en menor proporción, alrededor del 15%, pueden localizarse en región parietal frontal y sincipital (2). Las manifestaciones clínicas dependen de la zona del cerebro herniada, siendo las más frecuentes las alteraciones visuales, microcefalia, retraso mental y crisis convulsivas; los encefaloceles sincipitales tienen además de las alteraciones visuales, manifestaciones nasales y auditivas (1). Aproximadamente la mitad de los pacientes con encefalocele occipital tienen inteligencia normal o levemente disminuida según otros autores, mientras que los encefaloceles parietales siempre están asociados a otras malformaciones cerebrales y el 40% de los casos presentan retraso mental (1,2).

Según su contenido tisular distinguimos:

- a) Cráneo bífido oculto: persistencia de un orificio craneal, generalmente en la línea media, que no se acompaña de desplazamiento de estructuras intracraneales.
- b) Meningocele: únicamente contiene meninges.
- c) Meningoencefalocele: incluye meninges y tejido cerebral.
- d) Encefalocistocele: constituido por el prolapso de meninges, encéfalo y sistema ventricular.



Figura 7. Encefalocele: Herniación del cerebro y las meninges a través de un defecto en el cráneo. Está típicamente cubierto por la piel (defecto de cierre) o una capa delgada de epitelio (defecto abierto). El cefalocele se incluye en el grupo de los defectos que resultan de la falla del cierre del tubo neural (105)

2.6.4. Craneorraquisquisis

Defecto caracterizado por anencefalia acompañada de un defecto óseo contiguo de la columna vertebral y la exposición del tejido neural. En algunos casos, los afectados pueden nacer vivos, pero fallecen al poco tiempo de su nacimiento. Las funciones neurológicas preservadas se limitan a las reflejas tronculares y espinales, con hiperextensión cefálica leve y pueden presentarse convulsiones en algunos casos (1,2,28,29).



Figura 8. Craneorraquisquisis: La alteración primaria del mesodermo axial impide la formación, elevación y aproximación de los pliegues neurales resultado en craneorraquisquisis (105).



2.6.5. Espina Bífida (OMIM 182940)

Es la anomalía congénita más común del sistema nervioso central compatible con la vida, debida a la ausencia de fusión de las apófisis espinosas vertebrales (1). Según la presentación clínica, se divide en dos grandes clases:

2.6.5.1. Espina Bífida Oculta

Se define como la falta de fusión de los arcos de una o más vértebras, en donde la anomalía del arco vertebral se debe a la falta de crecimiento normal y de fusión en el plano medio de las mitades embrionarias (2,28). Su localización más corriente es L5 y S1, suele afectarse una sola vértebra, estar cubierto por piel, por lo general no comprende el tejido nervioso subyacente y no causa daño alguno a la médula espinal (2). Es la espina bífida menos severa y por lo general es asintomática, aunque en algunas personas pueden detectarse dolores en la zona lumbar, piernas, genitales o algunos problemas urológicos. Por otra parte, cuando a esta anomalía se asocian malformaciones subyacentes de la médula espinal sin discontinuidad de la piel, el complejo malformativo se designa como disrafismo espinal oculto (1,2). El individuo también puede presentar otros trastornos congénitos relacionados con el disrafismo espinal, que por lo general son trastornos de la médula espinal o del sistema musculo esquelético, como la hidrocefalia, siringomielia, quistes aracnoides intradurales, dislocación de la cadera o trastornos similares (1). Para el diagnóstico es necesario el uso de técnicas de imagen como la radiografía simple o la resonancia nuclear magnética (RNM) (17). La resonancia nos ayuda a averiguar si la médula está anclada o hay otras lesiones medulares concomitantes como las malformaciones con médula hendida y la siringomielia (2).



Figura 9. Espina Bífida Oculta: Se aprecia el defecto de cierre en la región lumbosacra cubierto por piel. Por lo general no comprende el tejido nervioso subyacente ni causa daño alguno a la médula espinal y puede estar acompañado de una región cubierta de pelo, un angioma, un neví pigmentario o una depresión que puede pasar inadvertido durante muchos años (105).

2.6.5.2. Espina Bífida Quística

Las formas más frecuentes son el meningocele y mielomeningocele, lipomeningocele y el mielocistocele. La espina bífida quística representa los diferentes tipos de espina bífida graves, que cursan con la salida de la médula espinal, las meninges o ambas, haciendo protrusión a través del defecto de los arcos vertebrales y de la piel para formar un saco semejante a un quiste. La mayoría de estas alteraciones se localizan en la región lumbosacra, aunque pueden ocurrir en cualquier punto de la columna vertebral (1,2,10).



Figura 10. Espina Bífida Quística: Cierre incompleto de la columna vertebral (usualmente posterior) a través del cual hay herniación de la médula espinal y/o meninges. El defecto puede estar ubicado en cualquier lugar a lo largo de la médula espinal y puede comprometer un nivel o la totalidad del neuroeje. La frecuencia de localización de las lesiones es: cervical, 3.7%; torácico, 7.5%; toracolumbar, 9.9%; lumbar, 42.2%; lumbosacro, 27.7%; sacro, 8.6%; y anterior en cualquier



nivel vertebral, 0.44%. El nivel afectado más alto es el que determina el grado de compromiso neurológico asociado (105).

| Nivel Lesional | Clínica |
|----------------|--|
| D12 – L1 | Paresia e hipoestesia del suelo de la pelvis y las extremidades inferiores. |
| L2 – L4 | Luxación de la cadera, Genu recurvatum, pie equinovaro. |
| L5 | Flexión de la cadera sin luxación, movilidad de cuádriceps conservada con ligera limitación de la flexión de la rodilla y pie valgo. |
| S1 | Pie en balancín, trastornos sensitivos en silla de montar y plantares. |
| S2 – S4 | Vejiga neurógena e incontinencia anal. |

Tabla 3- Alteraciones neurológicas de la espina bífida según el nivel de lesión medular (22).

2.6.6. Mielomeningocele (Defecto abierto)

Es un defecto de nacimiento donde la columna vertebral y el conducto raquídeo no logran cerrarse completamente como resultado de una deficiencia en la neurulación primaria, proceso que comienza inmediatamente después de la fertilización y que afecta el sistema nervioso central, generando incapacidades permanentes (1,19). El mielomeningocele es el tipo más común de espina bífida, en la cual los huesos de la columna no se forman completamente, lo que da como resultado un conducto raquídeo incompleto. Esto hace que la médula espinal y las meninges (los tejidos que recubren la médula espinal) protruyan de la espalda del niño, su coloración es rojiza o amarillenta y está surcada por vasos finos (1,2,28). Las complicaciones clínicas más comunes son la parálisis, incontinencia urinaria, pérdida del control vesical e intestinal, problemas cardíacos, óseos e hidrocefalia en más del 80% de los casos, producida por el aumento de la presión del líquido cefalorraquídeo que circula en el cerebro, alrededor de este y de la médula espinal. Comprende trastornos motores, sensitivos y tróficos, con sus consiguientes repercusiones ortopédicas. A su vez, los problemas secundarios al desplazamiento de las raíces nerviosas determinan la aparición frecuente de trastornos neurológicos en estos pacientes (1,27).



Figura 11. Mielomeningocele: La espina no se fusiona de manera conjunta, permitiendo el crecimiento de una especie de bolsa hacia fuera de los contenidos espinales, incluyendo el fluido cerebro espinal, la médula espinal y las líneas nerviosas con meninges y algunas veces piel, que protruyen por la espalda del niño, produciéndose en cualquier parte de la columna vertebral (105).

2.6.7. Meningocele

La disrafía espinal únicamente causa prolapso de las meninges, pero la médula espinal y sus raíces permanecen normosituadas. Su cubierta externa es normalmente cutánea y el pronóstico es mucho mejor, dado que no se acompaña de otras alteraciones neurológicas (1,23).



Figura 12. Meningocele: La espina no se fusiona de manera conjunta, permitiendo el crecimiento de una especie de bolsa que contiene únicamente contenidos espinales y fluido cerebro espinal (105).



2.6.8. Lipomeningocele

El término se refiere a una masa cubierta por piel, originada en el tejido celular subcutáneo y que se extiende a la duramadre y al espacio intradural, produciendo anclaje medular a un nivel inferior y más dorsal que en condiciones normales. Dicha tumoración puede adherir las raíces nerviosas dorsales y ventrales. Al vincularse únicamente a anomalías neurológicas locales tiene un pronóstico intermedio entre el mielomeningocele y el meningocele (1,2,10,15).

2.6.9. Mielocistocele

Dilatación terminal de la médula espinal secundaria a hidromielia (dilatación del canal endimario). Externamente se observa como una tumoración voluminosa cubierta por piel (1).

2.7. Epidemiología

Los DTN se encuentran entre las malformaciones congénitas más comunes en la mayoría de las poblaciones y aunque los análisis de los patrones de herencia de los DTN han revelado la existencia de alguna agregación familiar, la mayoría de estos defectos no siguen un patrón de herencia mendeliana y tienen un origen de tipo multifactorial (7).

Se considera que los DTN tienen una de las frecuencias más elevadas de todas las malformaciones congénitas. Dichas tasas varían de una población a otra, en función de factores geográficos, genéticos y características demográficas y nutricionales maternas (30,31). La frecuencia de los defectos congénitos se expresa en términos de prevalencia, hablar de incidencia no tiene razón de ser ya que ésta se refiere a la ocurrencia de malformaciones entre la población de embriones susceptibles (22).



Como muchos defectos congénitos conducen a la muerte del concebido antes de ser diagnosticados, resulta imposible conocer la incidencia real de los mismos, por lo que, con sigüiente, los niños malformados que se incluyen en los registros representan sólo a aquellos individuos que sobrevivieron con sus anomalías el tiempo suficiente para ser diagnosticados (28,32). Los DTN están entre las malformaciones congénitas más frecuentes, con una prevalencia de 1:1000 recién nacidos vivos en la mayoría de las poblaciones, incluyendo la nuestra (12,33). En Colombia, las malformaciones congénitas son la segunda causa de mortalidad infantil desde 1994, representando un grave problema de salud pública (20), por lo que se han iniciado diferentes investigaciones, tales como el Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas (ECLAMC), liderado por el Instituto de Genética de la Pontificia Universidad Javeriana desde el año 2001, con el fin de poder entender mejor los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades, generando nuevas estrategias de prevención y manejo adecuado de los pacientes para mejorar su calidad de vida (32). Esta vigilancia concuerda con el Plan Nacional de Salud Pública, 2007-2010 (Decreto 3039 de 2007), el cual propone estrategias en la vigilancia y el control de las anomalías congénitas que tienen un impacto directo en la mortalidad infantil y en la discapacidad de la población (34,35), mediante el desarrollo de políticas en salud, teniendo como primer objetivo la atención de la población infantil de nuestro país (9). El impacto de las medidas preventivas sobre la presencia de las anomalías del tubo neural, es valorado principalmente mediante la implementación de la prevención primaria en la población, con la ingesta de suplementos pre concepcionales con ácido fólico y la fortificación de alimentos de consumo diario y con la prevención secundaria mediante la aplicación de estrategias de detección precoz de la malformación.



2.8. Metabolismo del folato y la homocisteína y su relación con los defectos del tubo neural

Las experiencias positivas sobre la prevención primaria de los DTN con ácido fólico, han desplazado el interés de los investigadores hacia el folato y otros compuestos relacionados con su metabolismo, como la homocisteína y la vitamina B12. El metabolismo del ácido fólico y la homocisteína es esencial para entender el desarrollo del defecto por lo que los polimorfismos genéticos de las enzimas involucradas en esta vía metabólica interactúan de manera diferente con el ambiente (20).

2.8.1. Ácido Fólico

2.8.1.1. Estructura del ácido fólico

La molécula de ácido fólico se compone de un anillo de pterina unida mediante un puente de metileno a un ácido p-aminobenzoico. Al extremo carboxilo de la molécula se pueden unir desde uno hasta siete restos glutamato. En los alimentos se encuentran los folatos preferiblemente en forma de poliglutamatos, aunque también están presentes mezclas de mono y poliglutamatos (36). Usualmente se usa el nombre “folato” cuando se refiere a la forma natural de la vitamina y “ácido fólico” a la forma sintética (37).

2.8.1.2. Metabolismo del Folato

El ácido fólico se involucra en varios procesos metabólicos durante la embriogénesis y a lo largo de la vida, participando en reacciones de transferencia de un único carbono en numerosas vía metabólicas incluyendo la síntesis de colina, serina, glicina, metionina y ácidos nucleicos (38).

En los alimentos, los folatos están en forma de poliglutamatos, pero las coenzimas más abundantes son el N5 metil –THF, seguido del formal-THF que en la etapa



postprandial con el pH gástrico (pH 3.5) se degrada (22,39). La presencia del ácido ascórbico endógeno en el lumen gástrico posibilita la conversión del N5 - metil -5,6 dihidrofolato en N5 metil -THF que es más estable, lo que es crucial para optimizar la biodisponibilidad del folato en el organismo (22). Por otra parte, la absorción del folato tiene lugar en el yeyuno proximal mediante un mecanismo de transporte activo que es pH-dependiente y saturable, de tal forma que si las concentraciones intestinales de folato se aumentan, el organismo recurre a mecanismos de difusión pasiva, a consecuencia del primer mecanismo (22,39).

2.8.1.3. Transporte del folato en el organismo

El paso del folato a las células sucede mediante dos mecanismos (22,40)

1. El primer mecanismo es dependiente de una proteína de transporte (RFC Reduced Folate Carrier), primordial para el transporte de folatos hacia el interior de las células.
2. El segundo utiliza diferentes isoformas de receptores de folatos (FRs), que se hallan en lípidos extracelulares, distinguiéndose las formas solubles y las ligadas a la membrana celular. La fracción soluble protege a los folatos reducidos de la oxidación y es una forma de almacenamiento, en cuanto la fracción de membrana acumula el folato en la superficie celular y lo transporta dentro de las células (22).

2.8.1.4. Funciones metabólicas del folato

En los humanos tienen lugar cinco reacciones que son folato-dependientes (5,15,36,38,40):

1. Conversión de dUMP (ácido desoxiuridílico) a dTMP (ácido desoxitimidílico), nucleótido precursor de la base nitrogenada pirimidínica timina. Esta reacción es la única que genera dihidrofolato in vivo y es vital para la síntesis del ácido



desoxirribonucleico (ADN), de forma que si no hubiera suficiente folato para llevarse a cabo, la replicación del ADN y la mitosis se verían comprometidas.

2. Síntesis de las purinas mediante el aporte de los carbonos (C2 y C8). Los folatos transfieren los radicales formato del N10 formil-THF para la síntesis de formilglicinamida ribonucleótido (FGAR) y 5-formilaminoimidazol 4-carboxamida ribonucleótido (FAICAR), que son precursores de las bases purínicas.
3. Remetilación de la Homocisteína (Hcy) para transformarla en metionina con la vitamina B12 como cofactor. Los errores presentados en esta vía metabólica están directamente relacionados con la escasez de la metionina exógena.
4. Paso de serina a glicina. La serina es probablemente la mayor fuente de grupos monocarbonados transferidos por los fosfatos.
5. Hidrólisis de histidina a glutamato, mediante la cual el THF se transforma en formimino-THF.
6. El folato es uno de los sustratos más esenciales para el metabolismo celular, ya que los metilados derivados del folato son donantes de un grupo carbono para la síntesis de nucleótidos. Otro derivado del ácido fólico la N5-metilenetetrahidrofolato (5-MTHF), producida de la 5,10 metilenetetrahidrofolato por la MTHFR, es donante de su grupo metilo para la síntesis de la Metionina (Met) a partir de Homocisteína (Hcy). Esta reacción es catalizada por la Metionina Sintasa (MS), que tiene como cofactor la Cobalamina (Vitamina B12).

En conclusión, las funciones metabólicas del folato se relacionan con la síntesis de ácidos nucleicos y en la interconversión de aminoácidos. El folato aporta los carbonos necesarios para la producción de bases purínicas y pirimidínicas, interviene en el catabolismo de la histidina, la remetilación de la homocisteína y



son de importancia para la expresión génica de los DTN por estar involucrados en procesos de transcripción y transducción de genes (36,37,38).

2.8.2. Metabolismo de la homocisteína

La homocisteína es un metabolito azufrado intermedio formado durante la conversión de metionina a cisteína. La metionina es un aminoácido esencial y constituye la única fuente de Hcy. Se ignora el origen exacto de la Hcy plasmática, aunque se cree que proviene de los hepatocitos y de las células en proliferación. La enzima es captada por las células y metabolizada, dado que sólo el 0.05 de la Hcy producida por las células se elimina a través de la orina (28,41,42).

2.8.2.1. Variabilidad biológica de la homocisteína

La concentración de Hcy aumenta directamente proporcional a la edad, evidenciándose concentraciones más aumentadas en los hombres y en las mujeres postmenopáusicas, lo que es atribuido a las diferencias en los niveles vitamínicos en los diferentes grupos de edad y los distintos sexos por influencia de hormonas sexuales (41). Con respecto a los diferentes grupos étnicos, se han encontrado niveles inferiores de tHcy basal en los negros sudafricanos comparados con blancos de la misma edad y dieta (22,43), también se han encontrado niveles más bajos de tHcy para la población asiática con respecto al resto de las etnias (44).

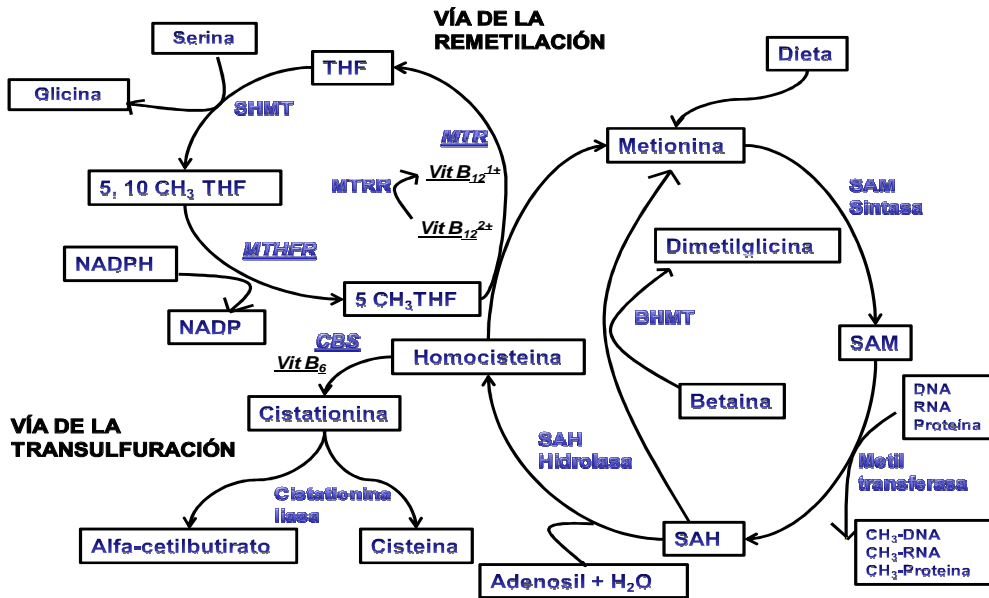


Figura 13. Ruta Bioquímica del metabolismo de la Homocisteína-Metionina. La Homocisteína utiliza dos vías para su metabolización: la vía de la remetilación (*izquierda arriba*) y la vía de la transulfuración (*izquierda abajo*). Las enzimas y los cofactores subrayados juegan un papel importante en la regulación de la Homocisteína. Azul: enzimas; Negro: cofactores. **SAM**: S-Adenosil metionina; **SAH**: S-Adenosil Homocisteína.; **MTRR**: Metionina sintasa reductasa; **MTR**: Metionina sintasa; **SHMT**: Serina hidroximetil transferasa; **MTHFR**: Metilene tetrahydrofolato reductasa; **CBS**: Cistationina β sintasa; **BHMT**: Betaina hidroximetil transferasa (Figura original de Garcia, Reggie y Ayala, Paola. Instituto de Genética Humana. Pontificia Universidad Javeriana).

La homocisteína participa en tres reacciones en el organismo (22,45,46):

1. Reacciones de remetilación en las cuales intervienen la MTR y la betaína hidroximetiltransferasa o betaína –Hcy metiltransferasa (BHMT), la primera es ubicua y es la más importante, mientras que la segunda sólo está presente en el riñón y en el hígado.
2. Reacción de transulfuración irreversibles que se pueden llevar a cabo en su totalidad en el hígado, el páncreas y los riñones. La transulfuración es la única reacción que puede eliminar la homocisteína.

El aumento de la homocisteína se debe tanto a causas ambientales (nutricionales y de estilo de vida) como genéticas (mutaciones y polimorfismos presentes en genes codificantes de las enzimas involucradas en el metabolismo de la homocisteína). Por tanto, teniendo en cuenta las bases genéticas de los DTN y el



impacto del consumo preconcepcional de ácido fólico es posible establecer un punto en la fisiología materno fetal (36,46).

2.9. Etiología

La causa exacta de estas malformaciones aún es desconocida, pero la literatura revisada sugiere que probablemente tienen un origen multifactorial, con componentes genéticos y ambientales (1,2,7,13,19,47,48,49,50,51). Los DTN constituyen un grupo heterogéneo de anomalías, razón por la cual el impacto de un factor de riesgo determinado depende de la ubicación de la malformación y de su asociación a otros defectos (22).

2.9.1. Factores moduladores de la frecuencia de los DTN

Se ha encontrado que los factores ambientales pueden modular la expresión génica de la enfermedad lo que se correlaciona con las diferentes frecuencias encontradas en los casos de DTN en diferentes regiones geográficas (18,19). Las frecuencias de DTN son mayores en los grupos con menor estatus económico y educativo, y en territorios en donde la población tiene deficiencias alimentarias (30). La frecuencia de los DTN se ve modificada con la presencia de factores moduladores (ingesta de ácido fólico preconcepcional, exposición a fármacos anti folato, presencia en la madre de desórdenes que afectan el metabolismo de la glucosa, diabetes, obesidad, desnutrición, exposición a altas temperaturas (fiebre) en los primeros meses del embarazo, uso prenatal de medicamentos antiepilépticos, estrés materno, ingesta de plomo en el agua potable, ingesta de drogas, alcohol y exposición a otros teratógenos entre otros (5,12,19,31,34,43,45). Asimismo, se ha señalado que ciertas exposiciones ambientales y laborales a diversas sustancias químicas, como plaguicidas y algunos disolventes (35) y otras asociaciones entre la edad materna, diarrea, ingesta de tabaco y consanguinidad pueden aumentar el riesgo para los DTN. Por otra parte, el incremento en el riesgo de presentar DTN, no ha resultado asociado con ingesta de aspirina, cafeína ó anticonceptivos orales (19).



2.9.1.1. Factores ambientales

2.9.1.1.1. Factores étnicos y raciales

En numerosos artículos se ha planteado que la frecuencia de los DTN es más alta entre los hispanos, seguidos por los blancos no hispanos, los indios, los afroamericanos y los asiáticos. En Estados Unidos la frecuencia de los DTN es muy baja entre la población negra (42). Las diferencias de frecuencia de la malformación entre las diversas etnias tanto se atribuyen a un trasfondo genético propio, como a factores exógenos tales como la dieta alimenticia, costumbres y medio ambiente (8,,11,43,45). Para poblaciones caucásicas hispánicas, la frecuencia de los DTN es de 0.75 (26,42). En el norte de Irlanda se ha encontrado una frecuencia entre 6.38 – 10.92, mientras que en otras ciudades de Europa se han reportado frecuencias de 0.1 – 0.6 y de 1.0 en Estados Unidos (52,53). De acuerdo a informaciones suministradas por el Centro Internacional de Defectos de Nacimiento (ICBD) en 1998, México es el país con la frecuencia más alta para los DTN (47,16), mientras que Suiza posee la frecuencia más baja a nivel mundial (0.45). Posteriormente, han sido reportadas frecuencias mayores para los DTN en China, en donde la frecuencia de ocurrencia de la malformación oscila entre 7.25 – 8.0 por cada 1000 recién nacidos vivos (54). La anencefalía y espina bífida parece afectar más a menudo a las mujeres y las tasas de incidencia de la malformación es más baja en la raza negra que en los hispanos, en comparación con los blancos (26,31,36,42).

2.9.1.1.2. Altitud

Pocos estudios han considerado la altitud como factor asociado a los DTN hasta el momento e incluyen los datos del ECLAMC entre los años 1967 y 1995, revelando un riesgo significativamente inferior para anencefalia y espina bífida por encima de los 2000 m sobre el nivel del mar. Estos hallazgos pueden estar dados por la



altitud, pero a su vez, pueden ser debidos a factores de confusión no identificados (22).

2.9.1.1.3. Variaciones estacionales

Con respecto a la influencia de la estación sobre la concepción de los DTN, en algunos estudios desarrollados en el tema no se ha podido probar que la variación estacional influyera ni sobre la concepción de niños con espina bífida ni con encefalocele (42), mientras que en otros estudios resulta estadísticamente significativo la asociación entre la variación estacional (primavera e invierno) y la anencefalia (22). A la luz de estos hallazgos se piensa que es posible la existencia de una variación estacional de la frecuencia de los DTN en ciertas áreas geográficas con alta frecuencia de estas anomalías, en donde el cambio de las condiciones ambientales influenciaría la disponibilidad de ciertos nutrientes (26).

2.9.1.1.4. Embarazos múltiples

El mayor riesgo de defectos congénitos entre los embarazos de gemelos no se restringe únicamente a los DTN, pero existen numerosos estudios que han reportado una mayor frecuencia de DTN entre las gestaciones múltiples. Por otra parte, entre las distintas modalidades de DTN, la que se vincula más frecuentemente a los embarazos múltiples es la anencefalia (22,55).

2.9.1.1.5. Sexo fetal

Recientemente se ha planteado que la anencefalia encontrada en humanos ocurre más frecuentemente en mujeres que en hombres. Estos efectos de género durante el plegamiento de los pliegues neurales pueden estar relacionados con la presencia de un inactivo y altamente metilado cromosoma X en las células femeninas (26). Las hipótesis explicativas que se han propuesto son entre otras, una mayor tasa de abortos espontáneos entre los fetos masculinos afectados y la



desviación preferente de los radicales de metilo hacia la metilación de los cromosomas. Por otra parte, la existencia de un cromosoma X mucho más grande que el Y sería la causa de un requerimiento mayor de metilos en los embriones femeninos (51). El predominio femenino es más notable en la anencefalia, iniencefalia y en los mielomeningoceles de ubicación torácica, donde la distribución sexual de los DTN depende del área geográfica considerada, del año de nacimiento y la tasa de supervivencia del feto afectado (42,56). Según algunos autores la asociación de los DTN con otras anomalías modifica la ratio sexual de estos defectos (8), mientras que según otros, la presencia de otras anomalías no la hacen variar (22).

2.9.1.1.6. Antecedentes familiares

La herencia de los DTN, tiene un riesgo de recidiva intermedio entre los trastornos esporádicos y las enfermedades de herencia mendeliana. La teoría multifactorial de la herencia, plantea que todos los individuos tienen una predisposición mayor o menor a contraer una enfermedad determinada, que es visiblemente evidente cuando dicha predisposición excede un límite a partir del cual el fenotipo exhibido es anormal (1,2). Algunas de las características más importantes de la teoría multifactorial aplicadas a los DTN aislados son (1):

1. Los DTN se agregan en algunas familias, sin embargo no existe un patrón claro de herencia que explique la aparición de los casos.
2. El riesgo de DTN en parientes de primer grado es mayor, comparado con un riesgo menor presentado para los parientes de segundo grado.
3. El riesgo de recurrencia de los DTN es mayor si está afectado más de un miembro de la familia.
4. Los DTN tienen una recurrencia heteróloga, es decir, la aparición de distintas modalidades de la malformación en miembros de una misma familia.



2.9.1.1.7. Condición socioeconómica

Las frecuencias de los DTN son mayores en los grupos con menor estatus económico y educativo y en territorios en donde la población tiene deficiencias alimenticias (19,20,24,34,40,47,50,56,57), por lo que se ha planteado que un cambio en el suplemento vitamínico de la población puede influir en la presentación de la malformación, convirtiendo el folato en un modulador importante del riesgo de DTN teniendo en cuenta que su presencia en el organismo contribuye en procesos importantes como la síntesis de ADN, división celular, crecimiento tisular y en procesos de metilación indispensables para la regulación génica (5,19,33,36,48,58,59).

2.9.1.1.8. Altas temperaturas

La hipertermia es un teratógeno comprobado mediante estudios que han reportado un umbral de su efecto en la mayoría de las especies alrededor de 1.5 °C por encima de la temperatura corporal normal. Temperaturas más altas y de mayor duración suelen causar abortos, mientras que las elevaciones de menor duración suelen ocasionar anomalías congénitas (22). Los DTN se encuentran entre las anomalías más frecuentemente asociadas a la hipertermia (56,57). La exposición a fuentes de calor exógenas como factor de riesgo de DTN es controvertido, pero a partir de los estudios realizados, es posible afirmar que se debe evitar la fiebre, saunas y baños calientes durante el primer trimestre de embarazo, o como mínimo durante las seis primeras semanas de gestación (22).

2.9.1.1.9. Diabetes

Estudios realizados en modelos murinos de diabetes gestacional, han revelado que la diabetes mellitus tipo 1 y 2, se asocia con mayor riesgo de malformaciones congénitas, dado que el riesgo de concebir un feto malformado es proporcional a la desviación de las concentraciones de glucosa en la sangre (28). Los defectos



más prevalentes presentes entre los casos de madres diabéticas, afectan el sistema nervioso central y cardiovascular, por lo que este factor ambiental se ha considerado como un posible modulador de los DTN (28,56,57) afectando la expresión de genes involucrados en el control de procesos esenciales en el desarrollo, tal como es el caso del gen *Pax3* que se expresa en las primeras etapas del desarrollo embrionario en el tubo neural y se puede ver inhibido en su expresión por el estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia materna. Adicionalmente, se ha planteado que si bien las alteraciones metabólicas presentes en la diabetes mellitus tipo 1 y 2 pueden interferir con la embriogénesis, la insulina quizá no está involucrada al no producirse en etapas en las cuales el embrión es sensible (51).

2.9.1.1.10. Peso materno

La relación entre el peso materno y los DTN no está muy bien definida, al encontrarse los hallazgos de las diferentes investigaciones sobre este particular contrapuestas. Algunos estudios han encontrado asociación entre el sobrepeso materno y los DTN (51,56). Por el contrario el bajo peso materno se interpreta como una consecuencia de portar un hijo con una malformación y no como una causa, puesto que el incremento ponderal durante la neurulación es relativamente escaso con respecto a la ganancia durante el resto de la gestación (22).

2.9.1.1.11. Exposición a agentes químicos

En referencia a los factores ocupacionales tanto maternos como paternos, los hallazgos son variados, pero en la mayoría de estudios no se ha podido vincular de forma concluyente la profesión ni la exposición a sustancias químicas (gases, mercurio, radiaciones ionizantes, pesticidas, desinfectantes, glicol éteres y solventes) durante la jornada laboral a la concepción de casos con DTN (51). El plomo por su parte se ha considerado como un factor de riesgo de aparición de DTN y se ha encontrado un incremento estadísticamente significativo de DTN en



los individuos expuestos al plomo en comparación con los individuos control. Por el contrario, no se ha encontrado correlación alguna entre las concentraciones de plomo en el agua corriente y la frecuencia de DTN (51,57).

2.9.1.1.12. Fármacos

La teratogenicidad causada por los agentes antifolato parte de la experiencia obtenida con el metrotexate y la aminopterina como agentes abortivos, el espectro de las malformaciones asociadas es amplio e incluye los DTN. Los fármacos antiepilépticos, fundamentalmente valproico y carbamazepina, causan DTN entre los CASOS de las gestantes que los toman durante la neurulación (51,56,57). Se ha evidenciado que el ácido valproico afecta al punto de cierre 5 (región lumbosacra) y la neurulación secundaria; la carbamazepina por su parte afecta de modo preferente a los puntos de cierre 2, 1 y 5, dando lugar a meroacrancias y espinas bífidas (51).

2.9.1.1.13. Ingesta de ácido fólico

El folato sérico está fuertemente correlacionado con su aporte exógeno y la tendencia hacia el descenso de su concentración en las madres de los DTN se atribuye tanto a las dietas pobres en nutrientes como a una mala absorción de folatos (2,8,20,36). En la actualidad aún se desconocen muchos de los aspectos que modulan la biodisponibilidad de los folatos, pero se piensa que la absorción se ve influida por diferentes aspectos relacionados con la preparación de los alimentos, diferencias en la unión a la mucosa por parte del folato, presencia de inhibidores del transporte del folato y captación tisular selectiva en función de la repleción de las reservas (22,60).

Dado que la biodisponibilidad del folato es baja en el organismo y se requiere la ingesta de grandes cantidades de alimentos ricos en folatos que muchas veces son susceptibles a la destrucción por cocción y procesamiento reduciendo el nivel de folato requerido (0.4 mg/día) (16,34,31,58), la vitamina se sintetizó en forma de



pteroilmonoglutamato que es la forma más oxidada y termoestable para ser utilizada en muchos países pre concepcionalmente como medida de prevención primaria en la fortificación de alimentos de uso masivo como harinas, pastas, leche y otros productos de granos enriquecidos con la vitamina (2,16,20,59,61,62,63).

El uso de ácido fólico preconcepcional para la prevención de los DTN, es una medida de gran impacto en la salud pública, pues se describe que las mujeres que consumen suplementos vitamínicos o alimentos fortificados con ácido fólico durante este período reducen en forma significativa (en un 50% - 70%) el riesgo de ocurrencia de DTN en sus hijos (2,12,16,20,24,26,30,34,36,47,62,63,64,65, 66) y en los últimos años se han realizado numerosos estudios que evidencian el efecto protector que tiene el consumo materno de ácido fólico frente a la aparición de la malformación (18,31,36). El mecanismo exacto de este efecto protector aún no está muy claro, pero se cree que está relacionado con las enzimas que intervienen en el metabolismo del folato y la homocisteína asociadas con la etiología de estos defectos (18,28,36,59).

La efectividad de la ingesta suplementaria de folato como prevención de los DTN y el alto nivel de homocisteína en sangre de las madres con niños con DTN, sugieren que existen genes involucrados en el metabolismo del folato y la homocisteína que pueden estar asociados con la etiología de estos defectos (5,57). Por tal motivo, el riesgo de tener un hijo afectado con DTN, ha sido asociado con la medición de los niveles de folato eritrocitario (RBC), como un mejor indicador de deficiencia del folato comparado con la determinación del folato sérico (36,67).

Más recientemente, múltiples investigaciones han demostrado la existencia de efectos secundarios al consumo excesivo de ácido fólico, así como un aumento en la frecuencia de gemelaridad entre las madres, especialmente de tipo dicigótico, posterior a la implementación de la fortificación de los alimentos con la vitamina (55).



En Sur América, la fortificación alimenticia con ácido fólico ha sido implementada en tres de 10 países, comenzando en Chile (2000), Argentina (2003) y finalmente en Brasil (2004), comprobándose su efectividad mediante la evidente reducción en las frecuencias de la malformación en la población años después del implemento de la fortificación (63). Otros estudios de evidencia de la eficacia de la dosis de ácido fólico han sido desarrollados en otros países como China, Irlanda, Francia, Australia, Estados Unidos, Hungría e Italia (16,21,31,34,68,69).

2.9.1.1.14. Ingesta de zinc y otros elementos

El zinc es un nutriente adicional esencial para el crecimiento y desarrollo fetal adecuado porque facilita la transcripción de los genes y es necesario para la división, desarrollo y diferenciación celular. La inadecuada ingesta de zinc ha sido asociada con la presencia de DTN en humanos y animales (10,70). A su vez, la deficiencia de Zinc, Selenio y Cobre ha sido asociada con el riesgo de desarrollar DTN, así como concentraciones séricas elevadas de plomo en la madre (70).

2.9.2. Factores genéticos

La prevención primaria exitosa de los DTN con ácido fólico, confirmada por estudios de elevada calidad en el mundo, ha constituido el punto de partida de numerosas investigaciones sobre el metabolismo del folato y la homocisteína. A nivel genético se ha propuesto que alteraciones en los genes que codifican para enzimas que participan en el metabolismo de estos compuestos bioquímicos, están involucradas en estas malformaciones (12,18,28,71,72). A su vez, el estudio de rutas bioquímicas adicionales que intervienen en el desarrollo, los experimentos en modelos animales y la evidencia posicional, han permitido la asociación de numerosos genes candidatos con los DTN (58).

Los genes candidatos que pueden estar involucrados en la formación y cierre anormal del tubo neural son principalmente:



2.9.2.2. Genes involucrados en el metabolismo del folato

2.9.2.2.1. Gen del Receptor Alfa del Folato Reducido (*RF α*)

Es una proteína de membrana que posee una gran afinidad por la 5-Metilenetetrahidrofolato (5-Me-THF), por lo que cualquier alteración del receptor del folato disminuye su transporte hacia el interior de la célula, alterado la disponibilidad necesaria para un adecuado desarrollo embrionario. De esta forma, se plantea que los genes involucrados en el transporte del folato pueden ser genes candidatos importantes para determinar la susceptibilidad a los DTN (2,12,26,28,46) Esta teoría está fuertemente soportada por la presencia en grandes concentraciones de dicho receptor en la cara materna de la placenta para favorecer la toma del folato del espacio intervelloso (48). Las variaciones en los genes que codifican para dichos receptores son muy raras y han sido identificadas en muy pocos pacientes, pero probablemente estos receptores son esenciales durante la embriogénesis lo que conlleva a la muerte del feto (7).

2.9.2.2.2. Gen de la Metilenetetrahidrofolato Deshidrogenasa (*MTHFD*)

La enzima N5, N10 metilen-THF deshidrogenasa, Ciclohidrolasa y la sintetasa, catalizan tres reacciones secuenciales que interconvierten entre sí a tres derivados oxidados de THF, que a su vez, son los sustratos para la síntesis de metionina, timidilato y purinas. El gen *MTHFD1* (OMIM 172460), codifica para la enzima MTHFD, la cual juega un papel importante en el metabolismo del folato por ser necesaria para la síntesis de las purinas, pirimidinas y para las células en división rápida, como son las embrionarias encargadas de la formación y cierre del tubo neural (12,24,30,38,47,62,64). La mutación más frecuente encontrada en este gen, corresponde a una sustitución G878A, responsable de una sustitución de una Arginina por una Histidina (R293H) en la proteína MTHFD. En algunas poblaciones como la italiana e irlandesa, se ha encontrado una sustitución G1958A asociado a un mayor riesgo materno de tener un embarazo con un hijo



afectado con DTN (28,30,52,53,64), pero otros estudios no han logrado encontrar asociación de la presencia del polimorfismo con la etiología de los DTN (9,62,73).

2.9.2.2.3. Gen de la Metilendetrahidrofolato Reductasa (*MTHFR*)

La MTHFR (OMIM 607093) es una proteína homodimérica de 656 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 650 kD. El gen que codifica para la enzima está ubicado en el cromosoma 1p36.3, tiene una longitud de 1980 pares de bases (pb) y se compone de 11 exones con una longitud que oscila entre 102 y 432 pb e intrones entre 250 y 1.5 kb, a excepción de un intrón con 4.2 kb (22). La MTHFR es una de las enzimas reguladoras más importantes del metabolismo de la homocisteína (Hcy) y su alteración tiene un efecto en la concentración total de homocisteína plasmática tHcy (32). La asociación de la hiperhomocisteinemia con el riesgo de presentar DTN involucra alteraciones en enzimas tales como la MTR, BHMT y CBS que degradan la homocisteína (16,32,38,46,59,74). Diferentes investigaciones muestran una relación entre la tHcy en el plasma y el bajo peso al nacer, preclamsia, pérdidas prematuras y recurrentes y DTN en los niños (4,45). Sin embargo, no más del 25% de los casos de DTN prevenibles con ácido fólico pueden ser explicados por la presencia de estas mutaciones, lo que indica que existen otras enzimas involucradas en el metabolismo del folato y la homocisteína, involucradas en este proceso (62). Numerosos estudios han identificado dos polimorfismos en el gen asociados con los DTN: el C677T y el A1298C (1,2,20,23,30,32,75). Otros estudios más recientes, consideran que estos genotipos pueden estar relacionados con estados aumentados en la metilación del ADN (76).

2.9.2.2.3.1. Polimorfismo C677T

El alelo C677T es el resultado de un cambio puntual con la consiguiente sustitución de Citosina por Timina. El cambio de nucleótidos ocasiona la sustitución del aminoácido Alanina por Valina en la posición 222 (A222V). La



variante termolábil (677T) de la MTHFR es conocida como el principal factor de riesgo para los DTN en algunas poblaciones, ya que reduce la actividad de la enzima y es asociada con niveles bajos de folato y de homocisteína elevados en plasma (7,16,23,28,32,33,65,66,77,78). En este caso la enzima se vuelve termolábil, causando una pérdida de su actividad con el incremento de la temperatura y esta modificación hace que pierda su cofactor FAD más rápidamente, teniendo una menor estabilidad y reduciendo a su vez, la capacidad de usar el folato para convertir la homocisteína a metionina y a S-adenosilmetionina necesaria para el mantenimiento de metilación de citosina en DNA y el control de la expresión génica (24,26,56,66,74,78). En individuos homocigotos con el genotipo TT, se observa una actividad enzimática del 30% relacionada con la pérdida de la función relacionada con la termolabilidad de la enzima, mientras que en individuos heterocigotos CT se observa un 60% en la actividad enzimática comparado con la actividad en los individuos W/T (37). Adicionalmente, los individuos con dos alelos mutados muestran una distribución alterada de folatos en los eritrocitos, con acumulación de poliglutamatos y derivados metilados (36).

La reacción metabólica de la MTHFR es una etapa indispensable en la biosíntesis del DNA y por ende para la división celular, en la síntesis de la S-adenosil metionina (SAM), en la remetilación de la homocisteína en metionina, en la metilación del DNA, de las proteínas, neurotransmisores y fosfolípidos (17).

2.9.2.2.3.2. Polimorfismo A1298C

El polimorfismo A1298C, que resulta en la sustitución de un residuo de Glutamato por otro de Alanina (E429A). La relación entre un segundo polimorfismo de la MTHFR (A1298C) y el riesgo de desarrollar defectos del tubo neural no ha sido comprobada en algunas poblaciones (23,30,48,79), pero está siendo objeto de algunos estudios en otras (13). Por otra parte, se ha observado un efecto en la combinación de los polimorfismos (C677T) y (A129C) y el riesgo de desarrollar



DTN, con una aparente relación con la disminución de la actividad de la enzima MTHFR (23,48,95), especialmente en casos de heterocigosidad doble (677CT/1298AC) (13,30,80). El polimorfismo C677T está ubicado en el exón 4 en el dominio catalítico N-terminal, mientras que el polimorfismo A1298C en el exón 7 en el dominio regulador C-terminal de la enzima MTHFR, el efecto tan dramático en la actividad de la enzima con el primer polimorfismo puede ser a consecuencia de su localización en la región catalítica (23,33). El segundo polimorfismo puede afectar la regulación de la enzima, posiblemente por la S-adenosilmetionina, inhibidor alosterico de la MTHFR, el cual es conocido por unirse a la región C-terminal de la enzima (56). A diferencia del polimorfismo C677T, la presencia de la mutación A1298C en homo o heterocigotos no se asocia con niveles superiores de tHcy ni tampoco con niveles inferiores de folatos en sangre. Al contrario, se ha encontrado que la heterocigosidad combinada para ambos alelos, se asocia con una actividad enzimática del 50%-60% de los controles, aumento de tHcy y disminución de los niveles de folatos (81). Sin embargo, estas repercusiones sobre la concentración del folato, tiende a desaparecer con la fortificación de los alimentos, lo que posiblemente se traduzca en la minimización de la influencia ambiental sobre el genotipo (28,82).

2.9.2.3. Genes involucrados en el metabolismo de la homocisteína

Se han realizado investigaciones para conocer la relación de los DTN con la Hcy y el folato y se ha observado que las madres con hijos afectados con DTN presentan niveles plasmáticos elevados de homocisteína, así como concentraciones sanguíneas de folato disminuidas (2,31,36,49). En este sentido, al analizar las posibles alteraciones genéticas y funcionales de las enzimas implicadas en el metabolismo de la homocisteína, se encuentran alteraciones genéticas asociadas a una actividad enzimática que la señalan como un factor de riesgo para el desarrollo de DTN (2,3).



2.9.2.3.1. Gen de la Betaína-Homocisteína metiltransferasa (BHMT)

Es enzima citósolica dependiente de zinc que cataliza la conversión de la betaína y homocisteína en dimetilglicina y metionina respectivamente. La BHMT (602888), tiene sus funciones principales en el hígado; el gen está ubicado en la región cromosomal 5q13.1-5q15 y consiste en seis exones que codifican 406 aminoácidos (38).

La BHMT se ha encontrado asociada con el riesgo de desarrollar DTN en algunas poblaciones, particularmente cuando las madres han recibido suplementación preconcepcional con folato. En los adultos, la BHTM tiene funciones predominantemente en el hígado y riñón, siendo la responsable del 50% de la metilación en las células del hígado adulto (59,83) y una de las enzimas involucradas en la regulación de los niveles de la homocisteína (84). A pesar de que la enzima se conoce desde hace 40 años, los estudios realizados sobre su función son relativamente recientes, se afirma que puede tener relación en el ciclo metilo que brinda unidades críticas de 1 -carbono en las reacciones de metilación esenciales para la adecuada expresión de los genes y en la transmisión materno y paterno de DNA metilado. Los genes de los factores de crecimiento son comúnmente transmitidos de esta manera y la nutrición puede alterar estos patrones de metilación, por lo que se ha planteado la hipótesis que la metilación incorrecta del DNA en el embrión debida a concentraciones anormales de folato ó la incorrecta expresión de los genes del ciclo puede producir un inapropiado silenciamiento de los factores de crecimiento necesarios para el cierre adecuado del tubo neural (32,59,84). Existen pocas investigaciones enfocadas en la BHMT, pero el polimorfismo más estudiado es el G742A correspondiente a una sustitución R239Q en la proteína, se cree que puede generar la disminución de la actividad de la enzima en presencia de los DTN, algunos estudios no han logrado encontrar asociación de la presencia del polimorfismo con la etiología de los DTN (83) y otros plantean un posible factor protector de este marcador genético (85).



2.9.2.3.2. Gen de la Metionina Sintasa (*MTR*)

La MTR (OMIM 156570) o N5 – metil THF-Hcy –S-metiltransferasa, es una enzima citósolica que cataliza la remetilación de la Hcy a metionina. La actividad de la metionina sintasa depende de la función de la metionina sintasa reductasa, la cual es la encargada de cambiar la MS a su forma activa. El polimorfismo más común del gen de la MTR es una sustitución de A2756G, lo cual produce un cambio de Ácido Aspártico por Glicina (D919G) (2,30). El Ácido Aspártico está localizado en la α Hélix, entre la región de unión a Cobalamina y la región reguladora, región responsable de la unión de proteínas, por tanto cualquier perturbación en la estructura terciaria de la proteína se ve reflejada en su función. Numerosos estudios han estudiado la asociación del polimorfismo A2756G y los DTN, donde la presencia del alelo G ha demostrado asociación con el riesgo en la madre de tener un hijo afectado e incrementa el riesgo de presentar DTN en el niño (2).

2.9.2.3.3. Gen de la Metionina Sintasa Reductasa (*MTRR*)

La MTRR (OMIM 602568) es la responsable de la regulación de la MS por la reducción de la metilación, el gen está ubicado en el brazo corto del cromosoma 5, en la posición 15.31. Cualquier defecto en la actividad catalítica puede generar niveles altos de homocisteína y llevar a un riesgo de DTN (38,44). El polimorfismo más común en el gen de la MTRR, es la sustitución A66G, que conlleva a un cambio de una Isoleucina por una Metionina en el amino ácido 22 (I22M) (39,86). Y aunque este polimorfismo no cambia la actividad enzimática, se ha encontrado que la frecuencia de este genotipo A66G es mayor en poblaciones afectadas con DTN y sus madres (5,38,82). El efecto genético materno puede contribuir al riesgo de presentar malformaciones específicas en su descendencia, encontrándose asociación de los genotipos maternos para la MTRR con los DTN en algunos estudios de casos y controles realizados con poblaciones afectada con espina bífida (82).



2.9.2.3.4. Gen de la Cistationina β Sintasa (CBS)

La CBS (OMIM 613381) es una proteína citoplasmática que cataliza la síntesis de la Cistationina a partir de homocisteína y Serina, por lo que el bloqueo en este proceso, puede dar lugar al incremento de los niveles de homocisteína celular (38,64,88). El gen se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 21, en la posición 22.3 y la mayoría de las mutaciones estudiadas se correlacionan con homocistinuria y tiene un carácter *missense* que disminuye la actividad catalítica de la enzima. Las alteraciones metabólicas hereditarias relacionadas con el déficit de CBS, son la causa más frecuente de homocistinuria en humanos. Se había encontrado que la CBS solo se expresaba en hígado y en riñón, pero recientemente se encontró que también se expresa durante la embriogénesis temprana, lo que sugiere que la enzima juega un papel importante en el desarrollo embrionario. Otros autores plantean que la variante 844ins68 se encuentra asociada a una mayor actividad enzimática de la enzima (89).

2.9.2.3.5. Gen de la Serina Hidroximetiltransferasa (SHMT)

La SHMT (OMIM 182144), cataliza la interconversión entre serina –THF y glicina-N5, N10 – metilén–THF. Se conocen dos isoformas, la citósolica (SHMT1) y la mitocondrial (SHMT2). Los genes que codifican ambas isoenzimas se ubican en los loci 17p11.2 y 12q13 respectivamente. Se ha encontrado la mutación C1240T de la SHMT1 y la delección de cuatro pb de la SHMT2 (delTCTT 1721-1724) en la población holandesa sin poderse establecer asociación alguna entre los polimorfismos y el riesgo de padecer un DTN o de tener un hijo afectado (6).

Los DTN también están asociados a varias anomalías cromosómicas, incluyendo el Síndrome de Meckel, trisomias, aneuploidias y otras anomalías o delecciones cromosómicas (30,17,56,58,90).



| <i>Alteración Cromosómica</i> | <i>Defecto del Tubo Neural</i> |
|-------------------------------|---|
| Trisomía 21 | Espina bífida Encefalocele Anencefalia |
| Trisomía 20 | Encefalocele Anencefalia |
| Trisomía 18 | Espina bífida Encefalocele Anencefalia |
| Trisomía 16 | Espina bífida |
| Trisomía 15 | Encefalocele |
| Trisomía 14 | Espina bífida Encefalocele |
| Trisomía 13 | Espina bífida Encefalocele Anencefalia |
| Trisomía 11 | Anencefalia |
| Trisomía 9 | Espina bífida Anencefalia |
| Trisomía 8 | Espina bífida |
| Trisomía 7 | Encefalocele |
| Trisomía 5 | Encefalocele |
| Trisomía 2 | Espina bífida Iniencefalia Encefalocele |
| Triploidia | Espina bífida Encefalocele Anencefalia |
| Monosomía X | Espina bífida Encefalocele Iniencefalia |
| Tetraploidia | Espina bífida |

Tabla 4. Descripción de las principales anomalías cromosómicas numéricas asociadas con DTN.

Los DTN están a su vez asociados a varios síndromes, tales como el síndrome de Manouvrier, Acrocalloso (ACLS), DiGeorge (DGS), Meckel, Marfan, Currarino, Jarcho-leviny síndrome de Waardenburg entre otros (51). A su vez, existen otros factores de riesgo fetal y materno asociados con los DTN, entre los que se destacan la displasia esquelética, embriopatía diabética, la neurofibromatosis tipo I (56,79,91).



2.9.3. Niveles preventivos

La tasa de supervivencia de los DTN ha incrementado con el avance y las nuevas técnicas quirúrgicas, tales como la cirugía prenatal. Hoy, entendemos que aunque muchos de estos niños nacen con significantes deficiencias neurológicas, muchos tienen inteligencia normal y la capacidad de disfrutar una vida productiva. A su vez, los niños con defectos de espina bífida leves, tiene una alta probabilidad de moverse y pueden caminar solos o con asistencia de aparatos ortopédicos (8). Desde 1990 se ha evidenciado que es posible modificar la frecuencia de dicha malformación mediante la suplementación con ácido fólico durante el período preconcepcional con pocos efectos adversos y a su vez, se han incorporado políticas de fortificación de alimentos en la mayoría de los países (16). Por otra parte, los recientes avances científicos han dado lugar a un dramático aumento en las tasas de supervivencia de los pacientes con DTN y dado que la enfermedad es progresiva se han implementado métodos diagnósticos exitosos.

2.9.3.1. Diagnóstico prenatal

Inicialmente en los años 60's, los especialistas establecieron el manejo clínico de los DTN mediante terapias quirúrgicas tempranas en pro de salvar la vida de los niños afectados. En 1970 los tratamientos fueron enfocados hacia la reducción de la discapacidad y en 1980 se introdujeron estudios prenatales basados en el análisis de la alfa feto proteína en suero (MS-AFP) y el uso de la ultrasonografía para la detección prenatal de la malformación en los fetos afectados (56,57). Actualmente, la evaluación inicial del recién nacido afectado es orientada hacia la pronta identificación del grado de alteración encontrada, para proceder inmediatamente a la neurocirugía, con el objetivo de preservar la función neurológica mediante el cierre del defecto, previniendo las posibles infecciones y disminuyendo el riesgo de problemas físicos y mentales. Adicional a esto, se realiza una evaluación cardíaca, gastrointestinal y del sistema genitourinario, ya



que embriológicamente hablando estos sistemas se forman conjuntamente con el sistema neurológico malformado (8).

2.9.3.2. Diagnóstico bioquímico de los DTN

La AFP es una α -globulina que se sintetiza inicialmente en el saco vitelino, así como en el endodermo del tracto gastrointestinal y en el divertículo hepático. Posteriormente a partir de la undécima semana de amenorrea, al sufrir atresia el saco vitelino, el hígado fetal y en menor grado el tracto gastrointestinal, asumen su producción (10,22). En el suero fetal, se empieza a detectar a partir de de la sexta semana de gestación, relacionándose con el transporte de hormonas esteroideas y con afinidad preferencial por los ácidos grasos poli insaturados, que constituyen una fuente energética básica para las células en crecimiento. Al alcanzar la AFP en el suero fetal concentraciones en un umbral determinado, se produce el paso de la proteína al líquido cefalorraquídeo (LCR). A partir del segundo trimestre, el feto elimina la proteína del suero fetal a través de la orina, el meconio y la bilis y al difundirse la AFP en la circulación materna, puede ser detectada en el suero materno para ser utilizada en el diagnóstico prenatal de los DTN durante el primer trimestre. Las concentraciones de AFP en el LCR superan en más de 100 veces los valores propios del líquido amniótico, por consiguiente la pérdida de la misma a través de las lesiones abiertas del tubo neural aumenta sus niveles en el fluido amniótico (10,22).

2.9.3.3. Diagnóstico Ecográfico

Más recientemente, el reto del diagnóstico prenatal está en reducir al máximo la edad gestacional a la que se pueda detectar la malformación congénita y con base en los avances conseguidos en esta área del conocimiento, es posible disminuir las morbilidades físicas y psíquicas para la madre en caso de la interrupción temprana del embarazo. La sensibilidad de la ecografía del segundo trimestre, es más variable de lo que se desea, puesto que los índices de detección han sido



significativamente inferiores en los estudios multicéntricos y en las gestantes de bajo riesgo. La utilización de los signos ecográficos indirectos, craneales y cerebelosos, han facilitado la detección de la malformación, con una sensibilidad ecográfica mayor en las gestantes de alto riesgo (19). El análisis de la translucencia intracraneal entre la 11 y la 13 semana es usado para determinar la edad gestacional y el diagnóstico de numerosas anomalías tales como anencefalia, sin embargo en el caso de la espina bífida esta es usualmente no detectada mediante el escan (22).

2.9.3.4. Cirugía Intrauterina

Las experiencias sobre cirugía intrauterina del mielomeningocele, han facilitado la introducción de la resonancia magnética nuclear para obtener información más precisa sobre la ubicación de la lesión. De hecho, el nivel de la lesión puede ser de ayuda a la hora de decidir la mejor opción terapéutica (aborto eugenésico, cirugías fetales o postnatales). La principal ventaja de la resonancia es la obtención de imágenes de gran calidad, incluso sin sedación fetal, aunque también es una técnica susceptible de brindar resultados falsos positivos en algunos casos. De esta manera, es posible reparar *in útero* anomalías fetales con mejores perspectivas para el recién nacido que con la cirugía postnatal (8). Más sin embargo, algunos estudios han encontrado que la cirugía prenatal aumenta en algunos el riesgo de efectos secundarios en la madre (27).

2.9.3.5. Asesoría genética y manejo clínico

Se estima que el riesgo de tener un hijo afectado con estos defectos es de 0.1% a 0.2%, y el riesgo de tener un segundo o tercer hijo afectado se incrementa de un 2% a 5%, y de un 10% a 15% respectivamente (2). Dada la naturaleza multifactorial de los DTN, en un 95% de los individuos afectados no se encuentran antecedentes personales ni familiares, aunque los hijos o hermanos de estos pacientes tienen un mayor riesgo que el resto de la población de presentar dicha



afección (30,77). Incluso a las mujeres que han tenido un hijo con espina bífida se les aconseja tomar una dosis aún mayor de ácido fólico (0.4 mg) por día, ya que el riesgo de recurrencia para esta enfermedad multifactorial se incrementa 10 veces después del nacimiento del primer producto afectado, 20 veces después de la gestación de dos productos afectados y hasta 40 veces después de la gestación de 3 productos malformados (6,92). Adicional a esto, se estima que el riesgo de espina bífida podría ser especialmente elevado en las madres con genotipos homocigotos para las mutaciones de los genes que regulan el metabolismo del folato (2,40).

2.9.4. Impacto de las medidas preventivas en la frecuencia de las anomalías del tubo neural

Los cambios en la frecuencia de los DTN valoran principalmente la repercusión de la prevalencia primaria, aunque estas cifras también se hallan influidas de forma menos intensa por las estrategias de detección precoz. Por otra parte, la evolución de la prevalencia al nacimiento se ve influida de manera significativa sobre todo por la prevención secundaria. Actualmente las medidas de prevención primaria más destacadas son la ingesta de suplementos vitamínicos y la fortificación con ácido fólico, que han surgido efectos positivos de reducción en la frecuencia de la malformación en países como Estados Unidos y Canadá (22).

La primera herramienta para controlar estas patologías es la vigilancia estricta con un seguimiento epidemiológico adecuado, que nos permita tomar decisiones coherentes y sólidamente fundamentadas. La Pontificia Universidad Javeriana ha liderado desde el 2001 un proceso que iniciaron otros grupos y personas en la década de los ochenta, y ha vinculado varios hospitales de Bogotá, Manizales, Ubaté y Cali y, desde hace tres años, con el apoyo decidido de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, más de 38 hospitales donde se atienden cerca del 95% de los partos que se presentan en la capital de Colombia. Este sistema de vigilancia epidemiológica, basado en un modelo de desarrollo compartido con el Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas (ECLAMC)



(30), se ha establecido como un instrumento indispensable para el control de las malformaciones congénitas y el desarrollo de las estrategias que permitan prevenirlas (32).

La prevención tiene un impacto directo en la mortalidad infantil y en la discapacidad de la población. Entre las prácticas de prevención primaria se erigen como pilares el mejoramiento de la nutrición de las mujeres en edad fértil, con acciones tan específicas como el suplemento y la fortificación con ácido fólico de los alimentos de consumo masivo, estrategia que no tiene discusión en la literatura mundial pero que seguimos en mora de implementarla adecuadamente en nuestro país.

2.9.5. Costos de manejo de los DTN

La estimación de los costos de manejo de las enfermedades tiene como objetivo la asignación de los recursos y la evaluación de las estrategias preventivas. Las anomalías congénitas se pueden dividir según su patrón de consumo de recursos en corregibles e invalidantes. En las primeras, existen tratamientos de manejo clínico que permiten una supervivencia normal sin secuelas, por lo tanto, los costos son muy elevados durante los primeros años pero se normalizan con el paso del tiempo. Los defectos invalidantes sólo disponen de tratamientos paliativos (cirugías, rehabilitación, terapias, etc) y en consecuencia, consumen gran cantidad de recursos (22)

Con respecto al costo beneficio de la prevención de los DTN, en un estudio realizado en 1992, se estimó el costo del manejo de un paciente con espina bífida en \$300.000 dólares, un costo bastante elevado si se compara con el costo de la pastilla de ácido fólico que se debe ingerir en la cantidad diaria recomendada antes y durante el embarazo para la reducción en la ocurrencia de la enfermedad (33). Los datos encontrados en la literatura sobre la repercusión económica del mielomeningocele proceden de un estudio multicéntrico español con 1500 pacientes entre 1986 y 1988, calculándose el coste global de la hospitalización



durante los 15 años anteriores y del modelo económico de Waitzman, el cual brinda una aproximación más global, al considerar también otros costos no médicos (limitaciones laborales y disminución de la productividad), pero excluye los costos personales y sociales (22).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar la asociación de los polimorfismos de los genes que codifican para las enzimas MTHFR, CBS y MTRR con el riesgo de DTN.

3.2. Objetivos Específicos

1. Realizar un estudio de casos y controles para el análisis de los polimorfismos asociados con los DTN.
2. Estimar la frecuencia de los diferentes polimorfismos en los casos con DTN y compararlas con la frecuencia observada en los controles sanos.
3. Evaluar la asociación de los polimorfismos entre la población control y el riesgo de presentar DTN en los casos utilizados en el estudio.

4. FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

H₀= No existe asociación entre los polimorfismos genéticos y la presencia de los DTN.

H_A= Existe asociación entre los polimorfismos genéticos y la presencia de los DTN.



5. METODOLOGÍA

5.1. Población de estudio

Se realizó un estudio de casos y controles para el análisis de la asociación de los polimorfismos anteriormente mencionados con los DTN. Se utilizaron muestras del Biobanco del Laboratorio de Diagnóstico Molecular del Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana, compuesto por 19 muestras de niños afectados, 19 madres correspondiente a los productos afectados con DTN y 70 madres de niños con DTN fallecidos en edad temprana, los cuales fueron valorados clínicamente en la Fundación Mónica Uribe por Amor en la ciudad de Medellín - Colombia durante el año 2009. Adicionalmente, se recolectaron 16 muestras de casos con DTN y sus correspondientes madres, valorados clínicamente en el Hospital Universitario San Ignacio de la Pontificia Universidad Javeriana - Bogotá, mediante el desarrollo del ECLAMC (Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas) Colombia en el año 2010 y 15 nuevas muestras de niños afectados con sus correspondientes madres valorados clínicamente en la Fundación Mónica Uribe por Amor en la ciudad de Medellín - Colombia durante el año 2010; lo que nos permitió alcanzar el tamaño de muestra ideal estimado (OR: 4.5) (93), para completar el número total de niños afectados con DTN (n= 50) y sus correspondientes madres (n=50). Se incluyó un grupo control para las madres con hijos con DTN en una relación 1:2 (n=200), para lo cual, se seleccionaron mujeres que asistieron con trabajo de parto al Hospital Universitario San Ignacio (HUSI), que no presentaron complicaciones y para cada caso control (n=50), se seleccionó el niño nacido de la madre control sin antecedentes de malformaciones congénitas aparentes al nacimiento posterior a la valoración médica realizada por el médico genetista, en una relación 1:2 (n=100).

5.1.1. Criterios de selección de las muestras

5.1.1.1. Criterios de Inclusión

5.1.1.1.1. Criterios de inclusión (Madres de Casos con DTN)



1. Madres de niño(s) afectado(s) por DTN.
2. Cualquier paridad.
3. Cualquier estrato socio-económico.

5.1.1.1.2. Criterios de inclusión (Madres Controles)

1. Madres de niño(s) no afectado(s) por DTN
2. Cualquier paridad
3. Cualquier estrato socio-económico
4. Cualquier nivel de escolaridad.

5.1.1.2. Criterios de exclusión

5.1.1.2.1. Criterios de exclusión (Casos -Madres de Casos con DTN)

1. Madre o hijo afectado por síndrome polimarformativo
2. Madre expuesta a teratógenos (anticonvulsivantes, drogas, alcohol, herbicidas, inhibidores de la MTHFR).
3. Madre con síndrome metabólico: obesidad, diabetes.
4. Síndrome de mala absorción.

5.1.1.2.2. Criterios de exclusión (Controles)

1. Antecedente personal de DTN (v.g: Espina Bífida Oculta)
2. Antecedente familiar de DTN
3. Antecedente de embarazo afectado por DTN (incluidos abortos o interrupciones del embarazo por DTN)
4. Madre o hijo afectado por síndrome polimarformativo.

5.1.2. Variables

5.1.2.1. Variables independientes cualitativas

- Polimorfismo C677T del gen MTHFR.



- Polimorfismo A1298C del gen MTHFR.
- Polimorfismo 844ins68pb del gen CBS.
- Polimorfismo C699T del gen CBS.
- Polimorfismo A66G del gen MTRR.

5.2. Obtención y recolección de las muestras

Se realizó extracción de sangre total con EDTA a las madres de niños afectados con DTN y a las madres de los niños sanos utilizados como controles en el estudio. La toma de muestra de los niños sanos utilizados como controles, fue realizada a partir de la gota de sangre impregnada en papel de filtro, utilizada para el tamizaje neonatal del recién nacido. Los formatos de consentimiento informado y procedimientos éticos fueron obtenidos en todas las muestras recolectadas y utilizadas en el estudio (Anexo No 1). Para la recolección de muestras de los controles, se diligenciaron consentimientos informados específicos para la toma de muestra de sangre total de la madre en tubo con EDTA, y de papel de filtro para el hijo recién nacido sano, previa autorización del personal encargado del Departamento de Ginecoobstetricia y Laboratorio Clínico del Hospital Universitario San Ignacio (HUSI) (Anexo No 2).

5.3. Extracción de ADN a partir de muestras de sangre total con EDTA

La extracción de ADN a partir de muestras de 3 mL de sangre total con EDTA obtenida de las madres de casos y madres controles participantes en el estudio, fue realizada utilizando el *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, WI, EE.UU.). (Anexo No 3)



5.4. Extracción de ADN a partir de gotas de sangre impregnadas en papel de filtro

La extracción de ADN a partir de muestras de sangre impregnadas en papel de filtro obtenidas de los Controles participantes en el estudio, fue realizada siguiendo el protocolo referenciado (103) (Anexo No 4).

5.5. Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN obtenido se realizó mediante espectrofotometría, en el equipo *Gene Quant*, utilizando una alícuota de 5 μL de cada muestra de ADN diluida en agua estéril hasta completar un volumen final de 100 μL . La lectura fue realizada a una absorbancia de 260 nm (A260) y 280 nm (A280), con el fin de calcular la concentración de ADN obtenida en cada muestra, teniendo en cuenta la constante ADN ($\text{ng}/\mu\text{L}$) = $50 \times \text{DO}_{260}$ y su pureza con respecto a los remanentes de proteína presentes, teniendo como parámetro la relación 260/280 óptima de 1.8 - 2.0. Se realizó una dilución posterior a las muestra hasta 44 $\text{ng}/\mu\text{L}$, para su posterior amplificación y genotipificación de los polimorfismos mediante la técnica PCR– RFLPs.

5.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método enzimático de una secuencia determinada de ADN, que utiliza cebadores (*primers*), que son secuencias cortas de nucleótidos sintéticos (de 15 a 30 bases) que se hibridan de forma específica con cada una de las dos cadenas complementarias de ADN de la muestra, en las zonas en que flanquea la secuencia de interés.

Para la amplificación de los fragmentos de ADN correspondientes a los polimorfismos incluidos en el estudio (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, CBS 844ins68pb, CBS C699T y MTRR A66G), se realizó la estandarización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, utilizando herramientas



bioinformáticas para el diseño de primers adecuados y específicos para cada uno de los fragmentos en estudio (106), que se presentan en la tabla 5. La reacción de amplificación, se llevo cabo con un volumen final entre 20 y 25 μ l en cada tubo en el termociclador *C1000* de *BioRad*®, programado para 35 ciclos de desnaturalización, anillamiento y elongación, teniendo en cuenta los diferentes protocolos estandarizados para cada uno de los polimorfismos (Anexo No 5).

| Gen | SNPs | Exón | Tipo de Primer | Secuencia Primer (5'→3') | Tamaño del fragmento |
|-------|---------|------|--------------------|--|----------------------|
| MTHFR | C677T | 4 | Sense Antisense | 5'TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA3' 5'AGGACGGTGCGGTGAGAG3' | 198 |
| MTHFR | A1298C | 7 | Sense Antisense | 5'ATGTGGGGGGAGGAGCTGAC3' 5'GTCTCCCAACTTACCCTTCTCCC3' | 241 |
| CBS | C699T | 6 | Sense Antisense | 5'CAGCAACCCCTGGCTCACT3' 5'CAGCCATGCCCTGTGTTTGCTATT3' | 289 |
| CBS | Ins68pb | 8 | Sense Antisense | 5'CCGCAGGGTGGTCTGTCTGGACTG3' 5'AGCCCCACTGAGCATCCGTGTGAC3' | 805 |
| MTRR | A66G | 1 | Sense Antisense | 5'AGCAGGGACATGCAAAGGCCATCGCAGAAGACAT3' 5'CTCTAACCTTATCGGATACACTAATA3' | 105 |

Tabla 5. Descripción de las principales características de los primers utilizados en la PCR.

5.7. Visualización de productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa

Para la detección del producto amplificado se sembraron 7 μ l del producto de cada reacción de amplificación en una electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidium y visualizados mediante luz UV. Se realizo la validación de los pesos moleculares de las bandas de los fragmentos amplificados frente al patrón y se guardaron en congelación (-20°C) hasta su posterior análisis mediante RFLPs.

5.8. Digestión Enzimática de productos amplificados (RFLPs)

Los productos amplificados de ADN, se digirieron adicionando enzimas de restricción adecuadas (*Taq I*, *MbO II*, *NspI*, *RsaI*), para los polimorfismos C677T y



el A1298C de la Metilendetrahidrofolato Reductasa (MTHFR), 844ins68 y C699T de la Cistationina Beta Sintasa (CBS) y A66G de la Metionina Sintasa Reductasa (MTRR) respectivamente, teniendo en cuenta los protocolos validados en el laboratorio (Anexo No 6) . Posterior a la digestión de los fragmentos amplificados, se obtuvieron los siguientes patrones de digestión que fueron analizados de acuerdo al peso molecular en geles de poliacrilamida al 12% mediante el revelado con bromuro de etidium y la visualización con luz UV, permitiendo la correspondiente genotipificación de los individuos:

1. Mapa de restricción Fragmento Amplificado Polimorfismo C677T MTHFR

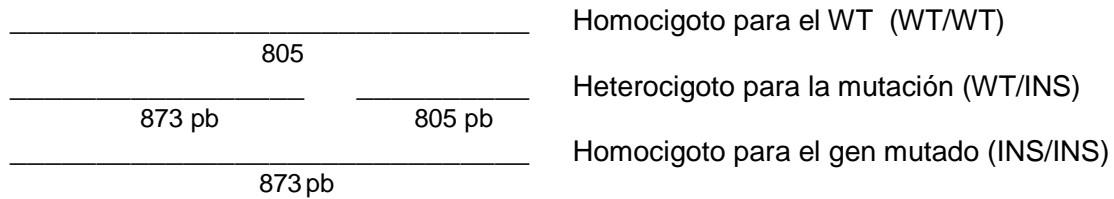
| | | | |
|-------|--------|--------|------------------------------------|
| _____ | | | Homocigoto para el WT (CC) |
| | 198 pb | | |
| _____ | | _____ | Heterocigoto para la mutación (CT) |
| | 198 pb | | |
| | | 173 pb | |
| _____ | | | Homocigoto para el gen mutado (TT) |
| | 173 pb | | |
| | | 25 pb | |

2. Mapa de restricción Fragmento Amplificado Polimorfismo A1298C MTHFR

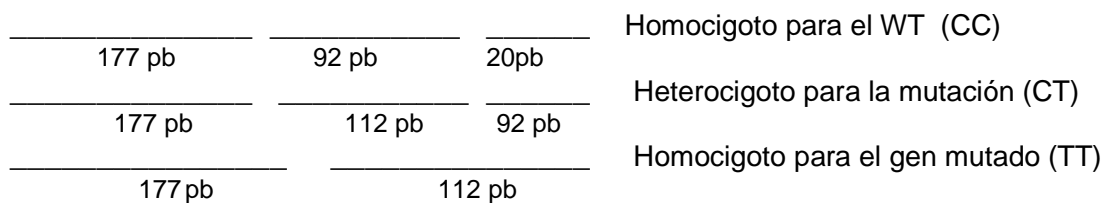
| | | | |
|-------|--------|--------|------------------------------------|
| _____ | | _____ | Homocigoto para el WT (AA) |
| | 204 pb | | |
| _____ | | _____ | Heterocigoto para la mutación (AC) |
| | 241 pb | | |
| | | 204 pb | |
| | | 37pb | |
| _____ | | | Homocigoto para el gen mutado (CC) |
| | 241 pb | | |



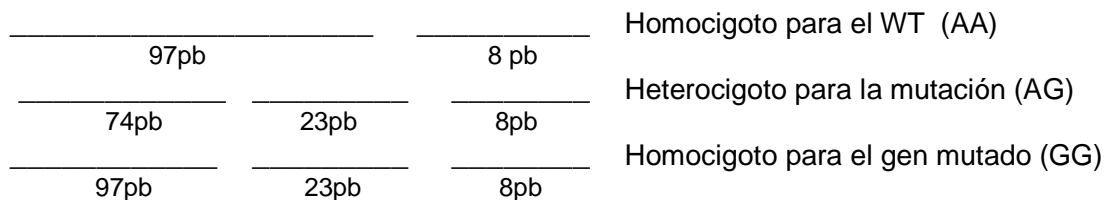
3. Mapa de restricción Fragmento Amplificado Polimorfismo 844ins68 pb CBS



4. Mapa de restricción Fragmento Amplificado Polimorfismo C699T CBS



5. Mapa de restricción Fragmento Amplificado Polimorfismo A66G MTRR



5.9. Manejo Estadístico de los datos

Se realizó el cálculo de las frecuencias fenotípicas y alélicas en la población mediante conteo directo. Las diferencias entre las frecuencias alélicas y genotípicas fueron evaluadas mediante análisis de χ^2 y verificadas con el programa Genepop versión 4.0.1.0 (109); la determinación de la asociación se evaluó calculando el OR (IC 95%) mediante el uso del programa estadístico Epidat versión 3.1.



6. RESULTADOS

6.1. Descripción de la población

En el estudio de casos y controles fueron incluidos un total de 50 casos con sus respectivas madres y adicionalmente 70 madres de niños con DTN sin CASOS. 34 Individuos de los casos fueron recolectados de la *Fundación Mónica Uribe por Amor* de la ciudad de Medellín – Colombia y los 16 restantes fueron recolectados en el *Hospital Universitario San Ignacio* de la Pontificia Universidad Javeriana, con el apoyo del proyecto de Vigilancia de Malformaciones Congénitas liderado por el Instituto de Genética de la Universidad y el grupo de residentes de la Especialización en Genética Médica. En el grupo control se incluyeron 100 niños sanos con sus respectivas madres, para un total de 200 muestras, que fueron tomadas posteriores al trabajo de parto atendido en *Hospital Universitario San Ignacio* de la Pontificia Universidad Javeriana y a la valoración médica.

No es posible realizar un análisis más descriptivo de la población en estudio por cuanto no se cuenta con la información correspondiente a la edad materna, estrato socioeconómico ó tipo de malformación para todos los casos, especialmente para las muestras correspondientes al banco de ADN proveniente de la Fundación Mónica Uribe por Amor, porque los formatos de consentimiento informado no incluyen la información demográfica de los pacientes.

6.2. Distribución Alélica y Genotípica de la población

A continuación se muestran los patrones de digestión obtenidos para cada uno de los polimorfismos en estudio, que permitieron realizar la genotipificación de la población.

6.2.1. Resultados de los RFLPs

6.2.1.1. MTHFR C677T

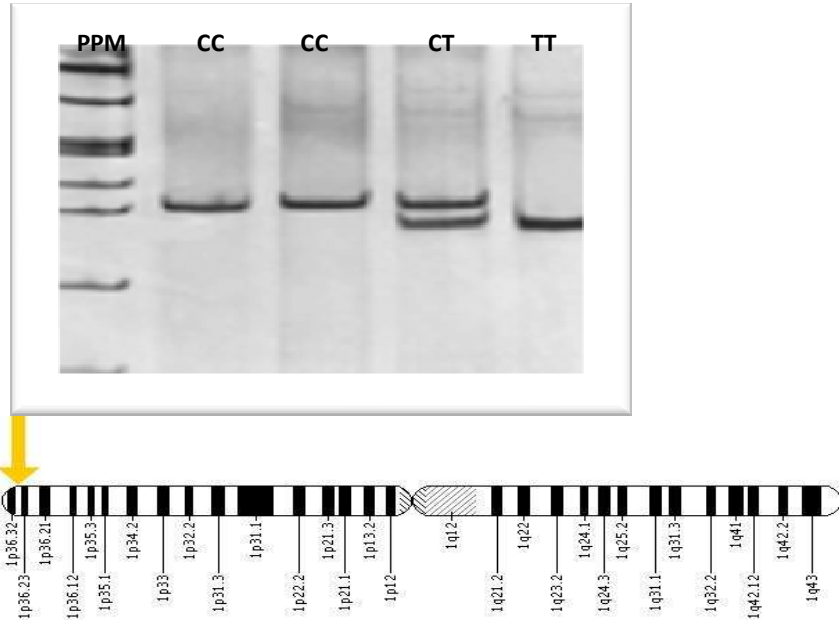


Figura 14. Distribución genotípica del polimorfismo MTHFR C677T. Fotografía del gel de poliacrilamida al 12%, patrón de digestión del producto amplificado con la enzima *TaqI*. 1: Marcador de Peso Molecular. 2,3: Homocigoto para el gen *wt*. 4: Heterocigoto. 5: Homocigoto para el gen mutado.

6.2.1.2. MTHFR A1298C

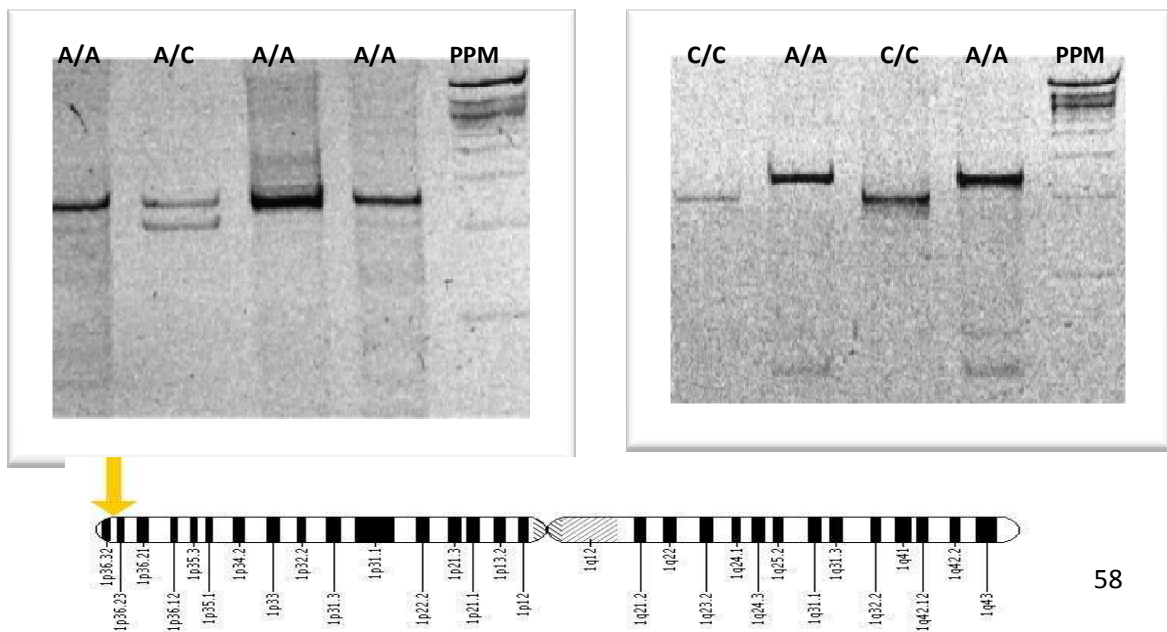


Figura 15. Distribución genotípica del polimorfismo MTHFR A1298C. Fotografía del gel de poliacrilamida al 12%, patrón de digestión del producto amplificado con la enzima *MboII*. Izquierda – 1,3,4: Homocigoto para el gen wt. 2: Heterocigoto. 5: Marcador de Peso Molecular. Derecha – 1,3: Homocigoto para el gen mutado. 2,4: Homocigoto para el gen wt.

6.2.1.3. CBS 844ins68

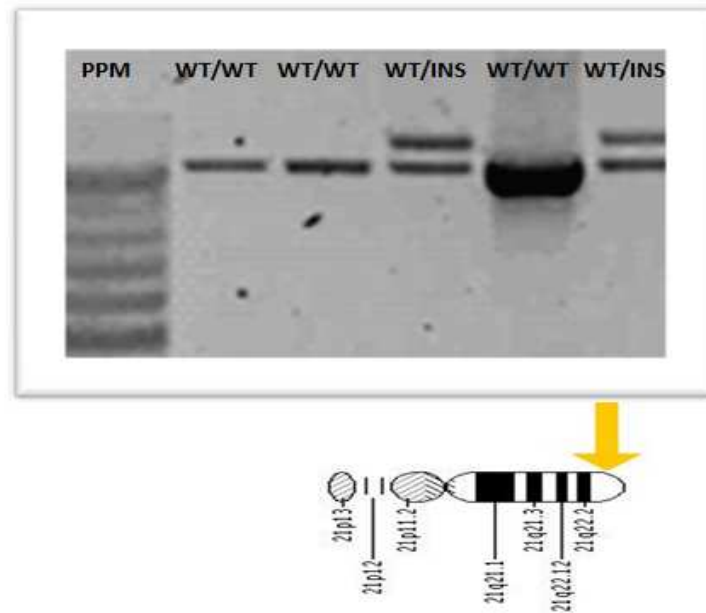


Figura 16. Distribución genotípica del polimorfismo CBS 844ins68. Fotografía del gel de agarosa al 2%, patrón de amplificación. - 1: Marcador de Peso Molecular. 2,3,5: Homocigoto para el gen normal. 4,6: Heterocigoto.

6.2.1.4. CBS C699T

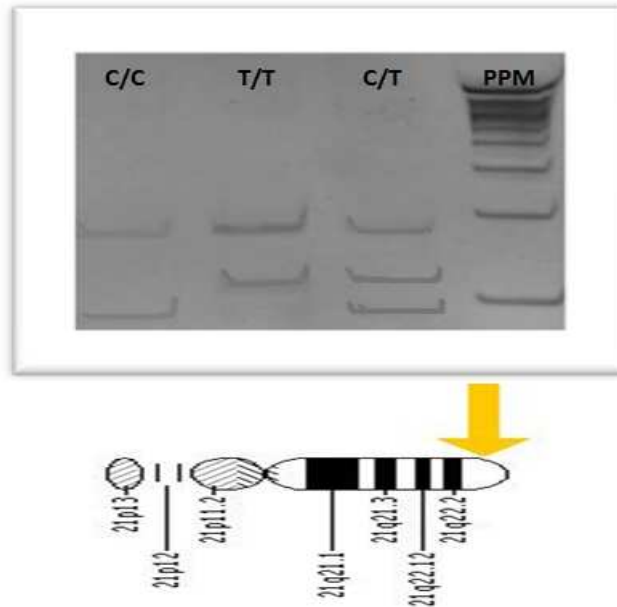


Figura 17. Distribución genotípica del polimorfismo CBS C699T. Fotografía del gel de poliácridamida 12%, patrón de digestión del producto amplificado con la enzima *RsaI*. – 1,3: Homocigoto para el gen wt. 2: Heterocigoto. 4: Marcador de Peso Molecular.

6.2.1.5. MTRR A66G

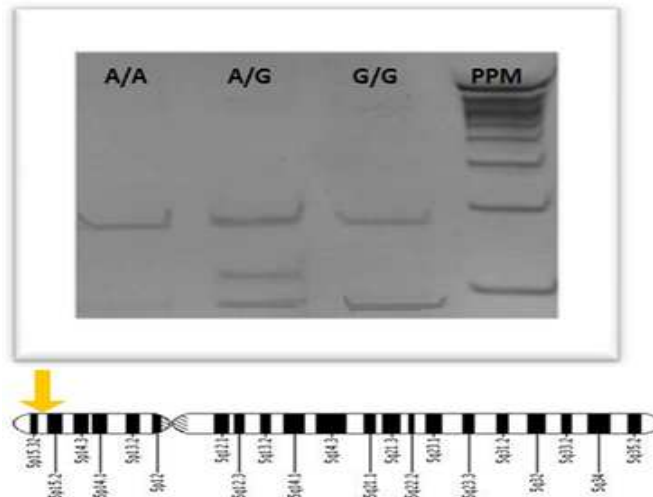


Figura 18. Distribución genotípica del polimorfismo MTRR A66G Fotografía del gel de poliácridamida 12%, patrón de digestión del producto amplificado con la enzima *NspI*. – 1,3,4,7: Heterocigoto. 2: Homocigoto para el gen mutado. 5: Marcador de Peso Molecular. 6: Homocigoto para el gen wt.



6.2.2. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas

A continuación se presentan las frecuencias alélicas y genotípicas para cada uno de los polimorfismos analizados para los grupos de estudio.

6.2.2.1. MTHFR C677T

En la mayoría de los grupos de estudio, se observan frecuencias mayores para el alelo normal. Las frecuencias observadas son 50% para los casos, 63% para sus madres y 73% para las madres de casos no incluidos en el estudio. Las frecuencias alélicas (alelo C) observadas en los controles son 67% para los casos y 73% para sus respectivas madres. Para el alelo mutado (alelo T) se observa la misma frecuencia que para el alelo C en los casos con un 50% y frecuencias menores de 37% para las madres de los casos, 27% para las madres de casos no incluido en el estudio, 34% para los controles casos y 27% para sus madres. Las frecuencias observadas para el genotipo 677CC fueron 6/50 (12%) en los casos, 18/50 (36%) en las madres de los casos, 36/70 (51%) en las madres de casos no incluidos en el estudio, 24/100 (24%) y 48/100 (48%) en los casos y sus madres respectivamente. Para el genotipo mutado 677TT las frecuencias observadas fueron 6/50 (12%) en los casos, 5/50 (10%) en las madres de los casos, 4/70 (6%) en las madres de casos no incluidos en el estudio, 9/100 (9%) y 2/100 (2%) en los casos y sus madres respectivamente. En el grupo de casos DNT se observa una mayor frecuencia de heterocigosidad (76%), en todos los grupos de estudio, exceptuado en las madres de casos con casos no incluidos en el estudio (43%) se observa una mayor frecuencia del genotipo heterocigoto.



C677T MTHFR DISTRIBUCIÓN DE ALELOS

| ALELOS | CASOS DTN | | | CONTROLES | | |
|--------|-----------|------------------|---------------------|-----------|------------------|-------|
| | DIADAS | | | DIADAS | | |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | Madres de Casos DTN | Controles | Madres Controles | TOTAL |
| C | 50 | 63 | 102 | 133 | 146 | 494 |
| T | 50 | 37 | 38 | 67 | 54 | 246 |
| TOTAL | 100 | 100 | 140 | 200 | 200 | 740 |

Tabla 6. Distribución de alelos polimorfismo C677T MTHFR en los grupos de estudio.

FRECUENCIAS ALÉLICAS

| ALELOS | CASOS DTN | | | CONTROLES | |
|--------|-----------|------------------|---------------------|-----------|------------------|
| | DIADAS | | | DIADAS | |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | Madres de Casos DTN | Controles | Madres Controles |
| C | 0,50 | 0,63 | 0,73 | 0,67 | 0,73 |
| T | 0,50 | 0,37 | 0,27 | 0,33 | 0,27 |
| TOTAL | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Tabla 7. Distribución de frecuencias alélicas C677T MTHFR en los grupos de estudio.

C677T MTHFR DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS

| GENOTIPOS | CASOS DTN | | | CONTROLES | | |
|-----------|-----------|------------------|---------------------|-----------|------------------|-------|
| | DIADAS | | | DIADAS | | |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | Madres de Casos DTN | Controles | Madres Controles | TOTAL |
| CC | 6 | 18 | 36 | 24 | 48 | 132 |
| CT | 38 | 27 | 30 | 67 | 50 | 212 |
| TT | 6 | 5 | 4 | 9 | 2 | 26 |
| TOTAL | 50 | 50 | 70 | 100 | 100 | 370 |

Tabla 8. Distribución de genotipos polimorfismo C677T MTHFR en los grupos de estudio.



FRECUENCIAS GENOTÍPICAS

| GENOTIPOS | CASOS DTN | | | CONTROLES | |
|-----------|-----------|------------------|------------------|-----------|------------------|
| | DIADAS | | | DIADAS | |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | Madres Casos DTN | Controles | Madres Controles |
| CC | 0,12 | 0,36 | 0,51 | 0,24 | 0,48 |
| CT | 0,76 | 0,54 | 0,43 | 0,67 | 0,50 |
| TT | 0,12 | 0,10 | 0,06 | 0,09 | 0,02 |
| TOTAL | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Tabla 9. Distribución de frecuencias genotípicas C677T MTHFR en los grupos de estudio.

6.2.2.2. MTHFR A1298C

En todos los grupos de estudio, se observan frecuencias mayores para el alelo normal (alelo A), con frecuencias de 63% para los casos, 73% para sus madres y 56% para las madres de casos no incluidos en el estudio; las frecuencias alélicas de los controles son 70% para los casos y 72% para sus respectivas madres. Para el alelo mutado (alelo C) se observan frecuencias menores en los casos con un 37%, 27% para las madres de los casos, 44% en las madres de casos no incluido en el estudio, 30% para los controles casos y 29% para las madres de los controles. Las frecuencias observadas para el genotipo 1298AA fueron 16/50 (32%) en los casos, 24/50 (48%) en las madres de los casos, 12/70 (17%) en las madres de casos no incluidos en el estudio, 40/100 (40%) y 45/100 (48%) en los controles y sus madres respectivamente. Para el genotipo mutado 1298CC las frecuencias observadas fueron 3/50 (6%) en los casos, 1/50 (2%) en las madres de los casos, 4/70 (6%) en las madres de casos no incluidos en el estudio, 2/100 (2%) y 2/100 (2%) para el grupo control. En todos los grupos de estudio, se observa una mayor frecuencia del genotipo heterocigoto.



A1298C MTHFR DISTRIBUCIÓN DE ALELOS

| ALELOS | CASOS DTN | | | CONTROLES | | |
|--------------|-----------|------------------|---------------------|-----------|------------------|-------|
| | DIADAS | | | DIADAS | | |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | Madres de Casos DTN | Controles | Madres Controles | TOTAL |
| A | 63 | 73 | 78 | 140 | 143 | 497 |
| C | 37 | 27 | 62 | 60 | 57 | 243 |
| TOTAL | 100 | 100 | 140 | 200 | 200 | 740 |

Tabla 10. Distribución de alelos polimorfismo A1298C MTHFR en los grupos de estudio.

FRECUENCIAS ALELICAS

| ALELOS | CASOS DTN | | | CONTROLES | |
|--------------|-----------|------------------|---------------------|-----------|------------------|
| | DIADAS | | | DIADAS | |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | Madres de Casos DTN | Controles | Madres Controles |
| A | 0,63 | 0,73 | 0,56 | 0,70 | 0,72 |
| C | 0,37 | 0,27 | 0,44 | 0,30 | 0,29 |
| TOTAL | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Tabla 11. Distribución de frecuencias alélicas A1298C MTHFR en los grupos de estudio.

A1298C MTHFR DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS

| GENOTIPOS | CASOS DTN | | | CONTROLES | | |
|--------------|-----------|------------------|---------------------|-----------|------------------|-------|
| | DIADAS | | | DIADAS | | |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | Madres de Casos DTN | Controles | Madres Controles | TOTAL |
| AA | 16 | 24 | 12 | 40 | 45 | 137 |
| AC | 31 | 25 | 54 | 58 | 53 | 221 |
| CC | 3 | 1 | 4 | 2 | 2 | 12 |
| TOTAL | 50 | 50 | 70 | 100 | 100 | 370 |

Tabla 12. Distribución de genotipos polimorfismo A1298C MTHFR en los grupos de estudio.



| FRECUENCIAS GENOTÍPICAS | | | | | |
|-------------------------|-----------|------------------|---------------------|-----------|------------------|
| CASOS DTN | | | CONTROLES | | |
| GENOTIPOS | DIADAS | | DIADAS | | Madres Controles |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | Madres de Casos DTN | Controles | |
| AA | 0,32 | 0,48 | 0,17 | 0,40 | 0,45 |
| AC | 0,62 | 0,50 | 0,77 | 0,58 | 0,53 |
| CC | 0,06 | 0,02 | 0,06 | 0,02 | 0,02 |
| TOTAL | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Tabla 13. Distribución de frecuencias genotípicas A1298C MTHFR en los grupos de estudio.

6.2.2.3. CBS 844ins68

En todos los grupos de estudio, se observan frecuencias mayores para el alelo normal (WT), con frecuencias de 92% para los casos, 97% para sus madres, 94% para las madres de casos no incluidos en el estudio y 93% para las madres controles. Para el grupo de controles no fue posible la determinación alélica ni genotípica, al obtenerse bajas concentraciones de ADN a partir de la extracción de papel de filtro, por tanto, no se obtienen datos de las frecuencias observadas para este grupo de estudio. Para el alelo mutado (INS) se observan frecuencias menores de 8% en los casos, 3% en las madres de los casos, 6% en las madres de casos no incluido en el estudio y 7% en las madres de los controles. Las frecuencias observadas para el genotipo normal WT/WT fueron 20/50 (83%) en los casos, 47/50 (94%) en las madres de los casos, 61/70 (87%) en las madres de casos no incluidos en el estudio y 106/122 (87%) en las madres de controles. Para el genotipo heterocigoto WT/INS las frecuencias observadas fueron 4/50 (17%) en los casos, 3/50 (6%) en las madres de los casos, 9/70 (13%) en las madres de casos no incluidos en el estudio y 16/122 (13%) en las madres de controles.



No se observó presencia de homocigotos para el polimorfismo en la población.

844INS68 CBS DISTRIBUCIÓN DE ALELOS

| ALELOS | CASOS DTN | | | CONTROLES | | |
|--------------|-----------|------------------|---------------------|-----------|------------------|------------|
| | DIADAS | | | DIADAS | | |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | Madres de Casos DTN | Controles | Madres Controles | TOTAL |
| WT | 44 | 97 | 131 | - | 228 | 500 |
| INS | 4 | 3 | 9 | - | 16 | 32 |
| TOTAL | 48 | 100 | 140 | 0 | 244 | 532 |

Tabla 14. Distribución de alelos polimorfismo 844ins68 CBS en los grupos de estudio. (*No se obtienen datos para el grupo de controles).

FRECUENCIAS ALELICAS

| ALELOS | CASOS DTN | | | CONTROLES | |
|--------------|-----------|------------------|---------------------|-----------|------------------|
| | DIADAS | | | DIADAS | |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | Madres de Casos DTN | Controles | Madres Controles |
| WT | 0,92 | 0,97 | 0,94 | - | 0,93 |
| INS | 0,08 | 0,03 | 0,06 | - | 0,07 |
| TOTAL | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |

Tabla 15. Distribución de frecuencias alélicas 844ins68 CBS en los grupos de estudio..

844INS68 CBS DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS

| GENOTIPOS | CASOS DTN | | | CONTROLES | | |
|--------------|-----------|------------------|---------------------|-----------|------------------|------------|
| | DIADAS | | | DIADAS | | |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | Madres de Casos DTN | Controles | Madres Controles | TOTAL |
| WT/WT | 20 | 47 | 61 | - | 106 | 234 |
| WT/INS | 4 | 3 | 9 | - | 16 | 32 |
| INS/INS | 0 | 0 | 0 | - | 0 | 0 |
| TOTAL | 24 | 50 | 70 | 0 | 122 | 266 |

Tabla 16. Distribución de genotipos polimorfismo 844ins68 CBS en los grupos de estudio



FRECUENCIAS GENOTÍPICAS

| | CASOS DTN | | | CONTROLES | |
|---------|-----------|------------------|---------------------|-----------|------------------|
| | DIADAS | | | DIADAS | |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | Madres de Casos DTN | Controles | Madres Controles |
| WT/WT | 0,83 | 0,94 | 0,87 | - | 0,87 |
| WT/INS | 0,17 | 0,06 | 0,13 | - | 0,13 |
| INS/INS | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 0,00 |
| TOTAL | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |

Tabla 17. Distribución de frecuencias genotípicas 844ins68 CBS en los grupos de estudio.

6.2.2.4. CBS C699T

En todos los grupos de estudio, se observan frecuencias significativamente mayores para el alelo normal (alelo C), de 79% para los casos, 81% para sus madres, 80% para las madres de casos no incluidos en el estudio y de 75% para los casos y 80% para sus respectivas madres. Para el alelo mutado (alelo T) se observan frecuencias menores de 21% para los casos, 19% para las madres de los casos, 20% para las madres de casos no incluido en el estudio, 25% para los controles casos y 20% para las madres de los controles. Las frecuencias observadas para el genotipo 699C (alelo C) fueron 30/50 (60%) en los casos, 32/50 (64%) en las madres de los casos, 43/70 (61%) en las madres de casos no incluidos en el estudio, 52/100 (55%) y 63/100 (63%) en los casos y sus madres respectivamente. Para el genotipo mutado 699T (alelo T) las frecuencias observadas fueron 1/50 (2%) en los casos, 1/50 (2%) en las madres de los casos, 1/70 (2%) en las madres de casos no incluidos en el estudio, 5/100 (5%) y 2/100 (2%) en los casos y sus madres respectivamente. En todos los grupos de estudio, se observan frecuencias mayores del genotipo homocigoto para el gen normal que las presentadas para los heterocigotos.



C699T CBS DISTRIBUCIÓN DE ALELOS

| ALELO | CASOS DTN | | | CONTROLES | | |
|--------------|-----------|------------------|---------------------|-----------|------------------|-------|
| | DIADAS | | Madres de Casos DTN | DIADAS | | TOTAL |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | | Controles | Madres Controles | |
| C | 79 | 81 | 112 | 141 | 161 | 574 |
| T | 21 | 19 | 28 | 47 | 39 | 154 |
| TOTAL | 100 | 100 | 140 | 188 | 200 | 728 |

Tabla 18. Distribución de alelos polimorfismo C699T CBS en los grupos de estudio.

FRECUENCIAS ALELICAS

| | CASOS DTN | | | CONTROLES | |
|--------------|-----------|------------------|---------------------|-----------|------------------|
| | DIADAS | | Madres de Casos DTN | DIADAS | |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | | Controles | Madres Controles |
| C | 0,79 | 0,81 | 0,80 | 0,75 | 0,81 |
| T | 0,21 | 0,19 | 0,20 | 0,25 | 0,20 |
| TOTAL | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Tabla 19. Distribución de frecuencias alélicas C699T CBS.

C699T CBS DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS

| GENOTIPOS | CASOS DTN | | | CONTROLES | | |
|--------------|-----------|------------------|------------------|-----------|------------------|-------|
| | DIADAS | | Madres Casos DTN | DIADAS | | TOTAL |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | | Controles | Madres Controles | |
| CC | 30 | 32 | 43 | 52 | 63 | 220 |
| CT | 19 | 17 | 26 | 37 | 35 | 134 |
| TT | 1 | 1 | 1 | 5 | 2 | 10 |
| TOTAL | 50 | 50 | 70 | 94 | 100 | 364 |

Tabla 20. Distribución de frecuencias alélicas C699T CBS en los grupos de estudio.



FRECUENCIAS GENOTÍPICAS

| | CASOS DTN | | | CONTROLES | |
|-------|-----------|------------------|------------------|-----------|------------------|
| | DIADAS | | Madres Casos DTN | DIADAS | |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | | Controles | Madres Controles |
| CC | 0,60 | 0,64 | 0,61 | 0,55 | 0,63 |
| CT | 0,38 | 0,34 | 0,37 | 0,39 | 0,35 |
| TT | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,05 | 0,02 |
| TOTAL | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Tabla 21. Distribución de frecuencias genotípicas C699T CBS en los grupos de estudio.

6.2.2.5. MTRR A66G

En todos los grupos de estudio, se observa la presencia del alelo normal (alelo A) con una mayor frecuencia. Las frecuencias del alelo normal observadas son 80% para los casos, 66% para sus madres, 76% para las madres de casos no incluidos en el estudio, los datos obtenidos para los controles fueron 72% para los casos y 80% para sus madres. Para el alelo mutado (alelo G) se observan frecuencias menores de 20% para los casos, 34% para las madres de los casos, 24% para las madres de casos no incluido en el estudio, 28% para los controles casos y 20% para sus madres. Las frecuencias observadas para el genotipo 66AA (alelo A) fueron 31/50 (62%) en los casos, 18/50 (36%) en las madres de los casos, 37/70 (53%) en las madres de casos no incluidos en el estudio, 30/100 (50%) y 61/100 (61%) en los casos y sus madres respectivamente. Para el genotipo mutado 66GG (alelo G) las frecuencias observadas fueron 1/50 (2%) en los casos, 2/50 (4%) en las madres de los casos, 1/70 (1%) en las madres de casos no incluidos en el estudio, 4/100 (7%) y 1/100 (1%) en los casos y sus madres respectivamente. Similar a lo observado en el análisis genotípico del polimorfismo C699T, se observan frecuencias mayores del genotipo homocigoto para el gen normal que las presentadas para los heterocigotos para la variante en todos los grupos de estudio.



A66G MTRR DISTRIBUCIÓN DE ALELOS

| ALELOS | CASOS DTN | | | CONTROLES | | |
|--------------|------------|------------------|------------------|------------|------------------|------------|
| | DIADAS | | Madres Casos DTN | DIADAS | | TOTAL |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | | Controles | Madres Controles | |
| A | 80 | 66 | 106 | 86 | 160 | 498 |
| G | 20 | 34 | 34 | 34 | 40 | 162 |
| TOTAL | 100 | 100 | 140 | 120 | 200 | 660 |

Tabla 22. Distribución de alelos polimorfismo A66G MTRR en los grupos de estudio.

FRECUENCIAS ALELICAS

| ALELOS | CASOS DTN | | | CONTROLES | |
|--------------|-----------|------------------|------------------|-----------|------------------|
| | DIADAS | | Madres Casos DTN | DIADAS | |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | | Controles | Madres Controles |
| A | 0,80 | 0,66 | 0,76 | 0,72 | 0,80 |
| G | 0,20 | 0,34 | 0,24 | 0,28 | 0,20 |
| TOTAL | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Tabla 23. Distribución de frecuencias alélicas A66G MTRR en los grupos de estudio.

A66G MTRR FRECUENCIA DE GENOTIPOS

| GENOTIPOS | CASOS DTN | | | CONTROLES | | |
|--------------|-----------|------------------|------------------|-----------|------------------|------------|
| | DIADAS | | Madres Casos DTN | DIADAS | | TOTAL |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | | Controles | Madres Controles | |
| AA | 31 | 18 | 37 | 30 | 61 | 177 |
| AG | 18 | 30 | 32 | 26 | 38 | 144 |
| GG | 1 | 2 | 1 | 4 | 1 | 9 |
| TOTAL | 50 | 50 | 70 | 60 | 100 | 330 |

Tabla 24. Distribución de genotipos polimorfismo A66G MTRR en los grupos de estudio.



FRECUENCIAS GENOTÍPICAS

| ALELOS | CASOS DTN | | | CONTROLES | |
|--------|-----------|------------------|------------------|-----------|------------------|
| | DIADAS | | Madres Casos DTN | DIADAS | |
| | CASOS DTN | Madres Casos DTN | | Controles | Madres Controles |
| AA | 0,62 | 0,36 | 0,53 | 0,50 | 0,61 |
| AG | 0,36 | 0,60 | 0,46 | 0,43 | 0,38 |
| GG | 0,02 | 0,04 | 0,01 | 0,07 | 0,01 |
| TOTAL | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Tabla 25. Distribución de frecuencias genotípicas A66G MTRR en los grupos de estudio.

Los resultados obtenidos en la población en estudio, evidencian que para algunos polimorfismos MTHFR C677T Y A1298C, la población control no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. Para el polimorfismo C677T se evidencian el desequilibrio con datos χ^2 $p=0.001$ para las madres y $0,02$ para los controles. Por otra parte, para el polimorfismo A1298C en las madres y los controles se obtuvieron datos de $p=0.001$ y $p= 0,01$ respectivamente. Los polimorfismos restantes si se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg.



Tabla 26. Distribución alélica y genotípica de los polimorfismos en la población en estudio.

| Variable | Grupo Diada Casos DTN | | Madres Casos DTN | Grupo Control | |
|--|------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Genotipos /Alelos | Casos n= 50 (FC) | Madres Casos DTN n= 50 (FC) | Madres Casos DTN n= 70 (FC) | Controles n= 100 (FC) | Madres n= 100 (FC) |
| MTHFR C677T | | | | | |
| CC | 6 (0.12) | 18 (0.36) | 36 (0.51) | 24 (0.24) | 48 (0.48) |
| CT | 38 (0.76) | 27(0.54) | 30 (0.43) | 67 (0.67) | 50 (0.50) |
| TT | 6 (0.12) | 5 (0.10) | 4 (0.06) | 9 (0.09) | 2 (0.02) |
| C | 50 (0.50) | 63 (0.63) | 102 (0.73) | 133 (0.67) | 146 (0.73) |
| T | 50 (0.50) | 37 (0.37) | 38 (0.27) | 67 (0.34) | 54 (0.27) |
| * EHW | $p= 0.001$ | $p= 0.51$ | | $p= 0.001$ | $p= 0.02$ |
| MTHFR A1298C | | | | | |
| AA | 16 (0.32) | 24 (0.48) | 12 (0.17) | 40 (0.40) | 45 (0.45) |
| AC | 31 (0.62) | 25 (0.50) | 54 (0.77) | 58 (0.58) | 53 (0.53) |
| CC | 3 (0.06) | 1 (0.02) | 4 (0.06) | 2 (0.02) | 2 (0.02) |
| A | 63 (0.63) | 73 (0.73) | 78 (0.56) | 140 (0.70) | 143 (0.72) |
| C | 37 (0.37) | 27 (0.27) | 62 (0.44) | 60 (0.30) | 57 (0.29) |
| * EHW | $p= 0.06$ | $p= 0.04$ | | $p= 0.001$ | $p= 0.01$ |
| CBS 844ins68 | | | | | |
| WT/WT | 20 (0.40) ² | 47 (0.94) | 61 (0.87) | - | 106 (1.06) ² |
| WT/INS | 4 (0.08) ² | 3 (0.06) | 9 (0.13) | - | 16 (0.16) ² |
| INS/INS | - (0.00) ² | - (0.00) | - (0.00) | - | - (0.00) ² |
| WT | 44 (0.44) ² | 97 (0.97) | 131 (0.94) | - | 228 (1.14) ² |
| INS | 4 (0.04) ² | 3 (0.03) | 9 (0.06) | - | 16 (0.08) ² |
| * EHW | $p= 0.90$ | $p= 0.88$ | | $p= -$ | $p= 0.74$ |
| CBS C699T | | | | | |
| CC | 30 (0.60) | 32 (0.64) | 43 (0.61) | 52 (0.52) ² | 63 (0.63) |
| CT | 19 (0.38) | 17 (0.34) | 26 (0.37) | 37 (0.37) ² | 35 (0.35) |
| TT | 1 (0.02) | 1 (0.02) | 1 (0.01) | 5 (0.05) ² | 2 (0.02) |
| C | 79 (0.79) | 81 (0.81) | 112 (0.80) | 141 (0.71) ² | 161 (0.80) |
| T | 21 (0.21) | 19 (0.19) | 28 (0.20) | 47 (0.24) ² | 39 (0.20) |
| * EHW | $p= 0.67$ | $p= 0.47$ | | $p= 0.89$ | $p= 0.51$ |
| MTRR A66G | | | | | |
| AA | 31 (0.62) | 18 (0.36) | 37 (0.53) | 30 (0.30) ² | 61 (0.61) |
| AG | 18 (0.36) | 30 (0.60) | 32 (0.46) | 26 (0.26) ² | 38 (0.38) |
| GG | 1 (0.02) | 2 (0.04) | 1 (0.01) | 4 (0.04) ² | 1 (0.01) |
| A | 80 (0.80) | 66 (0.66) | 106 (0.76) | 86 (0.43) ² | 160 (0.80) |
| G | 20 (0.20) | 34 (0.34) | 34 (0.24) | 34 (0.17) ² | 40 (0.20) |
| * EHW | $p= 0.67$ | $p= 0.01$ | | $p= 0.87$ | $p= 0.17$ |
| <p>*EHW: Equilibrio de Hardy-Weinberg ²= 24: Casos DNT genotipificados para CBS 844ins68pb. ²n=122 Madres Controles genotipificados para CBS 844ins68pb ²n= 73: Controles CASOS genotipificados para CBS C699T ²n = 60 Controles genotipificados para MTRR A66G.</p> | | | | | |



6.3. Comparación entre genotipos

6.3.1. Genotipo MTHFR C677T

La comparación de las frecuencias genotípicas entre los casos de DNT y los controles no reveló diferencias estadísticamente significativas ($p=0.21$). En la comparación de las frecuencias genotípicas de las madres de los casos y de los controles si se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.05$). De igual forma, al analizar las frecuencias del grupo de diadas casos y las diadas control hay diferencia estadísticamente significativa ($p=0.04$). Al comparar el total de las madres de los casos y las madres de los controles no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.17$).

6.3.2. Genotipo MTHFR A1298C

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) entre los genotipos en ninguno de los grupos de casos y los grupos control.

6.3.3. Genotipo CBS 844ins68

La comparación entre ambos grupos de estudio resultó no significativa para las distribuciones genotípicas ($p>0.05$).

6.3.4. Genotipo CBS C699T

No existen diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) en la distribución de los genotipos entre los grupos de estudio.

6.3.5. Genotipo MTRR A66G

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.30$) entre el grupo de los casos y sus respectivos controles. Las frecuencias del grupo de



diadas casos y las diadas control tampoco presentan diferencias estadísticamente significativas ($p=0.44$), así como al comparar el total de las madres de los casos y las madres de los controles ($p=0.07$). Por el contrario, en la comparación de los genotipos de las madres de los casos y las madres controles si se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.01$) entre los grupos.

6.4. Análisis de asociación de riesgo de DTN y los polimorfismos estudiados

Con el fin de evaluar el impacto de la presencia de los polimorfismos estudiados y el riesgo de DTN, se calcularon los ORs con un 95% de CI. La tabla 27 presenta los datos de los modelos genéticos recesivo y dominante para los diferentes polimorfismos incluidos en el estudio.

6.4.1. Polimorfismo C677T MTRR

6.4.1.1. Casos DTN vs Controles

Cuando se aplicó el modelo recesivo (CC/CT vs TT) ($p=0.56$) y el dominante (TT/CT vs CC) ($p=0.08$), tampoco se observó un incremento significativo en el riesgo. Por el contrario, al realizar la comparación entre los alelos, si se observó asociación entre el alelo 677T en los casos y un riesgo significativo para desarrollar DTN (OR=1.98 [1.21 – 3.23], 95% CI; ($p=0.005$).

6.4.1.2. Madres Hijos DNT vs Madres Controles

De igual forma, al aplicar el modelo recesivo (CC/CT vs TT) se encontró un riesgo significativamente elevado en las madres (OR=5.44 [1.01 – 29.13], 95% CI; ($p=0.02$), contrario a lo observado al aplicar el modelo dominante (TT/CT vs CC) donde no se observó asociación significativa ($p=0.16$). Al realizar la comparación entre los alelos, no se observó asociación significativa entre el alelo 677T en las madres y el riesgo para desarrollar DTN ($p=0.07$).



6.4.1.3. Diadas DTN vs Diadas Controles

Similar a lo observado en el grupo de las madres de casos se encontró una asociación significativa de los genotipos con un factor de riesgo significativo (OR=1.89 [1.08 – 3.31], 95% CI; ($p=0.02$) al aplicar el modelo recesivo (CC/CT vs TT) y cuando se aplicó el modelo dominante (TT/CT vs CC) no se observó asociación de riesgo. Al realizar la comparación entre alelos, se observó asociación entre el alelo 677T y el riesgo para desarrollar DTN (OR=1.77 [1.24 – 2.52], 95% CI; ($p=0.001$).

6.4.1.4. Total Madres DTN vs Madres Controles

No se observó un riesgo significativo al aplicar los modelos recesivo (CC/CT vs TT) y dominante (TT/CT vs CC) ($p=>0.05$). A su vez, al realizar la comparación entre alelos, no se observó asociación entre el alelo 677T y el riesgo de presentar DTN al comparar el número total de madres de casos y las de los controles ($p=0.32$).

6.4.2. Polimorfismo A1298C MTHFR

6.4.2.1. Casos DTN vs Controles

No se encontró un riesgo significativo de presentar DTN para los modelos recesivo (AA/AC vs CC) ni dominante (CC/AC vs AA) ($p=>0.05$) en este grupo de estudio. Tampoco se observó un incremento significativo en el riesgo al realizar la comparación entre alelos ($p= 0.22$).

6.4.2.2. Madres Hijos DNT vs Madres Controles

De manera análoga a los resultados de los casos, los ORs resultaron no significativos al aplicar los modelos recesivo (AA/AC vs CC) y dominante (CC/AC vs AA) y al realizar la comparación entre alelos, no se encontró tampoco



asociación significativa entre el alelo 1298C y el riesgo de presentar DTN ($p=0.78$).

6.4.2.3. Diadas DTN vs Diadas Controles

No se encontró riesgo significativo de presentar DTN para los modelos recesivo (AA/AC vs CC) y dominante (CC/AC vs AA) ($p=>0.05$). Al realizar la comparación entre alelos, tampoco se observó asociación entre el alelo 1298C y el riesgo para desarrollar DTN ($p=0.48$).

6.4.2.4. Total Madres DTN vs Madres Controles

No se observó un incremento significativo al aplicar el modelo recesivo (AA/AC vs CC) ($p=0.36$). Sin embargo, si se encontró asociación significativa del modelo dominante (CC/AC vs AA) como factor de riesgo para los DTN (OR=1.90 [1.09 – 3.32], 95% CI; ($p=0.02$)). Al realizar la comparación entre alelos, no es observada asociación entre el alelo 1298C y el riesgo de presentar DTN ($p=0.05$).

Tabla 27. Análisis de Asociación de riesgo de DTN y los polimorfismos estudiados.

| Variable | Casos DTN vs Controles | | Madres CASOS DTN vs Madres Controles | | Diadas DTN vs Diadas Controles | | Total Madres DTN vs Madres Controles | |
|---|------------------------|----------|--------------------------------------|----------|--------------------------------|----------|--------------------------------------|----------|
| | OR (IC 95%) | <i>p</i> | OR [IC 95%] | <i>p</i> | OR [IC 95%] | <i>p</i> | OR [IC 95%] | <i>p</i> |
| MTHFR C677T | | | | | | | | |
| CC/CT vs TT | 1.38 [0.46 - 4.11] | 0.56 | 5.44 [1.01 - 29.13] | 0.02* | 1.89 [1.08 - 3.31] | 0.02* | 3.97 [0.83 - 18.83] | 0.06 |
| TT/CT vs CC | 0.43 [0.16 - 1.13] | 0.08 | 1.64 [0.81 - 3.29] | 0.16 | 0.56 [0.32 - 0.96] | 0.19 | 0.88 [0.52 - 1.50] | 0.65 |
| T vs C | 1.98 [1.21 - 3.23] | 0.005* | 1.58 [0.95 - 2.65] | 0.07 | 1.77 [1.24 - 2.52] | 0.001* | 1.22 [0.81 - 1.86] | 0.32 |
| MTHFR A1298C | | | | | | | | |
| AA/AC vs CC | 0.31 [0.05 - 1.97] | 0.19 | 1.00 [0.08 - 11.30] | 1.00 | 0.43 [0.10 - 1.79] | 0.23 | 2.13 [0.40 - 11.22] | 0.36 |
| CC/AC vs AA | 1.41 [0.69 - 2.89] | 0.33 | 1.12 [0.57 - 2.2] | 0.72 | 1.10 [0.68 - 1.80] | 0.67 | 1.90 [1.09 - 3.32] | 0.02* |
| C vs A | 1.37 [0.82 - 2.27] | 0.22 | 0.92 [0.54 - 1.58] | 0.78 | 1.13 [0.78 - 1.64] | 0.48 | 1.48 [0.98 - 2.21] | 0.05 |
| CBS 844INS 64 | | | | | | | | |
| WT-WT/ WT-INS vs INS | - | - | 0.40 [0.02- 6.68] | 0.51 | - | - | 0.98 [0.06 - 15.9] | 0.99 |
| INS-INS/WT-INS vs WT-WT | - | - | 2.36 [0.65 - 8.56] | 0.17 | - | - | 1.35 [0.61 - 3.00] | 0.44 |
| INS vs WT | - | - | 0.44 [0.12 - 1.54] | 0.18 | - | - | 0.75 [0.34 - 1.62] | 0.46 |
| CBS C699T | | | | | | | | |
| CC/CT vs TT | 0.36 [0.04 - 3.19] | 0.34 | 1.00 [0.08 - 11.30] | 1.00 | 0.54 [0.11 - 2.67] | 0.44 | 0.83 [0.11 - 6.00] | 0.85 |
| TT/CT vs CC | 1.21 [0.60 - 2.43] | 0.58 | 1.04 [0.51 - 2.11] | 0.90 | 0.89 [0.54 - 1.46] | 0.65 | 0.97 [0.56 - 1.70] | 0.93 |
| T vs C | 0.79 [0.44 - 1.42] | 0.44 | 0.96 [0.52 - 1.78] | 0.91 | 0.87 [0.57 - 1.33] | 0.54 | 1.00 [0.62 - 1.61] | 0.98 |
| MTRR A66G | | | | | | | | |
| AA/AG vs GG | 0.28 [0.03 - 2.64] | 0.24 | 0.24 [0.02 - 2.74] | 0.21 | 0.95 [0.22 - 4.10] | 0.95 | 0.44 [0.04 - 4.29] | 0.46 |
| GG/AG vs AA | 1.63 [0.76 - 3.49] | 0.20 | 2.78 [1.37 - 5.61] | 0.003* | 0.72 [0.44 - 1.20] | 0.21 | 1.84 [1.07 - 3.16] | 0.02* |
| G vs A | 0.63 [0.33 - 1.18] | 0.15 | 2.06 [1.20 - 3.53] | 0.008* | 1.22 [0.81 - 1.84] | 0.31 | 1.58 [1.01 - 2.47] | 0.04* |
| *Significancia Estadística $P < 0.05$ OR: Odds Ratio CI: Intervalo de Confianza | | | | | | | | |



6.4.3. Polimorfismo 844ins68 CBS

6.4.3.1. Casos DTN vs Controles

Para el grupo control, no fue posible la determinación genotípica, por lo cual no se realiza el análisis de riesgo en este grupo de estudio.

6.4.3.2. Madres Hijos DNT vs Madres Controles

No se encontró un riesgo significativo de presentar DTN para ninguno de los genotipos ($p=0.32$), como tampoco para los modelos dominante ó recesivo ($p=>0.05$) en este grupo de estudio, ni al realizar la comparación entre alelos ($p= 0.18$).

6.4.3.3. Diadas DTN vs Diadas Controles

Para el grupo control casos, no fue posible la determinación genotípica y no es posible realizar el análisis de riesgo en este grupo de estudio.

6.4.3.4. Total Madres DTN vs Madres Controles

No se observó un incremento significativo de riesgo al aplicar el modelo recesivo (WT-WT/WT-INS vs INS-INS) ó dominante (INS-INS/WT-INS vs WT-WT) ($p=>0.05$), así como tampoco, al realizar la comparación entre alelos ($p=0.46$).

6.4.4. Polimorfismo C699T CBS

6.4.4.1. Casos DTN vs Controles

No se observó un incremento significativo en el riesgo al aplicar los modelos recesivo (CC/CT vs TT) y dominante (TT/CT vs CC) ($p=>0.05$). A su vez, al



realizar la comparación entre alelos, no se observó asociación entre el alelo 699T y el riesgo de presentar DTN ($p=0.44$).

6.4.4.2. Madres Hijos DNT vs Madres Controles

Al aplicar los modelos recesivo (CC/CT vs TT) y dominante (TT/CT vs CC) no se encontró asociación significativa ($p=>0.05$) y el riesgo de presentar DTN, ni tampoco al realizar la comparación entre los alelos ($p=0.91$).

6.4.4.3. Diadas DTN vs Diadas Controles

No se encontró riesgo significativo de presentar DTN cuando se aplicaron los modelos recesivo (CC/CT vs TT) y dominante (TT/CT vs CC) ($p=>0.05$) Al realizar la comparación entre alelos, tampoco se observó asociación de riesgo para desarrollar DTN ($p=0.54$).

6.4.4.4. Total Madres DTN vs Madres Controles

Igualmente a los demás grupos estudiados, no se encontró riesgo significativo en ninguno de los modelos recesivo (CC/CT vs TT) y dominante (TT/CT vs CC) ($p=>0.05$) Al realizar la comparación entre alelos, tampoco se observó asociación de riesgo para desarrollar DTN ($p=0.98$).

6.4.5. Polimorfismo A66G MTRR

6.4.5.1. Casos DTN vs Controles

No se encontró asociación al riesgo en ninguno de los modelos recesivo (AA/AG vs GG) y dominante (GG/AG vs AA) ($p=>0.05$) en este grupo de estudio. Tampoco se observó un incremento significativo con el riesgo al realizar la comparación entre alelos ($p= 0.15$).



6.4.5.2. Madres Hijos DTN vs Madres Controles

Se encontró asociación significativa al aplicar el modelo recesivo (GG/AG vs AA) como factor de riesgo para los DTN (OR= 2.78 [1.37 – 5.61], 95% CI; ($p=0.003$) y al realizar la comparación entre alelos, también se observó asociación entre el alelo 66G y un riesgo significativo de presentar DTN OR=2.06 [1.20 – 3.53], 95% CI; ($p=0.008$). No se observó un incremento significativo en el riesgo al aplicar el modelo dominante (AA/AG vs GG) ($p=0.21$).

6.4.5.3. Diadas DTN vs Diadas Controles

Al aplicar los modelos recesivo (AA/AG vs GG) y dominante (GG/AG vs AA) y realizar la comparación entre alelos y genotipos, no se encontró asociación significativa de riesgo de presentar DTN ($p=>0.05$).

6.4.5.4. Total Madres DTN vs Madres Controles

No se observó un incremento significativo en el riesgo para los genotipos estudiados al aplicar el modelo recesivo (AA/AG vs GG) ($p=>0.46$). De igual manera como se observó en las madres de los casos incluidos en el estudio, se encontró asociación significativa del modelo dominante (GG/AG vs AA) de riesgo para los DTN (OR=1.84 [1.07 – 3.16], 95% CI; ($p=0.02$). A su vez, al realizar la comparación entre alelos, se observó asociación entre el alelo 66G y el riesgo de presentar DTN (OR=1.58 [1.01 – 2.47], 95% CI; ($p=0.04$).

6.5. Combinación genotípica de los polimorfismo MTHFR C677T y A1298C.

6.5.1. Distribución de los genotipos combinados en los grupos de estudio.

6.5.1.1. Casos DTN vs Controles



En el grupo de casos, se observa una mayor frecuencia de las combinaciones genotípicas 1298AC+677CC/TT (54%). Por otra parte, en el grupo control, se observan frecuencias aumentadas en las interacciones 1298AC+677TT (53%).

| GENOTIPOS COMBINADOS | | | |
|----------------------|-------------|-----|----|
| CASOS DTN | MTHFR C677T | | |
| MTHFR A1298C | CC | CT | TT |
| AA | 22 | 54 | 22 |
| AC | 37 | 69 | 37 |
| CC | 9 | 41 | 9 |
| TOTAL | 68 | 164 | 68 |

| GENOTIPOS COMBINADOS - FRECUENCIAS | | | |
|------------------------------------|-------------|------|------|
| CASOS DTN | MTHFR C677T | | |
| MTHFR A1298C | CC | CT | TT |
| AA | 0,32 | 0,33 | 0,32 |
| AC | 0,54 | 0,42 | 0,54 |
| CC | 0,13 | 0,25 | 0,13 |
| TOTAL | 1 | 1 | 1 |

Tabla 28. Distribución de genotipos combinados (C677T+A1298C) y sus respectivas frecuencias en el grupo de casos DTN.

| GENOTIPOS COMBINADOS | | | |
|----------------------|-------------|-----|-----|
| CONTOLES | MTHFR C677T | | |
| MTHFR A1298C | CC | CT | TT |
| AA | 64 | 107 | 49 |
| AC | 82 | 125 | 67 |
| CC | 26 | 69 | 11 |
| TOTAL | 172 | 301 | 127 |

| GENOTIPOS COMBINADOS - FRECUENCIAS | | | |
|------------------------------------|-------------|------|------|
| CONTOLES | MTHFR C677T | | |
| MTHFR A1298C | CC | CT | TT |
| AA | 0,37 | 0,36 | 0,39 |
| AC | 0,48 | 0,42 | 0,53 |
| CC | 0,15 | 0,23 | 0,09 |
| TOTAL | 1 | 1 | 1 |

Tabla 29. Distribución de genotipos combinados (C677T+A1298C) y sus respectivas frecuencias en el grupo de controles.

6.5.1.2. Madres DTN vs Madres Control

En el grupo de casos, se observa una mayor frecuencia de la combinación genotípica 1298AC+677TT (60%). De igual forma, en el grupo control, se observó frecuencias de la combinación genotípica aumentadas en las interacciones 1298AC+677TT (53%). No se observaron dos genotipos mutados AC/TT, AC/CT, en los individuos del grupo.



| GENOTIPOS COMBINADOS | | | |
|----------------------|-------------|------------|------------|
| MADRES DTN | MTHFR C677T | | |
| MTHFR A1298C | CC | CT | TT |
| AA | 90 | 93 | 45 |
| AC | 133 | 136 | 88 |
| CC | 59 | 62 | 14 |
| TOTAL | 282 | 291 | 147 |

| GENOTIPOS COMBINADOS - FRECUENCIAS | | | |
|------------------------------------|-------------|----------|----------|
| MADRES DTN | MTHFR C677T | | |
| MTHFR A1298C | CC | CT | TT |
| AA | 0,32 | 0,32 | 0,31 |
| AC | 0,47 | 0,47 | 0,60 |
| CC | 0,21 | 0,21 | 0,10 |
| TOTAL | 1 | 1 | 1 |

Tabla 30. Distribución de genotipos combinados (C677T+A1298C) y sus respectivas frecuencias en el grupo de madres con hijos DTN.

| GENOTIPOS COMBINADOS | | | |
|----------------------|-------------|------------|------------|
| MADRES CONTROLES | MTHFR C677T | | |
| MTHFR A1298C | CC | CT | TT |
| AA | 93 | 95 | 47 |
| AC | 101 | 103 | 55 |
| CC | 50 | 52 | 4 |
| TOTAL | 244 | 250 | 106 |

| GENOTIPOS COMBINADOS - FRECUENCIAS | | | |
|------------------------------------|-------------|----------|----------|
| MADRES CONTROLES | MTHFR C677T | | |
| MTHFR A1298C | CC | CT | TT |
| AA | 0,37 | 0,36 | 0,39 |
| AC | 0,48 | 0,42 | 0,53 |
| CC | 0,15 | 0,23 | 0,09 |
| TOTAL | 1 | 1 | 1 |

Tabla 31. Distribución de genotipos combinados (C677T+A1298C) y sus respectivas frecuencias en el grupo de madres control.

6.6. Análisis de riesgo de las interacciones genotípicas entre los polimorfismos MTHFR C677T y A1298C.

La posible interacción entre el genotipo C677T y A1298C de la MTHFR ha sido reportada en recientes estudios (14). Con el fin de evaluar el impacto de la interacción de los polimorfismos combinados y el riesgo de presentar DTN, se calculó el OR con un 95% CI. La combinación de las frecuencias genotípicas entre los diferentes polimorfismos se muestra en la tabla 31.



6.6.1. Casos DTN vs Controles.

| CASOS DTN vs CONTROLES | | | |
|------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| C677T A1298C | OR (IC 95%) CC | OR [IC 95%] CT | OR [IC 95%] TT |
| AA | 22* | 1.47 [0.81 - 2.63] | 1.30 [0.64 - 2.62] |
| AC | 1.31 [0.70 - 2.44] | 1.60 [0.91 - 2.82] | 1.65 [0.88 - 3.11] |
| CC | 1.00 [0.40 - 2.47] | 1.72 [0.93 - 3.21] | 2.38 [0.87 - 6.50] |

*Categoría de referencia OR: Odds Ratio IC: Intervalo de Confianza

Tabla 32. Odds Ratios estimados para los genotipos combinados (C677T+A1298C) en el grupo de Casos DTN vs Controles.

La comparación demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en las frecuencias genotípicas combinadas del genotipo C677T y el genotipo A1298C, que puedan ser asociadas al riesgo de presentar DTN.

6.6.2. Madres DTN vs Madres Control

En la comparación entre las madres de casos con DTN y las madres control, se evidenció que existen diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias genotípicas combinadas del genotipo 677TT+1298AC (OR= 1.65 [1.06 – 2.57], 95% CI; $p=0.02$) y los genotipos 677TT+1298CC (OR= 3.61 [1.15 – 11.4], 95% CI; $p=0.02$) que puedan ser asociadas factor de riesgo de presentar DTN.

| MADRES DTN vs MADRES CONTROL | | | |
|------------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------------------|
| C677T A1298C | OR (IC 95%) CC | OR [IC 95%] CT | OR [IC 95%] TT |
| AA | 90* | 1.01 [0.67 - 1.51] | 0.98 [0.59 -1.63] |
| AC | 1.36 [0.92 - 2.00] | 1.33 [0.92 - 2.00] | 1.65 [1.06 - 2.57] $p=0.02^*$ |
| CC | 1.22 [0.75 - 1.96] | 1.23 [0.77 - 1.97] | 3.61 [1.15 - 11.4] $p=0.02^*$ |

*Categoría de referencia OR: Odds Ratio IC: Intervalo de Confianza



Tabla 33. Odds Ratios estimados para los genotipos combinados (C677T+A1298C) en el grupo de madres DTN vs madres control.

7. DISCUSIÓN

En los últimos años, algunos investigadores han fundamentado sus estudios en la asociación de los diferentes polimorfismos de los genes de las enzimas involucradas en el ciclo del ácido fólico y la homocisteína y la etiología de los DTN. Teniendo en cuenta que los DTN podrían tener una etiología poligénica, el desarrollo del presente estudio estuvo enfocado en evaluar la asociación de algunos polimorfismos de los genes involucrados en el metabolismo del folato y la homocisteína con el riesgo de presentar DTN en una población colombiana.

7.1. Polimorfismo MTHFR C677T

Numerosos estudios se han desarrollado en torno al papel del polimorfismo C677T de la MTHFR y el riesgo de presentar DTN y muchos de ellos han demostrado asociación del polimorfismo y la malformación. Diversas publicaciones han mostrado variaciones étnicas y regionales para las frecuencias alélicas y genotípicas de este polimorfismo (42,65,71,73,74,78,94), demostrando que el alelo 677T presenta frecuencias altas en la población italiana (43.8%), en los hispanos de California (41.7%), mexicanos (58,6%) y en general en poblaciones europeas (24-40%), estos datos son similares a los observados en este estudio en población control (20%), con frecuencias que son significativamente aumentadas comparadas con las presentadas en Asia (4.1%), África (9.4%) y las Islas Británicas (11%) cuyas poblaciones muestran homocigosidad para el alelo T (48,75). Sin embargo los datos obtenidos para el genotipo TT en nuestra población control, no son similares a lo observado en otros estudios de casos y control de asociación del polimorfismo con enfermedad cardiovascular en la población colombiana sana (89). Por otra



parte, numerosos estudios han encontrado importantes variaciones étnicas y geográficas en las frecuencias del alelo T como por ejemplo las descritas para la población española (40%), japonesa (35%) y para la población africana (6%), demostrándose que la incidencia de los DTN es común entre la población hispánica, menos común entre la población blanca no-hispánica y mucho menos frecuente en la población negra (75). Adicionalmente, la alta prevalencia de portadores de este polimorfismo en algunos lugares sugiere que esta mutación es ancestral (28,67) y que confiere protección contra la dietas escasas de folatos y el cáncer de colon, aun a costa de aumentar el riesgo de DTN y otros defectos congénitos (95).

7.1.1. Casos DTN vs Controles

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, con respecto a la frecuencia observada para el polimorfismo C677T de 0.50 en los casos, es consistente con lo reportado en algunos estudios (7,13,75,77) y diferente con los presentado por otros autores (7,79,88). La distribución de las frecuencias de los alelos y genotipos según la mutación puntual C677T no corresponde con la documentada para la población colombiana (74). Atribuimos los resultados a que los resultados obtenidos no son representativos de la población general, dado que la mayoría de participantes en el estudio eran provenientes de Antioquía. El polimorfismo C677T tiene frecuencia aumentada en la mayoría de las poblaciones y muestra una distribución heterogénea en diferentes grupos étnicos (71,96). Así mismo, la comparación de las frecuencias genotípicas entre los casos de DNT y los controles no reveló diferencias estadísticamente significativas ($p=0.21$), semejante con lo reportado por otros investigadores (7,8,48,56,79,91,94) y a diferencia de otros (40,56,75,77,88,97), pero se observa una frecuencia mayor de heterocigosidad de la variante en la mayoría de individuos estudiados. No se observa un incremento en el riesgo al aplicar los modelos genéticos, pero si se encuentra asociación de riesgo de presentar la malformación, del alelo 677T en los casos OR 1.98 [1.21 - 3.23]



($p=0.005$), similar a la reportado en la mayoría de estudios realizados en este polimorfismo con relación al riesgo de presentar DTN (75,88,97,98).

7.1.2. Madres Hijos DTN vs Madres Control

La homocigosidad de la variante, muestra una mayor frecuencia en los pacientes con DTN y sus madres en algunas poblaciones como la Irlandesa, Italiana y Mexicana (28,36,48,55,75,77,94,97,98). Sin embargo, en poblaciones Turcas, Inglesas, Francesas y Alemanas, esta asociación no ha sido encontrada (75,88), convirtiéndose en un tema controversial en muchas poblaciones a nivel mundial (40,48). En la comparación de las frecuencias genotípicas de las madres no se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.05$). Por otra parte, al aplicar el modelo genético recesivo en las madres de los casos se encontró que confiere 5.44 veces más riesgo de presentar DTN en sus hijos ($p=0.02$). Los resultados de este estudio, indican que la homocigosidad del alelo 677T en las madres incrementa el riesgo de DTN en los niños, más sin embargo, estos resultados son discrepantes con otros publicados (8,48,77) y presentan similitud con otros (13,77,97), lo que revela la gran complejidad de la etiología de la malformación. Al parecer existe una sinergia entre la presencia de este alelo en homocigosis y la disminución de folatos en las madres, ocasionando esta última circunstancia un aumento importante del riesgo para DTN (66). Algunos autores reportaron ORs en la población danesa para la homocigosis (TT) de 3.7 para las madres (IC 95% 1.5 – 9.1), 2.2 para los padres (IC 95% 0.8 – 6.3) y 2.9 para los pacientes frente a los controles (IC 95% 1.0 – 7.9) (49). Sin embargo, la modesta contribución del genotipo en el riesgo de algunas otras poblaciones, indican que es un factor de baja penetrancia porque la mayoría de los individuos con genotipo TT no presentan DTN (49,96).

7.1.3. Diadas DTN vs Diadas Control



Por otra parte, cuando se realizó la comparación entre los genotipos se encuentran diferencias significativas entre los grupos ($p=0.04$) y cuando se aplicó el modelo dominante en las diadas se encontró una asociación significativa del genotipo con un factor de riesgo significativo de 1.89 [1.08 - 3.31] ($p=0.02$), datos que concuerdan con los reportados en la mayoría de los estudios realizados, donde se ha comprobado el riesgo que otorga la madre a la descendencia para presentar DTN (40,56,75,77,88,97). Adicionalmente, la asociación de riesgo de presentar la malformación, en presencia del alelo 677T es encontrada con un OR 1.77 [1.24 - 2.52] ($p=0.001$), similar a la reportado en algunos estudios (13,75,88,97,98).

7.1.4. Total Madres DTN vs Madres Control

En la comparación entre el total de madres de hijos afectados y los controles, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo, coincidiendo con lo reportado por algunos autores (8,13,48,77,79).

7.2. Polimorfismo MTHFR A1298C

7.2.1. Hijos DTN vs Hijos Control

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los hijos afectados con DTN y los controles, similar a lo reportado en la literatura (7,13,36,40,79,87) y en contradicción con el único grupo de investigación que ha encontrado asociación del polimorfismo A1298C y los DTN (52).

7.2.2. Madres Hijos DTN vs Madres Control

En la comparación entre las madres de los casos y los controles, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo A1298C al ser evaluado independientemente, coincidiendo con lo reportado en el mundo (13,36,79). Por el contrario, no encontramos



asociación entre el polimorfismo A1298C y los DTN, en contraste con lo reportado por De Marco, el único grupo de investigación hasta el momento en encontrar una asociación directa entre el alelo 1298C en las madres y los hijos con la malformación (52). Aunque el genotipo CC materno no tiene una influencia apreciable en la frecuencia de DTN como un factor de riesgo independiente, este podría llegar a tener mayor impacto cuando otros factores de riesgo relacionados con el folato estén presentes.

7.2.3. Diadas DTN vs Diadas Control

En la comparación entre las diadas casos y los controles, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo A1298C al ser evaluado independientemente, como tampoco riesgo asociado a presentar DTN, coincidiendo con lo reportado en el mundo (13,36,79). Como la mayoría de individuos homocigotos para CC no presentan DTN, es claro que el genotipo es un factor de riesgo con muy baja penetrancia, por lo que no es sorpresa que los estudios que involucran tamaños de muestras muy pequeñas fallen al tratar de evidenciar cualquier asociación entre el polimorfismo A1298C y los DTN.

7.2.4. Total Madres DTN vs Madres Control

Por el contrario, al evaluar el total de las madres de hijos afectados, se encuentra que el polimorfismo brinda un riesgo estadísticamente significativo. 1.90 [1.09 - 3.32] ($p=0.02$), tal como ha sido reportado por un estudio en Italia (52), pero la mayoría de estudios desarrollados en varias partes del mundo en este aspecto han generados resultados contradictorios, esto puede ser



atribuido a las diferencias étnicas en la distribución de los genotipos, la heterogeneidad de los fenotipos y la etiología multifactorial de los DTN.

7.3. CBS 844ins68

7.3.1. Hijos DTN vs Hijos Control

No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias alélicas y genotípicas de los casos y los controles, como tampoco asociación de riesgo para la malformación ante la presencia de la variante, similar a lo reportado (87). Aunque la mayoría de las mutaciones en el gen de la CBS son raras, se ha reportado que la inserción de 68 pb en el exón 8 del gen es común y se encuentra en estado heterocigoto aproximadamente en el 12% de la población general (74,87), en la población colombiana estudios previos han reportado una frecuencia de 0.026 y relacionan la existencia del polimorfismo con un efecto protector de hiperhomocisteinemia (41). El polimorfismo 844ins68 de la CBS, está asociado como factor de riesgo adicional en relación a los DTN en algunas poblaciones caucásicas (40), pero en otras poblaciones no se ha encontrado asociación de la enzima con los DTN (28,46,79,87,91).

7.3.2. Madres Hijos DTN vs Madres Control

Los resultados obtenidos indican que los genotipos maternos para la inserción de 68 pb no contribuyen significativamente al riesgo de los DTN ($p \Rightarrow 0.05$).

7.3.3. Diadas DTN vs Diadas Control

Los resultados obtenidos indican que los genotipos maternos para la inserción de 68 pb no contribuyen significativamente al riesgo de los DTN ($p \Rightarrow 0.05$).

7.3.4. Total Madres DTN vs Madres Control

Los resultados obtenidos indican que los genotipos maternos para la inserción de 68 pb no contribuyen significativamente al riesgo de los DTN ($p \Rightarrow 0.05$).



7.4. CBS C699T

7.4.1. Hijos DTN vs Hijos Control

Los resultados del presente estudio de casos y controles no evidencian asociación de riesgo del polimorfismo y la presencia de los DTN y están en desacuerdo con lo reportado por algunos autores (87), estas discrepancias encontradas entre los resultados reportados en otros estudios pueden estar dadas por la heterogeneidad de la población y las diferencias presentadas en el ambiente que puedan influir en las diferentes frecuencias. Adicionalmente, observamos un incremento en la frecuencia de homocigotos 699C en los casos comparado con los controles.

7.4.2. Madres Hijos DTN vs Madres Control

Los resultados del presente estudio entre madres y controles no evidencian asociación de riesgo del polimorfismo y la presencia de los DTN. Las controversias de la asociación entre la variante C699T y los DTN revelan la complejidad de la etiología de este tipo de malformaciones y sugiere posibles interacciones de tipo gen-gen, gen-ambiente y gen-nutrición, que contribuyen a la determinación final de la malformación.

7.4.3. Diadas DTN vs Diadas Control

Los resultados obtenidos indican que los genotipos maternos y de los hijos para variante no contribuyen significativamente al riesgo de los DTN ($p=>0.05$).

7.4.4. Total Madres DTN vs Madres Control

Los resultados obtenidos indican que los genotipos maternos para variante no contribuyen significativamente al riesgo de los DTN ($p=>0.05$). Las frecuencias poblacionales del alelo 699T y los análisis de riesgo han sido documentados en



muy pocos estudios, dificultando la comparación de los hallazgos con otros datos reportados.

7.5. MTRR A66G

7.5.1. Hijos DTN vs Hijos Control

La comparación de las frecuencias genotípicas entre los casos de DNT y los controles no reveló diferencias estadísticamente significativas ($p=>0.05$), semejante con lo reportado por otros investigadores (82,86,96) a diferencia de otros (36), pero se observa una frecuencia mayor de heterocigosidad de la variante en la mayoría de individuos estudiados. No se observa un incremento en el riesgo al aplicar los modelos genéticos ($p=>0.05$), similar a la reportado en algunos estudios realizados en este polimorfismo con relación al riesgo de presentar DTN (36,44,86).

7.5.2. Madres Hijos DTN vs Madres Control

En la comparación de las frecuencias genotípicas de las madres se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.01$). Por otra parte, al aplicar el modelo genético dominante en las madres de los casos se encontró que confiere 2.78 veces más riesgo de presentar DTN en sus hijos ($p=0.003$). Adicionalmente se encontró que el alelo G confiere riesgo significativo de presentar DTN en los hijos OR 2.06 [1.20 - 3.53] ($p=0.008$). Los resultados obtenidos en el grupo de madres están de acuerdo con lo reportado en otros estudios (86).

7.5.3. Diadas DTN vs Diadas Control

Los resultados obtenidos indican que los genotipos maternos en unión con los datos de los hijos para variante A66G no contribuyen significativamente al riesgo de los DTN ($p=>0.05$).



7.5.4. Total Madres DTN vs Madres Control

Al aplicar el modelo genético dominante al total de madres de los casos se encontró que confiere 1.84 veces más riesgo de presentar DTN en sus hijos ($p=0.002$). Adicionalmente y en similitud a la asociación encontrada en las madres de los casos incluido es el estudio, se encontró que el alelo G confiere riesgo significativo de presentar DTN en los hijos OR 1.58 [1.01 - 2.47] ($p=0.04$). Los resultados obtenidos en el grupo de madres están de acuerdo con lo reportado en otros estudios (86).

7.2. Análisis del Equilibrio de Hardy-Weinberg

Algunas poblaciones en el grupo de controles no se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg para los polimorfismos MTHFR C677T y A1298C, lo que pueden estar dado por:

- Migraciones: la población incluida en el estudio es derivada de diferentes regiones del país, que puede verse afectada por procesos de migración, donde se puede generar la introducción de nuevas variedades génicas en la población.
- Presión de selección: por mecanismos de selección natural que operan a favor del genotipo homocigoto. Estos polimorfismos tienen presión de selección, los alelos mutados desaparecen por selección y los individuos afectados quedan por fuera del muestreo realizado.

De igual forma, el desequilibrio puede presentarse por errores de muestreo al trabajar con poblaciones no uniformes, que pueden ser consideradas como subpoblaciones del conjunto mayor y que presentan diferentes frecuencias génicas. En esos casos, las poblaciones individuales pueden estar en equilibrio, pero las frecuencias genotípicas de la población en su conjunto no



corresponderán a las frecuencias esperadas para equilibrio de Hardy-Weinberg en una población uniforme.

7.6. Combinación genotípica de los polimorfismo MTHFR C677T y A1298C.

7.6.1. Distribución de los genotipos combinados en los grupos de estudio.

En algunos estudios, se ha analizado la distribución de la heterocigosidad combinada C677T/A1298C entre poblaciones, encontrando que sigue un patrón similar a la del alelo C677T aislado (79,82).

7.6.1.1. Casos DTN vs Controles

En el análisis de los genotipos combinados, no se detectó un riesgo significativo de la interacción genotípica de 677TT/1298AC entre los casos al compararlos con los controles, lo que difiere de otros resultados reportados (13,37,80), pero concuerda con otros en la no significancia (48).

7.6.1.2. Madres Hijos DTN vs Madres Controles

Al analizar la interacción genotípica entre los polimorfismos C677T y A1298C, se encontró asociación a riesgo de presentar DTN en las madres OR=1.65 [1.06 – 2.57] ($p=0.02$), al presentarse homocigosidad para la variante 677TT y 1298AC; y de al presentarse homocigosidad para ambas variantes (677TT y 1298CC) OR=3.61 [1.15 – 11.4] ($p=0.02$), similar a lo reportado por otros autores (13,37,52,62,80,97) en sus publicaciones. El hallazgo de esta



combinación de genotipos tiene gran importancia biológica en los individuos afectados, al estar asociada con la disminución de la actividad de la enzima MTHFR y la presencia de niveles plasmáticos de homocisteína (23,48,56,80), especialmente en casos de heterocigosidad doble (677CT/1298AC) (13,30,80).

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos son la primera aproximación para conocer la frecuencia y los factores de riesgo asociados con los DTN en la población colombiana, adicionalmente, brindan la primera evidencia que los DTN pueden estar fuertemente influenciados por la presencia de los polimorfismos C677T, A1298C y A66G en las madres. Aunque la comparación de las frecuencias genotípicas entre los casos de DNT, madres, diadas y los controles para los polimorfismos CBS C699T y 844ins68 pb, no reveló diferencias estadísticamente significativas para ninguno de estos polimorfismos, ni de asociación como factor de riesgo ó protector para los DTN, adicionales investigaciones deben ser realizadas en estos y otros genes que permitan evaluar el impacto de esta patología polimórfica. Adicionalmente, es posible que los polimorfismos estudiados carentes de asociación de riesgo para los DTN, jueguen un papel secundario en el riesgo, que puede depender no solo de factores genéticos combinados, sino de multifactores ambientales presentados en nuestro entorno.

Los resultados obtenidos pueden resultar contradictorios con los reportados en otras partes del mundo, lo que puede ser atribuido a las diferencias étnicas en la distribución de los genotipos, la heterogeneidad de los fenotipos y la etiología multifactorial de los DTN. Teniendo en cuenta estos hallazgos, es necesario contar con tamaños de muestras más grandes, constituidos por familias completas (hijos, madres y padres) que nos permitan realizar estudios de asociación de genotipos con mayor significancia ó de transmisión de alelos TDT para tener mayor poder estadístico que permita obtener



conclusiones definitivas sobre el rol de las variantes genética en la frecuencia de los DTN en la población.

9. PRESPECTIVAS Y APLICACIONES

Recientemente, algunos autores hacen referencia a la dificultad de la investigación de los genes marcadores asociados con los DTN y la resolución de la mayoría de las preguntas de la genética multifactorial de dichos defectos. Se plantea si las variantes genéticas encontradas corresponden a mutaciones deletéreas o polimorfismos y si corresponden a mutaciones deletéreas, porque las frecuencias poblacionales han sido reportadas con unos valores tan altos? A su vez, es planteada la interrogante de si dichas variantes confieren alguna ventaja selectiva en la población. Por otra parte, no es claro si la combinación de numerosos genes, cada uno con un efecto pequeño, confieren el riesgo de DTN? O por el contrario, si es necesaria la existencia de una mutación mayor, que combinada con genes modificadores confieren el riesgo? (99).

El presente trabajo pretende dar las primeras aproximaciones para el entendimiento del rol de los factores genéticos en la presentación de los DTN, teniendo en cuenta que las anomalías congénitas son un grave problema de salud pública en nuestro país. Las malformaciones congénitas, incluyendo los DTN, se han empezado a manejar con un sistema de vigilancia epidemiológica, basado en un modelo de desarrollo compartido con el Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas (ECLAMC); el cual se ha establecido como un instrumento indispensable para el control de las malformaciones congénitas y el desarrollo de las estrategias que permitan prevenirlas, trabajando en conjunto con el Plan Nacional de Salud Pública, 2007-2010 (Decreto 3039 de 2007), en desarrollo de políticas en salud y la atención a la población infantil de nuestro país (4).

El plan también propone grandes estrategias, una de ellas, la vigilancia y el control de las anomalías congénitas, patologías que vienen consolidándose



desde hace más de dos décadas en los primeros lugares de las causas de la mortalidad infantil y que causan serias discapacidades (13,100,101). De esta manera, al desarrollar una investigación sobre los polimorfismos asociados a las malformaciones a nivel de tubo neural, se realizan nuevos aportes en esta área del conocimiento, para conocer mejor los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad, que permitan generar mejores modelos de prevención, con un posterior impacto directo en la mortalidad infantil y en la discapacidad de la población.

Dado que para lograr con eficacia el tamizaje neonatal de los DTN, es necesario contar con marcadores predictivos para caracterizar poblaciones en riesgo, conocer las frecuencias de los polimorfismos y la relación entre portadores de polimorfismos, es fundamental continuar con la realización de investigaciones en este área, que permitan obtener patrones predictivos para alteraciones y patologías de presentación tardía.



10. BIBLIOGRAFÍA

1. **Wyszynski, D. F.** 2006. Neural Tube defects. From origin to treatment. *J. Hum Genet.* 120: 605.
2. **Kaufman, B.** 2004. Neural Tube Defects. *Pediatr. Clin N Am.* 51: 389-419.
3. **Van der Linden, I., Afman, L., Heil, S., Blom, H.** 2006. Genetic variation in genes of folate metabolism and neural-tube defect risk. *Proceedings of the Nutrition Society.* 65: 204-215.
4. **Afman, L.A., Lievers, J.A, Kluijtmans, L.A., Trijbels, F.J., Blom, H.J.** 2003. Gene-gene interaction between the cystathionine β -synthase 31 base pair variable number of tandem repeats and the methylenetetrahydrofolate reductasa 677C>T polymorphism on homocysteine levels and risk for neural tube defects. *Molecular Genetics and Metabolism.* 78: 211-215.
5. **Gos, M., Szpecht, P.A.** 2002. Genetic basis of neural tube defects. II Genes correlated with folate and methionine metabolism. *J. Appl. Genet.* 43 (4): 511-524.
6. **Martinez, V.R., Rojas, M.A., Sanchez, H.J., Hernadez, T.U., Delgado,E.I., Ortiz, L.R.** 2001. Evaluación Clínica, Bioquímica y Molecular de una familia con recurrencia de defectos del tubo neural. *Revista Salud Pública y Nutrición.* 2 (4): 1-10.
7. **McDermott, A.P., Mills, J.L., Kirke, P.N., O'Leary, V.B., Swanson, D.A., Pangilinan, M.C., Molly, A.M., Cox, C., Scott, J.M., Brody, L.C.** 2003. Analysis of the MTHFR 1298A-C and 677C-T polymorphisms as risk factors for neural tube defects. *J. Hum Genet.* 48: 190-193.



8. **Blanco, M.J., Lacasaña, M., Garcia, C.R., Borja, V.H., Galavíz, H.C., Aguilar, G.C.** 2007. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and the risk of anencephaly in Mexico. *Mol.Hum. Reprod.* 1-6.
9. **Van der Linden, J., Heil, S., Kouwenberg, I., Heijer, M., Blom, H.** 2007. The methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (MTHFD1) 1598G>A variant is not associated with spina bifida risk in the Dutch population. *Clin Genet.* 72: 599-600.
10. **Northrup, H., Volcik, K.** 2000. Spina Bifida and Other Neural Tube Defects. *Current Probl Pediatric.* 317-332.
11. **Iniesta, R., Guinó, Elisabet., Moreno, V.** Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. 2005. *Gaceta Sanitaria.* 19(4):333-41.
12. **Bernal, J. Zarante, I.** Malformaciones y anomalías congénitas: impacto y futuro. 2009. *Biomédica.* 29 (1):103-107.
13. **Boduroğlu, K., Alanay, Y., Alikashişoğlu, M., Aktaş, D., Tunçbilek, E.** 2005. Analysis of MTHFR 1298A>C in addition to MTHFR 677C>T polymorphism as a risk factor for neural tube defects in the Turkish population. *The Turkish Journal of Pediatrics.* 47: 327-333.
14. **Catala, M.** 2008. Espina Bífida. Section I. Chapter 2. Embryology Applied to Neural Tube Defects (NTDs). 19-42.
15. **Sadler, T.** 2005. Embriology of Neural Tube Development. *American Journal of Medical Genetics.* Part C. 135C: 2-8.
16. **Czeizel, A.E.** Folic Acid- Containing Multivitamins and Primary Prevention of Birth Defects. 2003. *Preventing Nutrition: The Comprehensive Guide for Health Professionals.* Third Edition. Humana Press Inc. Totowa. NJ. Chapter 24. 603-627.



17. **Otalora, B.D., Rostion, A.C.** 2007. Desarrollo embrionario y defectos del cierre del tubo neural. *Revista Pediatría Electrónica*. 4(3): 34-43.
18. **Sharp, L., Little, J.** Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HUGE Review. 2004. *American Journal Epidemiology*. 159 (5): 423 – 443.
19. **Department of State Health Services. Birth Defects Epidemiology and Surveillance.** Birth Defects Risk Factor Series: Neural Tube Defects. 2006. 1-13.
20. **Suarez, F., Ordoñez, A., Zarante, I.** Defectos del tubo neural y ácido fólico: Patogenia, Metabolismo y Desarrollo Embrionológico, Revisión de Literatura. 2010. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 61 (1): 49-60.
21. **Ladher, R., Schoenwolf, G.C.** Making a Neural Induction and Neurulation. 2005. *Developmental Neurobiology*. Fourth Edition. Plenum Publishers. New York. Chapter 1. 1-20.
22. **Gibert, María.** Características Epidemiológicas Preventivas y Metabólicas de los Defectos del Tubo Neural en la Isla de Mallorca. Departament de Pediatria, Obstetricia i Ginecologia i Medicina Preventiva. Universitat Autònoma de Barcelona. Facultat de Medicina. Tesis para optar el grado de Doctora en Medicina y Cirugía. 2003. Barcelona.
23. **Finnell, R., Gould, A., Spiegelstein, O.** 2003. Pathobiology and Genetics of Neural Tube Defects. *Epilepsia*. 44 (3): 14-23.
24. **Vieira, A.R.** Birth order and neural tube defects: a reappraisal. 2004. *Journal of the Neurological Sciences*. 217: 65-72.
25. **Nakatsu, T., Uwabe, C., Shiota, K.** Neural Tube closure in humans initiates at multiple sites: evidence from human embryos and implications



- for the pathogenesis of neural tube defects. 2000. *Anat Embriology*. 201: 455-466.
- 26. Waes, J.G., Finnell, R.H.** 2001. Genetics of Neural Tube Defects. *Seminars in Pediatric Neurology*. 8 (3): 160 -164.
- 27. Otalora, B.D., Rostion, A.C.** 2007. Desarrollo embrionario y defectos del cierre del tubo neural. *Revista Pediatría Electrónica*. 4(3): 34-43.
- 28. Gubert, M.J.** Características Epidemiológicas, Preventivas y Metabólicas de los Defectos del Tubo Neural en la Isla de Mayorca. Departamento de Pediatría, Obstetricia, Ginecología y Medicina Preventiva. Universitat Autònoma de Barcelona. Facultat de Medicina. 2003.
- 29. Brustolin, B., Giugliani, R.** Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. 2010. *Brazilian Journal of Medical and Biological Search*. 43 (1): 1-7.
- 30. Grewal, J., Carmichael, S.L., Song, J., Shaw, G.M.** 2008. Neural tube defects: an analysis of neighbourhood and individual level socio-economic characteristics. *Pediatric and Perinatal Epidemiology*. 23,116-124.
- 31. Acuña, J., Yoon, P., Erickson, D.** Documento para la prevención de los defectos del tubo neural con ácido fólico. 2006. Organización Panamericana de la Salud. Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC).
- 32. Fernandez, N., Zarante, I.** 2008. Prevalencia y escala de pronóstico para malformaciones congénitas en Colombia: La responsabilidad de pediatras y neonatólogos. Registro de 54.397 nacimientos. *Revista UCIN. Asociación Colombiana de Neonatología*. 8 (1): 88-92.



- 33. Botto, L. D., Yang Quanhe.** 5,10-Metthylene tetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies: A HuGE Review. 2000. *American Journal of Epidemiology*. 151(4): 862-877.
- 34. Burke, B., Daniel, K.L., Latimer, A., Mersereau, P., Moran, K., Mullinare, J., Prue, C., Steen, J., Watkins, M.** 2004. Preventing Neural Tube. Birth Defects: A prevention Model and Resources Guide. *The Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*. 149 pgs.
- 35. Ramirez, J.A., Benavides, F.G., Navarro, M.L., Martinez, J.M., Garcia, A.M., Benach, J.** Mortalidad por defectos del tubo neural en Mexico (1980-1997). 2003. *Salud Pública de México*. 45 (5):356-364.
- 36. Lucock, M., Daskalakis, I., Hinkins, M., Yates, Z.** 2001. An Examination of Polymorphic Genes and Folate Metabolism in Mothers Affected by Spina Bifida Pregnancy. *Molecular Genetics and Metabolism*. 73: 322- 332.
- 37. Angeline, T., Jeyaraj, N., Granito, S., Tsongalis, G.** 2004. Prevalence of MTHFR gene polymorphisms (C677T and A1298C) among Tamilians. *Experimental and Molecular Pathology*. 77: 85-88.
- 38. Bhaskar, L., Murthy, J., Venkatesh, B.** 2011. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and orofacial clefts. *Archives of Oral Biology*. 2522: 1-15.
- 39. Wilson, A., Platt, R., Wu, Q., Leclerc, D., Christensen, B., Yang, H., Gravel, R., Rozen, R.** 1999. A common Variant in Methionine Synthase Reductase Combined with Low Cobalamin (Vitamin B12) Increases Risk for Spina Bifida. *Molecular Genetics and Metabolism*. 67: 317-323.
- 40. Richter, B., Stegmann, K., Röper, B., Böddeker, I., Ngo, E.T., Koch, M.C.** 2001. Interaction of folate and homocysteine pathway genotypes evaluated in susceptibility to neural tube defects (NTD) in a German population. *J. Hum Genet*. 46:105-109.



- 41. Bermudez, M., Briceño, Gil, F., Bernal, J.** Homocisteina y Polimorfismos de Cistationina β Sintasa y Metilenetetrahidrofolato Reductasa en población sana de Colombia. 2006. *Colombia Médica*. 37 (1): 46-52.
- 42. Njamshi, A.K., Djientcheu, V. Lekoubou. A., Guemse, M., Obama, M.T. Mbu, R., Takongmo, S., Kago, I.** 2008. Neural tube defects are rare among black Americans but not in sub-Saharan black Africans: The case of Yaounde – Cameroon. *Journal of the Neurological Sciences*. 270: 13 -17.
- 43. Ray, J.G., Vermeulen, M.J., Meier, C., Cole, D.E., Wyatt, P.R.** 2004. Maternal ethnicity and risk of neural tube defects: a population-base study. *Canadian Medical Association or its licensors*. 171 (4): 343-345.
- 44. Gaughan, D., Kluijtmans, L., Barbaux, S., McMasters, D., Young, I., Yarnell, J., Evans, A., Whitehead, A.** 2001. The methionine synthase reductasa (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis*. 157: 451-456.
- 45. Vollset, S.E., Refsum, H., Irgens, L.M., Emblem, B.M., Tverdal, A., Gjessing, H.K.** 2000. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr*. 71: 962-96
- Blom, H., Smulders Y.** Overview oh homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. 2010. *Journal of Inherit Metabolism Disease*. 177-184.
- 46. Blom, H., Smulders Y.** Overview oh homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. 2010. *Journal of Inherit Metabolism Disease*. 177-184.



- 47. Carroll, N., Pangilinan, F., Molloy, A.M., Troendle, J., Mills, J.L., Kirke, P.N., Brody, L.C., Scott, J.M., McDermott, A.P.** 2009. Analysis of the *MTHFD1* promoter and risk of neural tube defects. *J. Hum Genet.* 439-448.
- 48. Carroll, N., Pangilinan, F., Molloy, A.M., Troendle, J., Mills, J.L., Kirke, P.N., Brody, L.C., Scott, J.M., McDermott, A.P.** 2009. Analysis of the *MTHFD1* promoter and risk of neural tube defects. *J. Hum Genet.* 439-448.
- 49. Ordoñez, A., Suárez, F.** Exploración sobre los conocimientos del ácido fólico y sus beneficios en la salud reproductiva en una población universitaria colombiana. 2006. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología.* 57 (4): 271-278.
- 50. Bassuk, A., Kibar, Z.** Genetic Basis of Neural Tube Defects. *Seminars in Pediatric Neurology.* 2009. 16: 101-110.
- 51. Chen, C.** 2008. Síndromes, Disorders and maternal Risk Factors Associated with Neural Tube Defects (I). *Taiwan J Obstet Gynecol.* 47 (1): 1-9.
- 52. De Marco, P., Merello, E., Grazia, M., Mascelli, S., Raso, A., Cama, A., Capra, V.** 2006. Evaluation of a Methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase 1958>A polymorphism for neural tube defect risk. *J. Hum Genet.* 51: 98-103.
- 53. Brody, L., Conley, M., Cox, C., Kirke, P., McKeever, M., Mills, J., Molloy, A., O'Leary, V., Parle-McDermott, A., Scott, J., Swanson, D.** 2002. A Polymorphism, R653Q, in the Trifunctional Enzyme Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase/ Methylenetetrahydrofolate Cyclohydrolase/ Formyltetrahydrofolate Synthetase Is a Maternal Genetic Risk Factor for Neural Tube Defects: Report of the Birth Defects Research Group. *Am. J. Hum. Genet.* 71: 1207-1215.



- 54. Chen, C.** 2009. Unusual Patterns of Neural Tube Defects in a High Risk Region of Northern China. *Biomedical and Environmental Sciences*. 22: 340 – 344.
- 55. Källén, B.** 2004. Use of folic acid supplementation and risk for dizygotic twinning. *Early Human Development*. 80. 143-151.
- 56. Weisberg, I., Tran, P., Christensen, B., Sibani, S., Rozen, R.** 1998. A second Genetic Polymorphism in Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Associated with Decreased Enzyme Activity. *Mol Gen and Metab*. 64: 169-172.
- 57. Kondo, A., Kamihira, O., Ozawa, H.** 2009. Neural Tube Defects: Prevalence, etiology and prevention. *International Journal of Urology*. 16: 46-57.
- 58. Boyles, A., Hammock, P., Speer, M.** Candidate Gene Analysis in Human Neural Tube Defects. 2005. *American Journal of Medical Genetics*. Part C. 135C: 9-23.
- 59. Boyles, A.L., Billups A.v., Deak, K.L., Siegel, D.G., Mehlretter, L., Slifer, S.H., Bassuk, A.G., Klessner, J.A., Reed, M.C., Nijhout, H.F., George, T.M., Enterline, D.S., Gilbert, J.R., Speer, M.C. and the NTD Collaborative Group.** Neural Tube Defects and Folate Pathway Genes: Family Based Association Tests of Gene-Gene and Gene-Environment Interactions. 2006. *Environmental Health Perspectives*. 114 (10): 1547-1552.
- 60. Van der Linden, I., Afman, L., Heil, S., Blom, H.** 2006. Genetic variation in genes of folate metabolism and neural-tube defect risk. *Proceedings of the Nutrition Society*. 65: 204-215.
- 61. Liu, S., West, R., Randell, E., Longerich, L., O'Connor, K., Scott, H., Crowley, M., Lam, A., Prabhakaran, V., McCourt, C.** A comprehensive



evaluation of food fortification with folic acid for the primary prevention of neural tube defects. 2004. *Pregnancy and Childbirth*. 4 (20): 1-10.

- 62. Hol, F., Van der Put, N., Geurds, M., Heil, S., Trijbels, F., Hamel, B., Mariman, E., Blom, H.** Molecular genetic analysis of the gene encoding the trifunctional enzyme MTHFD (Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase) in patients with neural tube defects. 1998. *Clin Genet*. 53: 119-125.
- 63. López, C.J., Castilla, E. Orioli, I.M, INAGEMP., ECLAMC.** Folic Acid Flour Fortification: Impact on the frequencies of 52 Congenital Anomaly Types in Three South American Countries. 2010. *American Journal of Medical Genetics*. Part A. 152A:2444-2458.
- 64. McDermott, A., Kirke, P., Mills, J., Molloy, A., Cox, C., O'Leary, V., Pangilinan, F., Conley, M., Cleary, L., Brody, L., Scott, J.** Confirmation of the R653Q polymorphism of the trifunctional C1-synthase enzyme as a maternal risk for neural tube defects in the Irish population. 2006. *European Journal of Human Genetics*. 14: 768-772.
- 65. Johnson, W., Stenroos, E., Health, S., Chen, Y., Carroll, R., McKoy, V., Chatkupt, S., Lehner, T.** 1999. Distribution of Alleles of the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T Gene Polymorphisms in Familial Spina Bifida. *American Journal of Medical Genetics*. 87: 407-412.
- 66. Molloy, A., Brody, L., Mills, J., Scott, J., Kirke, P.** 2009. The Search for Genetic Polymorphisms in the Homocysteine/Folate Pathway that Contribute to the Etiology of Human Neural Tube Defects. *Birth Defects Research*. Part A. 85: 285-294.
- 67. Christensen, B., Arbour, L., Tran, P., Leclerc, D., Sabbaghian, N., Platt, R., Gilfix, B., Rosenblatt, D., Gravel, A., Forbes, P., Rozen, R.** 1999. Genetic Polymorphisms in Methylenetetrahydrofolate Reductase



and Methionine Synthase, Folate Levels in Red Blood Cells, and Risk of Neural Tube Defects. *American Journal of Medical Genetics*. 84:151-157.

68. Castilla, E., Orioli, I., López, J.S., Dutra, M., Nazer, J. Preliminary Data on Changes in Neural Tube Defect Prevalence Rates After Folic Acid Fortification in South America.

69. Bower, C., Ryan, A., Rudy, E., Miller, M. 2002. Trends in neural tube defects in Western Australia. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*. 26 (2): 150- 151.

70. Gengiz, B., Söylemez, F., Öztürk, E., Çavdar, A. 2004. Serum Zinc, Selenium, Copper and Lead Levels in Women with Second-Trimester Induced Abortion Resulting from Neural Tube Defects. A preliminary Study. *Biological Trace Elements Research*. 97: 225 – 235.

71. Martinez, C., Northrup, H., Lin, J., Morrison, A., Fletcher, J., Tyerman, G., Au, K. 2009. Genetic association study of putative functional single nucleotide polymorphisms of genes in folate metabolism and spina bifida. *American Journal of Obstetrics Gynecology*. 201: 394 1-11.

72. Volcik, K., Shaw, G., Zhu, H., Lammer, E., Laurent, C., Finnell, R. 2003. Associations between Polymorphisms within the Thymidylate Synthase Gene and Spina Bifida. *Birth Defects Research. Part A*. 67:924-928.

73. Shaw, G., Lu, W., Zhu, H., Yang, W., Briggs, F., Carmichael, S., Barcellos, L., Lammer, E., Finnell, R. 2009. 118 SNPs of folate-related genes and risk of spina bifida and conotruncal heart defects. *BMC Medical Genetics*. 10 (49): 1-11.

74. Ayala, C., Garcia, R., Cruz, E., Prieto, K., Bermudez, M., Niveles de homocisteína y polimorfismos de los genes de la MTHFR y la CBS en



pacientes colombianos con trombosis venosa superficial y profunda. 2010. *Biomedica*. 30: 259-67.

- 75. Gonzalez, H, L., Garcia, G., Castillo, Z, I., Canto, J., Ceballos, J., Pinto, D., Diaz, F., Del Angel, R., Orozco, L.** 2002. Frequency of the thermolabile variant C677T in the MTHFR gene and lack of association with neural tube defects in the State of Yucatán, Mexico. *Clin. Genet*. 62: 394-398.
- 76. Castro, R., Ravasco, P., Camila, M., Jakobs, C., Blom, H., Almeida, I.** 2004. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T and 1298A>C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J. Med Genetic*. 41: 454-458.
- 77. Shields, D., Kirke, P., Mills, J., Ramsbotton, D., Molloy, A., Burke, H., Weir, D., Scott, J., Whitehead, A.** 1999. The "Thermolabile" Variant of Methylenetetrahydrofolate Reductase and Neural Tube Defects: An Evaluation of Genetic Risk and the Relative Importance of the Genotypes of the Embryo and the mother. *Am. J. Hum. Genet*. 64: 1045-1055.
- 78. Rosenberg, N., Murata, M., Ikeda, Y., Opare-Sem, O., Zivelin, A., Geffen, E., Seligsohn, U.** The frequent 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism Is Associated with a Common Haplotype in Whites, Japanese, and Africans. 2002. *American Journal Human Genetics*. 70:758-762.
- 79. Cunha, A., Hirata, M., Kim, Chong., Guerra, E., Nonoyama, K., Hirata, R.** 2002. Metabolic effects of C677T and A1298C mutations at the MTHFR gene in Brazilian children with neural tube defects. *Clinica Chimica Acta* 318. 139-143.
- 80. Van der put, N., Gabreëls, F., Stevens, E., Smeitink, J., Trijbels, F., Eskes, T., Van der Heuvel, L., Blom, H.** 1998. A second Common Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: An



- additional Risk Factor for Neural Tube Defects? *American Journal Human Genetics*. 62: 1044-1051.
- 81. Chen, C.** 2008. Syndromes, Disorders and Maternal Risk Factors Associated with Neural Tube Defects (III). *Taiwan Journal Obstetrician Gynecology*. 47 (2): 131-140.
- 82. Doolin, M., Barbaux, S., Hoess, K., Whitehead, A., Mitchell, L.** 2002. Maternal Genetic Effects, Exerted by Genes involved in Homocysteine Remethylation, Influence the Risk of Spina Bifida. *American Journal of Human Genetics*. 71: 1222-1226.
- 83. Zhu, H., Curry, S., Wen, S., Wicker, N., Shaw, G., Lammer, E., Yang, W., Jafarov, T., Finnell, R.** Are the Betaine-Homocysteine Methyltransferase (BHMT and BHMT2) Genes Risk Factors for Spina Bifida and Orofacial Clefts?. 2005. *American Journal of Medical Genetics*. 135A: 274-277.
- 84. Pajares, M.A., Sala, P.D.** Betaine Homocysteine S-methyltransferase: just a regulator of homocysteine metabolism? 2006. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 63: 2792-2803.
- 85. Morin, I., Platt, R., Weisberg, I., Sabbaghian, N., Wu, Q., Garrow, T., Rozen, R.** Common variant in Betaine-Homocysteine Methyltransferase (BHMT) and Risk for Spina Bifida. 2003. *American Journal of Medical Genetics*. 119A: 172-176.
- 86. Van der Linden, I., Heijer, M., Afman, L., Gellekink, H., Vermeulen, S., Kluijtmans, L., Blom, H.** 2006. The methionine synthase reductasa 66A>G polymorphism is a maternal risk factor for spina bifida.
- 87. Gutiérrez, J.I., Perez, F., Tamparillas, M.** 2003. Defectos del tubo neural y gen *Cistationina β-sintasa*. *Prog Obstet Ginecol*. 43 (11): 495 – 501.



- 88. Papapetrou, C., Lunch, S., Burn, J., Edwards, Y.** 1996. Methylenetetrahydrofolate reductase mutation and neural tube defects. *The Lancet*. 348: 58.
- 89. Prieto, K., Garcia, R., Bernal, J., Bermudez, M.** Análisis descriptivo de los niveles de homocisteína, polimorfismos C699T, C1080T y 844Ins68pb de la CBS, C677T de la MTHFR y otros factores de riesgo cardiovascular en una población colombiana con síndrome coronario agudo. 2009. *Universitas Médica*. 50 (3): 322-334.
- 90. Chen, C.** 2007. Chromosomal Abnormalities Associated with Neural Tube Defects (I). Full Aneuploidy. *Taiwan Journal Obstetrics Gynecology*. 46 (4): 325 – 335.
- 91. Houcher, B., Bourouba, R., Djabi, F., Yilmaz, E., Eğin, Y., Akar, N.** 2009. Polymorphisms of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase and Cystathionine β Synthase Genes as a Risk Factor for Neural Tube Defects in Sétif, Algeria. *Pediatric Neurosurgery*. 45: 472-477.
- 92. Parle-McDermott, A., Pangilinan, F., Mills, J., Signore, C., Molloy, A., Cotter, A., Conley, M., Cox, C., Kirke, P., Scott, J., Brody, L.** 2005. A polymorphism in the *MTHFD1* gene increases a mother's risk of having an unexplained second trimester pregnancy loss. *Mol. Hum. Reprod*. 11 (7): 477-480.
- 93. Ueland, P., Rozen, R.** MTHFR Polymorphisms and Disease. 2005. Medical Intelligence Unit. Landes Bioscience. 1-207.
- 94. Daválos, I., Olivares, N., Castillo, M., Cantú, J., Ibarra, B., Sandival, L., Morán, M., Gallegos, M., Chakraborty, R., Rivas, F.** 2000. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defects parents, control mestizo and native populations. *Annales de Génétique*. 43: 89-92.



- 95. Chen, C.** 2008. Syndromes, Disorders and Maternal Risk Factors Associated with Neural Tube Defects (II). *Taiwan Journal Obstetrician Gynecology*. 47 (1): 10-17.
- 96. O'Leary, V., Mills, J., Pangilinan, F., Kirke, P., Cox, C., Conley, M., Weiler, A., Peng, K., Shane, B., Scott, J., McDermott, A., Molloy, A., Brody, L.** 2005. Analysis of methionine synthase synthase reductase polymorphisms for neural tube defects risk association. *Molecular Genetics and Metabolism*. 85: 220-227.
- 97. Van der Put, N., Steegers-Theunissen, R., Frosst, P., Trijbels, F., Eskes, T., Van den Heuvel, L., Mariman, E., Den Heyer, M., Rozen, R., Blom, H.** 1995. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *The Lancet*. 346: 1070-1071.
- 98. Kirke, P., Mills, J., Whitehead, A., Molloy, A., Scott, J.** 1996. Methylenetetrahydrofolate reductase mutation and neural tube defects. *The Lancet*. 348: 1037-1038.
- 99. Harris, M.** 2001. Why are the genes that cause risk of human neural tube defects so hard to find? *Teratology*. 63: 165-166.
- 100. Goyette, P., Frosst, P., Rosenblatt, D., Rozen, R.** 1995. Seven Novel Mutations in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Genotype/Phenotype Correlations in Severe Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 56: 1052-1059.
- 101. Friso, S., Woon, S., Girelli, D., Mason, J., Dolnikowski, G., Bagley, P., Olivieri, O., Jacques, P., Rosenberg, I., Corrocher, R., Selhub, J.** 2002. A common mutation in the 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *PNAS*. 99 (8): 5606-5611.



102. **Adzick, N., Tom, E., Spong, C., Brock, J., Burrows, P., Johnson, M, Howell, L., Farrell, J., Dabrowiak, M., Sutton, L., Gupta, N., Tulipan, N., D'Alton, M., Farmer, D.** 2011. A Randomized Trial of Prenatal versus Postnatal Repair of Myelomeningocele? *The New England Journal of Medicine*. 1-12.
103. **Johnson, W., Stenroos, E., Health, S., Chen, Y., Carroll, R., McKoy, V., Chatkupt, S., Lehner, T.** 1999. Distribution of Alleles of the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T Gene Polymorfisms in Familial Spina Bifida. *American Journal of Medical Genetics*. 87: 407-412.
104. **Polski, J., Kimzey, S., Percival, R., Grosso, L.** 1998. Rapid and effective processing of blood specimens for diagnostic PCR using filter paper and Chelex-100. *Journal of Clinical Pathology*. 51: 215-217.
105. <http://www.anomaliascongenitas.org>
106. http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi
107. <http://tools.neb.com/REBsites/index.php>.
108. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi>
109. <http://genepop.curtin.edu.au>



11. ANEXOS

ANEXO No 1



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENETICA HUMANA**

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“SEGUIMIENTO MÉDICO, DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS DE ENZIMAS DE ÁCIDO FÓLICO, EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE VIDA FAMILIAR Y APLICACIÓN DE LA ESTRATEGIA DE CUIDADO CENTRADO EN FAMILIA EN PACIENTES CON DEFECTOS DE TUBO NEURAL Y TALIPES”

Usted está invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por el Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana.

Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio: (a) Su participación y la de su hijo(a) en este estudio es totalmente voluntaria. (b) NO PODEMOS GARANTIZARLE Y NO LE GARANTIZAMOS O PROMETEMOS QUE USTED O SU HIJO(A) RECIBIRAN ALGUN BENEFICIO DE ESTE ESTUDIO. Sin embargo, esta investigación nos permitirá evaluar el estado físico, la calidad de vida familiar y el papel de los polimorfismos de las enzimas que interactúan con los Defectos de Tubo Neural, de manera que los beneficios posteriores sean para usted, su familia u otros individuos afectados. (c) Usted puede retirarse del estudio cuando lo desee. La revocación de este consentimiento no tendrá perjuicio alguno sobre la relación médico-paciente ni consecuencia alguna en la calidad de atención médica que se le suministre. (d) Ninguna persona involucrada en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación. (e) Este estudio no tiene ningún interés económico por parte nuestra o de las instituciones colaboradoras. (f) Participar en este estudio no tiene ningún costo para usted. (g) CONFIDENCIALIDAD: Los registros con la información de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Genética Humana. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de investigación tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos. (h) La naturaleza de este estudio, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información importante está resumida a continuación y será explicada por el grupo investigador. Si tiene algún interrogante sobre el



estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas. (i) No hay ningún procedimiento o protocolo alterno al propuesto por este estudio. Su alternativa es no participar en el mismo. (j) Si cualquier complicación se presenta durante la investigación, los investigadores lo ayudaran a obtener el tratamiento médico adecuado, pero este estudio no le suministrará ayuda financiera para costos médicos y no médicos adicionales. (k) Al firmar esta forma usted no está renunciando a sus derechos en caso de que se le cause un daño personal.

Para mayor información, por favor llame en Colombia al 5946161 ext. 2471 o escriba en Colombia al Comité de Investigaciones y Ética Facultad de Medicina Pontificia Universidad Javeriana y del Hospital Universitario San Ignacio Carrera 7ª No. 40-62 apartado 56710. Adicionalmente, si usted no está satisfecho con la forma como se está conduciendo este estudio o tiene otras preguntas concernientes a sus derechos como participante del estudio, por favor contacte al mismo Comité en los teléfonos y dirección mencionados antes.

EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL INDIVIDUO

OBJETIVO: Realizar el seguimiento de pacientes con Defectos de Tubo Neural incluidos en las bases de datos del Instituto de Genética Humana o el programa de Vigilancia en Salud Pública de Malformaciones Congénitas, a través de la valoración médica, escala de calidad de vida familiar, un programa de cuidado centrado en la familia y la evaluación de polimorfismos de enzimas relacionadas con el metabolismo del ácido fólico.

PROCEDIMIENTO: Se realizará una entrevista clínica con usted a su hijo(a), llenaran un formato de calidad de vida familiar, participaran en un programa de cuidado centrado en familia y se le tomará una muestra, de 2-5 mililitros de sangre (menos de una cucharadita). La toma de la muestra será realizada por personal especializado. Su vinculación al proyecto será de algunos minutos.

RIESGOS E INCOMODIDADES: La participación en este estudio representa riesgo mínimo para la salud e integridad de su hijo(a) y las molestias y efectos adversos estarán representados exclusivamente por la toma de muestras referida en el procedimiento que pueden incluir dolor mínimo, infecciones, sangrado y/o hematomas (morados).

BENEFICIOS ADICIONALES: Este estudio tiene para usted o su hijo(a) (los) siguiente(s) beneficio(s) adicional(es): Ninguno.

RESPONSABILIDAD DEL PACIENTE Y PRECAUCIONES: Al tomar parte de este estudio es importante que usted contemple las siguientes responsabilidades y precauciones: Debe seguir las indicaciones y tratamientos de su médico.

MANEJO DE RESULTADOS: Los resultados de las pruebas serán facilitados a usted si así lo desea.

OTRA INFORMACIÓN PERTINENTE: En el curso del estudio se le suministrará a usted cualquier tipo de información nueva, derivada de éste, que pueda modificar su participación en el mismo. Las muestras en ningún momento serán utilizados con fines distintos a la



investigación. Usted podrá, en el momento que lo desee, retirar las muestras del almacenamiento y/o obtener información sobre su uso posterior. A discreción del investigador principal, en cualquier momento, cualquier voluntario puede ser retirado del estudio.

Si usted cree que ha sufrido una lesión relacionada con la investigación o desea cualquier información adicional, por favor llame a el Dr. Ignacio Zarante MD., MsC. al Tel 3208320, Ext. 2798, Instituto de Genética Humana. Pontificia Universidad Javeriana.

AUTORIZACIÓN: La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la entidad anteriormente mencionada. Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Usted tiene el derecho a no permitir que sus tejidos (células de la sangre) sean estudiados inmediatamente o guardados para estudios en el futuro. Usted se puede retirar del estudio en cualquier momento. Los investigadores podrán guardar las muestras como parte del tratamiento clínico rutinario sin que éstas sean incluidas en la investigación. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio de investigación.

Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla en las situaciones señaladas a continuación:

- | | | |
|--|----|----|
| ○ En estudios complementarios de diagnóstico para mí o algún miembro de mi familia : | Si | No |
| ○ En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación: | Si | No |
| ○ En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación: | Si | No |
| ○ En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato mis datos de identificación. | Si | No |



AUTORIZACION PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO: Identificación de los polimorfismos de las enzimas de ácido fólico en pacientes con Defectos de Tubo Neural. Caso Control

Yo, _____ identificado con documento de identificación: No. _____ de _____, autorizo la toma de la muestra de sangre periférica a mi hijo(a) _____, con el fin de realizar los análisis pertinentes a este estudio. Así mismo, declaro que se me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se le dará al material de muestra. **Fecha:**

Paciente, Acudiente, Representante legal

Testigo

Testigo

Investigador

Forma aprobada por el Comité de Investigaciones y Ética de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana y del Hospital Universitario San Ignacio.



ANEXO No 2



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENETICA HUMANA**

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“SEGUIMIENTO MÉDICO, DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS DE ENZIMAS DE ÁCIDO FÓLICO, EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE VIDA FAMILIAR Y APLICACIÓN DE LA ESTRATEGIA DE CUIDADO CENTRADO EN FAMILIA EN PACIENTES CON DEFECTOS DE TUBO NEURAL Y TALIPES”

Usted está invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por el Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana.

Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio: (a) Su participación y la de su hijo(a) en este estudio es totalmente voluntaria. (b) **NO PODEMOS GARANTIZARLE Y NO LE GARANTIZAMOS O PROMETEMOS QUE USTED O SU HIJO(A) RECIBIRAN ALGUN BENEFICIO DE ESTE ESTUDIO.** Sin embargo, esta investigación nos permitirá evaluar el estado físico, la calidad de vida familiar y el papel de los polimorfismos de las enzimas que interactúan con los Defectos de Tubo Neural, de manera que los beneficios posteriores sean para usted, su familia u otros individuos afectados. (c) Usted puede retirarse del estudio cuando lo desee. La revocación de este consentimiento no tendrá perjuicio alguno sobre la relación médico-paciente ni consecuencia alguna en la calidad de atención médica que se le suministre. (d) Ninguna persona involucrada en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación. (e) Este estudio no tiene ningún interés económico por parte nuestra o de las instituciones colaboradoras. (f) Participar en este estudio no tiene ningún costo para usted. (g) **CONFIDENCIALIDAD:** Los registros con la información de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Genética Humana. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de investigación tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos. (h) La naturaleza de este estudio, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información importante está resumida a continuación y será explicada por el grupo investigador. Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas. (i) No hay ningún procedimiento o protocolo alterno al



propuesto por este estudio. Su alternativa es no participar en el mismo. (j) Si cualquier complicación se presenta durante la investigación, los investigadores lo ayudaran a obtener el tratamiento médico adecuado, pero este estudio no le suministrará ayuda financiera para costos médicos y no médicos adicionales. (k) Al firmar esta forma usted no está renunciando a sus derechos en caso de que se le cause un daño personal.

Para mayor información, por favor llame en Colombia al 5946161 ext. 2471 o escriba en Colombia al Comité de Investigaciones y Ética Facultad de Medicina Pontificia Universidad Javeriana y del Hospital Universitario San Ignacio Carrera 7ª No. 40-62 apartado 56710. Adicionalmente, si usted no está satisfecho con la forma como se está conduciendo este estudio o tiene otras preguntas concernientes a sus derechos como participante del estudio, por favor contacte al mismo Comité en los teléfonos y dirección mencionados antes.

EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL INDIVIDUO

OBJETIVO: Realizar el seguimiento de pacientes con Defectos de Tubo Neural incluidos en las bases de datos del Instituto de Genética Humana o el programa de Vigilancia en Salud Pública de Malformaciones Congénitas, a través de la valoración médica, escala de calidad de vida familiar, un programa de cuidado centrado en la familia y la evaluación de polimorfismos de enzimas relacionadas con el metabolismo del ácido fólico.

PROCEDIMIENTO: Se realizará una entrevista clínica con usted a su hijo(a), llenaran un formato de calidad de vida familiar, participaran en un programa de cuidado centrado en familia y se le tomará una muestra, de 2-5 mililitros de sangre (menos de una cucharadita). La toma de la muestra será realizada por personal especializado. Su vinculación al proyecto será de algunos minutos.

RIESGOS E INCOMODIDADES: La participación en este estudio representa riesgo mínimo para la salud e integridad de su hijo(a) y las molestias y efectos adversos estarán representados exclusivamente por la toma de muestras referida en el procedimiento que pueden incluir dolor mínimo, infecciones, sangrado y/o hematomas (morados).

BENEFICIOS ADICIONALES: Este estudio tiene para usted o su hijo(a) (los) siguiente(s) beneficio(s) adicional(es): Ninguno.

RESPONSABILIDAD DEL PACIENTE Y PRECAUCIONES: Al tomar parte de este estudio es importante que usted contemple las siguientes responsabilidades y precauciones: Debe seguir las indicaciones y tratamientos de su médico.

MANEJO DE RESULTADOS: Los resultados de las pruebas serán facilitados a usted si así lo desea.

OTRA INFORMACIÓN PERTINENTE: En el curso del estudio se le suministrará a usted cualquier tipo de información nueva, derivada de éste, que pueda modificar su participación en el mismo. Las muestras en ningún momento serán utilizados con fines distintos a la investigación. Usted podrá, en el momento que lo desee, retirar las muestras del almacenamiento y/o obtener información sobre su uso posterior. A discreción del investigador



principal, en cualquier momento, cualquier voluntario puede ser retirado del estudio.

Si usted cree que ha sufrido una lesión relacionada con la investigación o desea cualquier información adicional, por favor llame a el Dr. Ignacio Zarante MD., MsC. al Tel 3208320, Ext. 2798, Instituto de Genética Humana. Pontificia Universidad Javeriana.

HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN IGNACIO

AUTORIZACION PARA EL USO DE LAS MUESTRAS E INCLUSION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO: **Identificación de los polimorfismos de las enzimas de ácido fólico en pacientes con Defectos de Tubo Neural.**

Caso Control

Yo, _____ identificado con documento de identificación: No. _____ de _____, autorizo la utilización de las muestras residuales de uno de los rodetes de sangre que ya le ha sido tomado al nacer, a mi hijo(a) _____ para la prueba de TSH neonatal y de la muestra de sangre periférica, tomada por parte del personal del Hospital Universitario San Ignacio, con el fin de realizar los análisis pertinentes a este estudio. Así mismo, declaro que se me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se le dará al material de muestra.

Fecha: _____

Paciente, Acudiente, Representante legal

Testigo

Testigo

Investigador

Forma aprobada por el Comité de Investigaciones y Ética de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana y del Hospital Universitario San Ignacio.



AUTORIZACIÓN: La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la entidad anteriormente mencionada. Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Usted tiene el derecho a no permitir que sus tejidos (células de la sangre) sean estudiados inmediatamente o guardados para estudios en el futuro. Usted se puede retirar del estudio en cualquier momento. Los investigadores podrán guardar las muestras como parte del tratamiento clínico rutinario sin que éstas sean incluidas en la investigación. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio de investigación.

Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla en las situaciones señaladas a continuación:

- | | | |
|--|----|----|
| ○ En estudios complementarios de diagnóstico para mí o algún miembro de mi familia : | Si | No |
| ○ En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación: | Si | No |
| ○ En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación: | Si | No |
| ○ En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato mis datos de identificación. | Si | No |



ANEXO No 3

EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE TOTAL CON EDTA

1. Agitar suavemente el tubo para homogenizar su contenido.
2. Añadir 1 mL de sangre a un tubo estéril que contiene 3 mL de solución de lisis celular (Cell Lysis Solution). Agitar la mezcla suavemente por inversión, para mantener la integridad de las células sanguíneas nucleadas.
3. Incubar durante 10 minutos a 22° - 24°C, invirtiendo el tubo esporádicamente cada tres o cinco minutos.
4. Trascurrido el tiempo de incubación, realizar la centrifugación de las muestras durante 3 minutos a 13.000 – 16.000g hasta visualizar el sobrenadante proteico rojizo constituido principalmente por hemoglobina y el pellet blanquecino de células nucleadas sanguíneas.
5. Posteriormente, remover todo el sobrenadante posible evitando el contacto con el pellet que suele estar suelto, con el fin de remover la mayoría de la hemoglobina circulante que puede interferir en la calidad del material genético obtenido.
6. Mezclar el precipitante restante obtenido en el tubo con la ayuda de un vortex, para resuspender las células blancas del pellet.
7. Seguido a esto, es añadir 1 mL de solución de lisis nuclear (Nuclei Lysis Solution) y mezclar con vortex para contribuir a lisar las células nucleadas.
8. Añadir 100 mL solución precipitante de proteínas (Protein Precipitation Solution) a la muestra, para que al ser mezclado con vortex logre precipitar las proteínas remanentes mediante el uso de sales.



9. Centrifugar las muestras durante 3 minutos a 13.000 – 16.000g y una vez transcurrido el tiempo, visualizar un pellet rojizo precipitado en el fondo del tubo.
10. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo de microcentrifuga de 1.5 mL que contiene 1 mL de isopropanol y mezclar suavemente por inversión hasta visualizar la formación de la malla de ADN precipitado.
11. Realizar centrifugación de las muestras durante 10 minutos a 13.000 – 16.000g, con el fin de precipitar el ADN en el fondo del tubo y una vez concluida la centrifugación, eliminar el sobrenadante por decantación.
12. Agregar al ADN obtenido, 300 μ L de etanol al 70% con el fin de lavar el ADN precipitado mediante la inversión del tubo.
13. Aspirar el etanol al 70% con una pipeta Pasteur estéril, evitando arrastrar el pellet de ADN.
14. Realizar secado y fijación del ADN en el fondo del tubo, invirtiéndolo y dejándolo secar en papel absorbente durante 10-15 minutos.

Posterior al secado de las muestras, añadir 100 μ L de solución de rehidratación (ADN Rehydration Solution (Tris HCl 10 mM a pH 7.4 y EDTA 1mM a pH 8.0)) e incubar durante 1 hora a 65 °C o durante toda la noche a 22° - 24°C.
15. Almacenar a 2° - 8°C el ADN hasta su procesamiento ulterior.

Wizard® Genomic DNA Purification Kit

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1120, A1123, A1125 AND A1620.

**Quick
PROTOCOL**

Isolation of Genomic DNA from Whole Blood

| Sample Size | Lysis Solution | | Protein Precipitation | | DNA Rehydration |
|-------------|----------------|--------|-----------------------|-------------|-----------------|
| | Cell | Nuclei | Solution | Isopropanol | Solution |
| 300µl | 900µl | 300µl | 100µl | 300µl | 100µl |
| 1ml | 3ml | 1ml | 330µl | 1ml | 150µl |
| 3ml | 9ml | 3ml | 1ml | 3ml | 250µl |
| 10ml | 30ml | 10ml | 3.3ml | 10ml | 800µl |

As little as 20µl can be processed with this system. Please see Technical Manual #TM060, Section 3.C.

Red Blood Cell Lysis

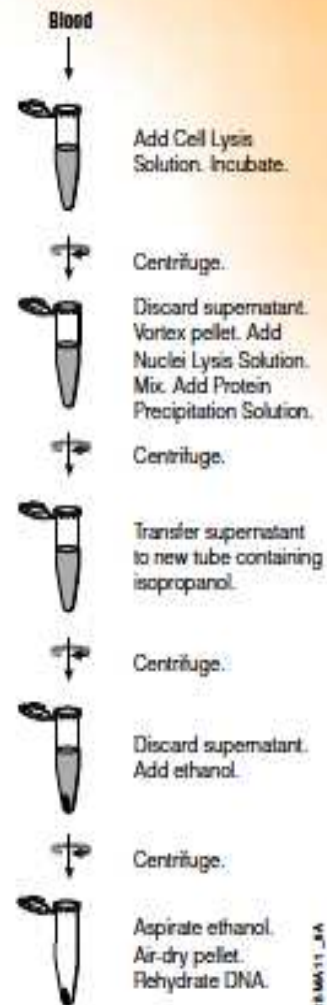
- Using volumes from the table above, combine the appropriate volumes of Cell Lysis Solution and blood. Mix by inversion.
- Incubate for 10 minutes at room temperature.
- Centrifuge:
 - ≤300µl sample 13,000–16,000 × g^{*}; 20 seconds
 - 1–10ml sample 2,000 × g; 10 minutes
- Discard supernatant. Vortex pellet.

Nuclei Lysis and Protein Precipitation

- Using volumes from the table above, add Nuclei Lysis Solution and mix by inversion.
- Add Protein Precipitation Solution; vortex for 20 seconds.
- Centrifuge:
 - ≤300µl sample 13,000–16,000 × g^{*}; 3 minutes
 - 1–10ml sample 2,000 × g; 10 minutes

DNA Precipitation and Rehydration

- Transfer supernatant to a new tube containing isopropanol (using volumes from table above). Mix.
- Centrifuge:
 - ≤300µl sample 13,000–16,000 × g^{*}; 1 minute
 - 1–10ml sample 2,000 × g; 1 minute
- Discard supernatant. Add 70% ethanol (same volume as isopropanol).
- Centrifuge as in Step 9.
- Aspirate the ethanol and air-dry the pellet (10–15 minutes).
- Rehydrate the DNA in the appropriate volume of DNA Rehydration Solution for 1 hour at 65°C or overnight at 4°C.



8 87584411_04
© 2011



ANEXO No 4

EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE GOTAS DE SANGRE EN PAPEL FILTRO

1. Colocar los discos de papel de filtro impregnados con gotas de sangre en tubos de microcentrífuga estériles.
2. Adicionar 500 μ L de agua estéril a cada tubo que contiene cada una de las muestras.
3. Mezclar las muestras en un vortex a temperatura ambiente por 10 minutos.
4. Posterior a la homogenización de las muestras en el agua, remover el sobrenadante a otro tubo estéril y adicionar 200 μ L de Chelex-100 al 5% (*BioRad Laboratories, California, USA*).
5. Incubar los tubos en un termociclador o bloque térmico a 56°C por 90 minutos.
6. Posterior a la incubación, mezclar los tubos e incubar nuevamente a 90°C por 10 minutos.
7. Dejar enfriar los tubos y centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos.
8. Retirar el sobrenadante en un tubo nuevo estéril y almacenar el ADN en refrigeración (2° - 8°C) hasta su utilización.



ANEXO 5

PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN POLIMORFISMOS ASOCIADOS CON LOS DTN

- Protocolo de amplificación MTHFR C677T

| Condiciones Master Mix | 1X |
|-----------------------------------|---------------------|
| Buffer 5 X | 2.5 µL |
| MgCl ₂ (25 mM) | 1.5 µL |
| dNTPs (2 mM) | 0.5 µL |
| Primer A (677A) (10 mM) | 0.5 µL |
| Primer B (677B) (10 mM) | 0.5 µL |
| Taq Polimerasa (<i>Promega</i>) | 0.5 µL |
| Agua | 17 µL |
| ADN (44 ng/µL) | 2 µL |
| Volumen final de reacción | 25 µL |
| Fragmento esperado | 198 pb |
| Condiciones Termociclador | □C Tiempo |
| Denaturación inicial | 95□C 4' |
| Ciclos | 35 ciclos |
| Denaturación | 95□C 30'' |
| Anillamiento | 62□C 60'' |
| Elongación | 72□C 30'' |
| Elongación final | 72□C 7' |
| ∞ | 4□C ∞ |
| Condiciones Electroforesis | Verificación |
| Gel | Agarosa 1% |
| Producto PCR | 7 µL |
| Buffer de carga | 4 µL |
| Voltaje | 120V |
| Tiempo | 30' |



- **Protocolo de amplificación MTHFR A1298C**

| Condiciones Master Mix | 1X |
|-----------------------------------|--|
| Buffer 5 X | 4 μ L |
| MgCl ₂ (25 mM) | 2.5 μ L |
| dNTPs (2 mM) | 1 μ L |
| Primer A (1298F) (5 mM) | 2 μ L |
| Primer B (1298R) (5 mM) | 2 μ L |
| Taq Polimerasa (<i>Promega</i>) | 0.25 μ L |
| Agua | 5.25 μ L |
| DMSO | 1 μ L |
| ADN (44 ng/ μ L) | 2 μ L |
| Volumen final de reacción | 25 μ L |
| Fragmento esperado | 241 pb |
| Condiciones Termociclador | \squareC Tiempo |
| Denaturación inicial | 95 \square C 4' |
| Ciclos | 35 ciclos |
| Denaturación | 95 \square C 30" |
| Anillamiento | 61 \square C 60" |
| Elongación | 72 \square C 30" |
| Elongación final | 72 \square C 7' |
| ∞ | 4 \square C ∞ |
| Condiciones Electroforesis | Verificación |
| Gel | Agarosa 1% |
| Producto PCR | 7 μ L |
| Buffer de carga | 4 μ L |
| Voltaje | 120V |
| Tiempo | 30' |



- **Protocolo de amplificación CBS ins68pb.**

| Condiciones Master Mix | 1X |
|-----------------------------------|-----------------------|
| Buffer 5 X | 2 μ L |
| MgCl ₂ (25 mM) | 1.2 μ L |
| dNTPs (2 mM) | 2 μ L |
| Primer A (295) (10 mM) | 1 μ L |
| Primer B (296) (10 mM) | 1 μ L |
| Taq Polimerasa (<i>Promega</i>) | 0.2 μ L |
| Agua | 10.6 μ L |
| ADN (44 ng/ μ L) | 2 μ L |
| Volumen final de reacción | 20 μ L |
| Fragmento esperado | WT 805pb INS 873pb |
| Condiciones Termociclador | □C Tiempo |
| Denaturación inicial | 94□C 2' |
| Ciclos | 35 ciclos |
| Denaturación | 94□C 10'' |
| Anillamiento | 66□C 25'' |
| Elongación | 72□C 30'' |
| Elongación final | 72□C 5' |
| ∞ | 4□C ∞ |
| Condiciones Electroforesis | Verificación |
| Gel | Agarosa 1% |
| Producto PCR | 7 μ L |
| Buffer de carga | 4 μ L |
| Voltaje | 100V |
| Tiempo | 60' |



- **Protocolo de amplificación CBS C699T**

| Condiciones Master Mix | 1X |
|-----------------------------------|---|
| Buffer 5 X | 3.1 μ L |
| MgCl ₂ (25 mM) | 1.5 μ L |
| dNTPs (2 mM) | 3.1 μ L |
| Primer A (699A) (10 mM) | 0.5 μ L |
| Primer B (699B) (10 mM) | 0.5 μ L |
| Taq Polimerasa (<i>Promega</i>) | 0.2 μ L |
| Agua | 14.1 μ L |
| ADN (44 ng/ μ L) | 2 μ L |
| Volumen final de reacción | 25 μ L |
| Fragmento esperado | 289 pb |
| Condiciones Termociclador | \squareC Tiempo |
| Denaturación inicial | 95 \square C 3' |
| Ciclos | 35 ciclos |
| Denaturación | 92 \square C 60'' |
| Anillamiento | 64 \square C 60'' |
| Elongación | 72 \square C 30'' |
| Elongación final | 72 \square C 7' |
| ∞ | 4 \square C ∞ |
| Condiciones Electroforesis | Verificación |
| Gel | Agarosa 1% |
| Producto PCR | 7 μ L |
| Buffer de carga | 4 μ L |
| Voltaje | 120V |
| Tiempo | 45' |



- **Protocolo de amplificación MTRR A66G**

| Condiciones Master Mix | 1X |
|-----------------------------------|---|
| Buffer 5 X | 2.5 μ L |
| MgCl ₂ (25 mM) | 1.2 μ L |
| dNTPs (2 mM) | 1 μ L |
| Primer A (1298F) (5 mM) | 0.5 μ L |
| Primer B (1298R) (5 mM) | 0.5 μ L |
| Taq Polimerasa (<i>Promega</i>) | 0.25 μ L |
| Agua | 12.05 μ L |
| ADN (44 ng/ μ L) | 2 μ L |
| Volumen final de reacción | 25 μ L |
| Fragmento esperado | 105 pb |
| Condiciones Termociclador | \square C Tiempo |
| Denaturación inicial | 95 \square C 5' |
| Ciclos | 35 ciclos |
| Denaturación | 95 \square C 30'' |
| Anillamiento | 60 \square C 60'' |
| Elongación | 72 \square C 30'' |
| Elongación final | 72 \square C 5' |
| ∞ | 4 \square C ∞ |
| Condiciones Electroforesis | Verificación |
| Gel | Agarosa 1% |
| Producto PCR | 7 μ L |
| Buffer de carga | 4 μ L |
| Voltaje | 150V |
| Tiempo | 30' |



ANEXO 6

PROTOCOLOS DE DIGESTIÓN PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN POLIMORFISMOS ASOCIADOS CON LOS DTN

- Protocolo de RFLPs MTHFR C677T

| Condiciones Master Mix | | 1X |
|-----------------------------------|------|--|
| Buffer | | 2 μ L |
| Agua | | 15.3 μ L |
| Enzima Taq I (<i>Fermentas</i>) | | 0.5 μ L |
| BSA | | 0.2 μ L |
| Producto PCR | | 2 μ L |
| Volumen final de reacción | | 20 μ L |
| Fragmento esperado | | 198 pb |
| | CC | 198 pb |
| | CT | 198 pb – 173 pb |
| | TT | 173 pb – 25 pb |
| Condiciones Digestión | | <input type="checkbox"/> C Tiempo |
| Activación de la digestión | 65°C | 5 – 17 Horas |
| Condiciones Electroforesis | | Verificación |
| Gel | | Poliacrilamida(30:1) 12% |
| Producto digerido | | 10 μ L |
| Buffer de carga | | 2 μ L |
| Voltaje | | 120V |
| Tiempo | | 60' |



- **Protocolo de RFLPs MTHFR A1298C**

| Condiciones Master Mix | | 1X |
|------------------------------------|-------------------------------|--|
| Buffer | | 2 μ L |
| Agua | | 15.3 μ L |
| Enzima Mbo II (<i>Fermentas</i>) | | 0.5 μ L |
| BSA | | 0.2 μ L |
| Producto PCR | | 2 μ L |
| Volumen final de reacción | | 20 μ L |
| Fragmento esperado | | 204 pb |
| | AA | 204 pb |
| | AC | 241 pb – 204 pb |
| | CC | 241 pb |
| Condiciones Digestión | | <input type="checkbox"/> C Tiempo |
| Activación de la digestión | 37 <input type="checkbox"/> C | 5 – 16 Horas |
| Condiciones Electroforesis | | Verificación |
| Gel | | Poliacrilamida(30:1) 12% |
| Producto digerido | | 10 MI |
| Buffer de carga | | 2 μ L |
| Voltaje | | 150V |
| Tiempo | | 60' |



- **Protocolo de RFLPs CBS C699T**

| Condiciones Master Mix | | 1X |
|-----------------------------------|------|--|
| Buffer | | 2 μ L |
| Agua | | 15.3 μ L |
| Enzima RsaI (<i>Fermentas</i>) | | 0.3 μ L |
| BSA | | 0.2 μ L |
| Producto PCR | | 4 μ L |
| Volumen final de reacción | | 20 μ L |
| Fragmento esperado | | 177 pb |
| | CC | 177pb – 92 pb |
| | CT | 177 – 112 – 92 pb |
| | TT | 177 – 112 pb |
| Condiciones Digestión | | <input type="checkbox"/> C Tiempo |
| Denaturación inicial | 37°C | 5 – 17 Horas |
| Condiciones Electroforesis | | Verificación |
| Gel | | Poliacrilamida(30:1) 12% |
| Producto digerido | | 10 μ L |
| Buffer de carga | | 2 μ L |
| Voltaje | | 150V |
| Tiempo | | 45' |



- **Protocolo de RFLPs MTRR A66G**

| Condiciones Master Mix | | 1X |
|-----------------------------------|----|--|
| Buffer | | 2 μ L |
| Agua | | 10.5 μ L |
| Enzima Nspl (<i>Fermentas</i>) | | 0.3 μ L |
| BSA | | 0.2 μ L |
| Producto PCR | | 7 μ L |
| Volumen final de reacción | | 20 μ L |
| Fragmento esperado | | 93 pb |
| | AA | 93 pb – 12 pb |
| | AG | 93 pb – 70 pb |
| | GG | 70 – 23 – 12 pb |
| Condiciones Digestión | | <input type="checkbox"/> C Tiempo |
| Denaturación inicial | | 35 $^{\circ}$ C 5 – 17 Horas |
| Condiciones Electroforesis | | Verificación |
| Gel | | Poliacrilamida(30:1) 12% |
| Producto digerido | | 10 μ L |
| Buffer de carga | | 2 μ L |
| Voltaje | | 120V |
| Tiempo | | 60' |