

Estudios genéticos sobre espina bífida en Chile ¿Por dónde comenzar?

Rosa Pardo V.⁽¹⁾, José Lorenzo Suazo S.⁽²⁾, Silvia Castillo T.⁽¹⁾

⁽¹⁾Sección Genética, Depto. Medicina, HCUCH.

⁽²⁾Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

SUMMARY Neural tube defects (NTDs) are a group of congenital anomalies that affect the central nervous system. Spina Bífida (SB) is the most frequent NTD in live births and it is usually associated to disease, disability; and mortality. NTDs are considered as a multifactorial disease. Women who use folic acid periconceptionally are at a 50-70% reduced risk for NTD-affected pregnancies. More than 80 candidate genes to SB are been studied, someones related to folic acid metabolic pathway. MTHFR gene is the gene more studied in NTDs. Its allele 677T is asociate to higher risk to NTD. It is important to study polymorphisms in MTHFR gene in Chile because Chilean population has dfferent ethnic origen from others previous studied populations.

INTRODUCCIÓN

La espina bífida (EB) es una anomalía congénita que forma parte del grupo de los defectos de cierre del tubo neural (DTN) y que ocurre por alteraciones en el desarrollo embrionario entre las semanas 3 y 5 de gestación. La EB es el DTN más frecuente en los neonatos nacidos vivos y se asocia a mayor morbimortalidad, así como a diversos grados de discapacidad. Cada año nacen en Chile aproximadamente 100 niños con espina bífida, de los cuales 5% son mortinatos^(1,2).

Chile es un país en el cual tras 10 años de iniciado el programa nacional de la fortificación de la harina de trigo con ácido fólico (AF), se ha logrado reducir la ocurrencia del 52% de casos de EB y del 50% en todos los DTN, cifras similares al efecto máximo detectado para tal intervención en otros

países a nivel mundial⁽²⁾. Dado que a pesar de esta medida, siguen naciendo niños con EB, resulta muy importante analizar en la población chilena las causas genéticas de la enfermedad.

En la presente revisión comentaremos de manera global los estudios que han permitido postular a la vía de los folatos dentro del grupo etiológico de los DTN. Posteriormente nos centraremos específicamente en los estudios sobre el gen de la metilentetrahidrofolato reductasa y su relación con los DTN.

ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE DTN

En 1965, Hibbard y Smithells sugirieron que el tipo de dieta podría estar asociado a la aparición de DTN⁽³⁾. Estudios poblacionales posteriores permitieron constatar que las mujeres con fetos con DTN

tenían en el primer trimestre de gestación niveles séricos más bajos de AF y vitamina C en comparación a un grupo control⁽⁴⁾. En la década de los 80, bajo la hipótesis que suplementando vitaminas en el período periconcepcional podría prevenirse la aparición de alteraciones del sistema nervioso central, se efectuó un estudio clínico controlado no aleatorizado. En este estudio se incluyó 438 mujeres con historia previa de un hijo afectado con DTN a las cuales se les administró un suplemento multivitamínico. Los resultados de este estudio mostraron que dentro del grupo que recibió vitaminas, 0,6% de fetos tuvo DTN, en tanto que en el grupo no suplementado, el 5%, lo tuvo⁽⁵⁾. Estudios posteriores del mismo grupo confirmaron estos resultados, incluyendo siempre mujeres en riesgo de recurrencia de DTN, pero mejorando la metodología e incrementando el tamaño de la muestra^(6,7). Considerando estos hallazgos se continuaron efectuando a nivel global estudios tanto observacionales como de intervención sobre la ingesta dietaria de folatos y la suplementación con AF. Dentro de los estudios observacionales que evaluaron el efecto del uso de suplementos vitamínicos conteniendo AF, se destaca que todos salvo uno⁽⁸⁾, demuestran un significativo efecto protector en el rango de 35 a 71% (OR: 0,29-0,65) frente a la ocurrencia de DTN⁽⁹⁻¹²⁾. Por otra parte, las ingestas altas de folatos a través de la dieta durante el período periconcepcional también demostraron un rol protector⁽¹³⁾.

Los estudios intervencionales, incluidos tanto estudios controlados aleatorizados como no aleatorizados⁽¹⁴⁻¹⁷⁾, han demostrado el rol protector del AF frente a los DTN, obteniéndose la evidencia más potente después de dos estudios controlados aleatorizados: el estudio del Medical Research Council (MRC) sobre recurrencia de DTN⁽¹⁵⁾ y el estudio húngaro sobre ocurrencia de DTN⁽¹⁶⁾.

Respecto a estos dos últimos estudios, se destaca que el estudio del MRC⁽¹⁵⁾, el cual incluyó 33 centros de 7 países diferentes y un total de 1.817 mujeres con alto

riesgo de recurrencia (por tener un hijo afectado con DTN), distribuyó a las participantes en 4 grupos a saber: suplementación con 4 mg de ácido fólico, multivitaminas, ambas o ninguna. Los resultados de este trabajo demostraron que el ácido fólico era un factor protector (RR: 0,28; IC 95% 0,12-0,71). En tanto que en el grupo de los multivitamínicos sin AF, no se evidenció efecto protector estadísticamente significativo (RR: 0,8; IC 95% 0,32-1,72). Se debe resaltar que los suplementos multivitamínicos empleados en los otros grupos del estudio no contenían vitamina B12, lo cual pudo reducir el margen del efecto protector del ácido fólico reportado aquí frente a lo informado posteriormente por Czeizel y Dudas⁽¹⁶⁾.

El otro estudio clásico sobre AF y DTN es el húngaro⁽¹⁶⁾ en el cual evaluaron la capacidad de AF de prevenir ocurrencia de DTN, es decir, su efecto en mujeres sin riesgo adicional para tener niños con DTN. Para ello emplearon en su grupo de intervención complejos multivitamínicos con un contenido de 0,8 mg de ácido fólico y lo compararon con el grupo control al cual administraron elementos traza. Los resultados de este estudio reportaron que dentro del grupo de mujeres con multivitamínicos no hubo casos de DTN, en tanto que entre aquellas que recibieron los elementos traza, 2,4 de cada 1.000 gestaciones se vio afectada por DTN ($p=0,03$). Este es el primer estudio en reportar el efecto protector para DTN de multivitamínicos en población sin factores de riesgo para los mismos; sin embargo, no comprobaba que fuera el ácido fólico específicamente el responsable de la reducción de DTN. Más aún, sus resultados a la luz de los conocimientos actuales, estarían contaminados por el efecto protector ante DTN que se le atribuye a la vitamina B12, elemento presente en el suplemento vitamínico empleado en el estudio mencionado. Estudios posteriores a los descritos se han centrado en pesquisar dosis menores de AF para asegurar el efecto protector ante la ocurrencia de DTN en la población. Dentro de ellos destaca especialmente el efectuado en China, en el cual a través de un estudio de intervención no

aleatorizado, se verificó que una dosis de 0,4 mg/día de AF era suficiente para prevenir DTN y se evidenció además que el papel protector del AF era mayor en aquellas poblaciones con más tasas altas de DTN previa a la intervención⁽¹⁸⁾.

¿ES LA DEFICIENCIA DE FOLATOS LA CAUSA DE LOS DTN?

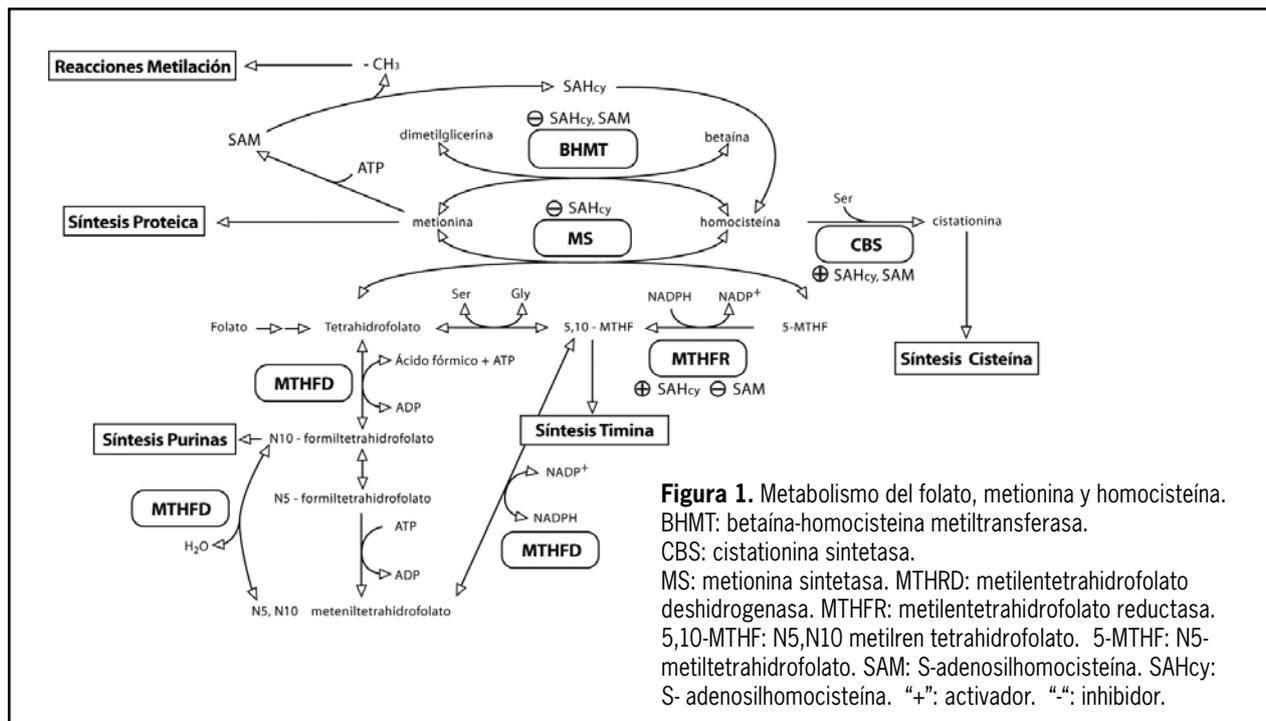
Como se mencionó anteriormente, Smithells *et al* (1976) demostraron que había bajos niveles de folatos en madres de niños afectados por DTN frente a mujeres sin hijos afectados^(4,19). Posterior a ello, otros investigadores en diferentes países coincidían con estos resultados, siendo así como Kirke *et al* (1993), analizando muestras de sangre provenientes de 348 mujeres a la semana 15 de gestación (81 con fetos con DTN y 247 con fetos sanos), encontraron que tanto los niveles de folatos como de vitamina B12 eran significativamente menores en aquellas que tenían fetos con DTN frente a los controles. Más aún, los riesgos de las dos vitaminas parecían independientes y se evidenciaba mayor riesgo en los fetos de aquellas mujeres con déficit de ambas vitaminas⁽²⁰⁾.

Otros estudios han demostrado que el nivel de folatos en los eritrocitos se relaciona directamente con el riesgo de tener un niño afectado por DTN. Es así como a niveles de folato en eritrocitos maternos de 150ng/ml (340nmol/l), la tasa de DTN es de 6,6 por cada 1.000 nacimientos y con niveles de 399ng/ml (906 nmol/l) es de 0,8 por cada 1.000 nacimientos. Cabe destacar que ninguno de los dos valores corresponde a deficiencia de folato de acuerdo a la norma internacional^(21,22).

Todas las aproximaciones metodológicas descritas hasta este momento apuntan a que los DTN podrían estar vinculados a alteraciones en el metabolismo del folato y que al estudiar los genes que codifican las proteínas implicadas en esta vía metabólica, podría detectarse la etiología de los DTN.

METABOLISMO DEL FOLATO, METIONINA Y HOMOCISTEÍNA

La Figura 1 resume la interrelación existente entre el metabolismo del folato, la metionina y la homocisteína. Como puede apreciarse, en esta relación



interfieren varias enzimas (MTHFRD, MTHFR, MS, BHMT, CBS, receptores de folatos y cofactores del complejo de vitaminas B).

Los estudios de posibles genes candidatos relacionados con esta vía metabólica y los DTN han encontrado asociación con algunos de ellos a través de estudios caso-control y de tríos caso-progenitores. Centraremos nuestra revisión específicamente en los trabajos que se relacionan con la metilentratetrahidrofoloreductasa (MTHFR). La MTHFR es la enzima que cataliza la conversión irreversible de 5,10 metilentratetrahidrofolato a 5-metilentratetrahidrofolato y permite la liberación de una unidad de carbono para la síntesis de purinas y pirimidinas, así como para proveer grupos metilo para que la S-adenosilmetionina (SAM) medie en las reacciones de metilación⁽²³⁾.

GEN DE LA METILENTRATETRAHIDROFOLATOREDUCTASA (MTHFR)

La MTHFR humana es una proteína que posee dos isoformas, una de 77kDa y otra de 70kDa de peso molecular. La isoforma de 77kDa es ubicua y la de 70kDa se encuentra en el hígado del adulto y en el hígado y los riñones fetales⁽²⁴⁾.

El gen que codifica para la MTHFR está localizado en el cromosoma 1 (1p36.3) y tiene 11 exones (Figura 2). Su región promotora tiene sitios de unión para factores de transcripción, pero no cuenta con cajas de secuencias TATA. Esta región

es similar a las secuencias promotoras de otros genes codificantes como, por ejemplo, cistationina sintetasa, metionina sintetasa y metionina sintetasa reductasa⁽²⁵⁾. En el exón 1 del gen de la MTHFR hay un sitio de *splicing* alternativo. Las secuencias UTRs de este gen son largas y se postula que están relacionadas con la regulación de genes complejos⁽²⁶⁾.

La MTHFR posee dos dominios: uno catalítico (en el extremo amino terminal, de 40 kDa), el cual se une a FAD, DAPH y al metilentratetrahidrofolato; y un dominio regulatorio (de 37 kDa en el extremo carboxilo-terminal). Entre estos dominios existe una región hidrofóbica con secuencias Lys-Arg-Arg-Glu-Glu, la cual constituye el sitio de unión para la tripsina⁽²⁷⁾. La digestión con tripsina de MTHFR no se relaciona con pérdida en la actividad catalítica, pero hace que la proteína sea insensible a la regulación alostérica. El inhibidor alostérico de la MTHFR es la SAM⁽²⁸⁾.

Los estudios sobre mutaciones en el gen de la MTHFR se han focalizado en los dominios catalíticos. Se han identificado más de 20 mutaciones, siendo la mayoría de ellas de carácter privado. Estas mutaciones se han identificado en pacientes con homocisteinemia, entidad que ha sido descrita como asociada a riesgo a enfermedades cardiovasculares, así como a DTN^(24,29,30). Se han identificado además dos polimorfismos de este gen: C677T y A1298C, que se asocian a disminución en la actividad enzimática (Figura 2).

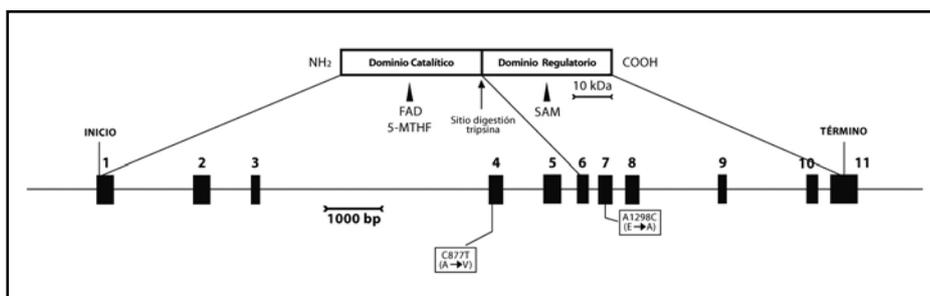


Figura 2. Figura esquemática del gen y la proteína de la metilentratetrahidrofolato reductasa y localización de los polimorfismos C677T y A1298C.

En el caso del polimorfismo C677T (A222V), la enzima se torna termolábil, causando pérdida de su actividad con el incremento de temperatura. Probablemente esta mutación cambie la estructura secundaria del péptido y las interacciones entre monómeros. La proteína modificada pierde su cofactor FAD más rápidamente y tiene menos estabilidad^(31,32). El efecto de la mutación puede ser suprimido si se adiciona folato^(32,33), el cual genera una alta afinidad por FAD y un incremento en la estabilidad de la MTHFR⁽²⁵⁾. La validación de los modelos *in vitro* de dichos hallazgos han sido refrendados tras observar que individuos homocigotos para la variante TT con niveles elevados de homocisteína, atribuidos parcialmente al estado de la riboflavina, pueden ser revertidos con la administración de riboflavina^(34,35). No obstante, la importancia relativa del estado del folato celular en estabilizar la enzima y su relación con el estado de la riboflavina, aún está por esclarecerse.

In vivo, la variante 677T se asocia a la reducción de los niveles plasmáticos y eritrocitarios de folatos, lo cual hace plausible el requerimiento de más folato⁽³⁶⁾. Se sabe que existe una amplia heterogeneidad en la distribución mundial del polimorfismo, teniendo rangos de genotipos homocigotos TT con frecuencias de 0,2 a 0,36 en mexicanos y europeos del sur a 0,12 en los europeos del norte y <0,01 en los grupos de africanos⁽³⁷⁻⁴³⁾.

El polimorfismo A1298C, que se localiza en la región del dominio regulador, no tiene mucho efecto sobre la actividad proteica. La literatura reporta que la frecuencia del genotipo 1298CC es de 10% y que la frecuencia del alelo 1298C es de 0,36 en diferentes poblaciones⁽⁴⁴⁾. El descenso en la actividad enzimática de la MTHFR no ha sido solamente relacionada con los DTN, sino también con enfermedades cardiovasculares, trombosis venosa y fisuras labio-palatinas. La concentración baja de 5-metiltetrahidrofoloreductasa también tiene ingerencia en la regulación génica (por

ejemplo, supresión de genes en cáncer), dado que disminuye el nivel de SAM, una sustancia esencial para las reacciones de metilación⁽⁴⁵⁾.

MODELOS EXPERIMENTALES PARA MUTACIONES DE MTHFR

Existen a la fecha más de 240 modelos de ratones mutantes para DTN⁽⁴⁶⁾. Dentro del estudio para establecer estos modelos, se evaluaron las mutaciones en el gen *Mthfr*, detectándose que las ratas heterocigotas para la delección del gen *Mthfr* se desarrollan normalmente, en contraste con aquellas que son *knock out* (KO) para el gen, en las cuales se evidencia una vida corta y trastornos del movimiento. Además en algunas ratas *Mthfr* *-/-* se pueden apreciar deformidades en la cola, lo cual las hace similares a las ratas de cola *curly*, que son un modelo experimental para DTN. Más aún, las ratas sin el gen de la *Mthfr* tienen ojos prominentes, trastornos en el desarrollo de la región craneofacial e hipercifosis. Sin embargo, ninguna de las ratas con exclusión total o parcial del gen de la *Mthfr* aislado tiene una forma evidente de DTN⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾.

Gen de la MTHFR y su asociación a DTN

Se han desarrollado varios estudios sobre la asociación del gen de la MTHFR y los DTN, en los cuales se reporta asociación el genotipo 677TT y el aumento de riesgo para DTN⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾. En 1999 Shields *et al*, luego de estudiar 218 familias irlandesas de niños con DTN por el método de tríos, concluyeron que el genotipo MTHFR 677TT estaba asociado con este grupo de malformaciones con un OR de 2,57 (IC 95%: 1,48-4,45; p=0,0005), siendo el efecto más importante si era el embrión quien portaba dicho genotipo y siendo menos fuerte el efecto si era la madre quien lo portaba⁽⁵²⁾. En este siglo se supo además que el genotipo CT también confería un incremento en el riesgo para DTN⁽⁴²⁾. Un metanálisis efectuado en 2000 sobre los estudios existentes sobre la asociación entre el

polimorfismo C677T y los DTN⁽³⁹⁾, concluyó que tanto el genotipo TT embrionario como el materno son factores de riesgo equivalentes, con OR de 1,8 (CI 95%: 1.4-2.2) para los casos y de 2.0 (CI95%: 1.5-2.8) para las madres. Sin embargo, la metodología de dicho metanálisis puede inducir a errores, dado que comparó a las madres con los controles, sin corregir o considerar el genotipo del caso. Para verificar esta situación, un nuevo estudio fue realizado en población americana de 175 pacientes con DTN y sus familias en 2003 por Rampersaud *et al*, cuyo resultado ratifica que es la condición de genotipo TT en el embrión la que confiere mayor riesgo para DTN⁽⁵³⁾. No obstante, no se puede dejar de mencionar aquí que el riesgo conferido por el genotipo TT tendría una baja penetrancia, puesto que la mayoría de los individuos TT no presentan DTN⁽⁵⁴⁾.

Más aún, existen estudios en otras poblaciones que no han logrado identificar el genotipo TT como factor de riesgo para DTN. Dentro de las posibles causas de estas diferencias se han postulado: a) el bajo poder estadístico de los estudios, relacionados directamente con un tamaño muestral pequeño, b) la frecuencia variable del genotipo TT en los diferentes grupos étnicos, c) las interacciones entre variantes nutricionales y su modulación en el posible efecto de la mutación en la aparición de DTN^(43,55), y d) la variabilidad de asociación entre ciertos DTN específicos y el genotipo TT, lo que llevaría a que estudios que seleccionen diferentes tipos de DTN tendrían menor probabilidad de encontrar la asociación⁽⁵⁶⁾.

¿CÓMO SE RELACIONA EL GENOTIPO 677TT CON LOS DTN?

Pese a los hallazgos descritos, aún no se sabe cómo podría el genotipo TT estar actuando biológicamente para desencadenar la aparición de un DTN. No obstante, se ha postulado que dado el punto crítico de la enzima en la vía metabólica de los folatos, donde se donan unidades de carbono para

la síntesis de ADN y/o para las reacciones de metilación, su rol estaría vinculado bien con la proliferación celular o con trastornos en la metilación que pudieran generar cambios postraduccionales que modifiquen proteínas, o bien, silenciando la expresión de genes o incluso alterando los procesos de señalización celular.

¿EXISTEN OTRAS VARIANTES POLIMÓRFICAS DEL GEN DE LA MTHFR IMPLICADAS EN LA APARICIÓN DE DTN?

Se ha estudiado la asociación entre el SNP A1298C y los DTN. Este polimorfismo genera la sustitución de una adenina por una citosina en la posición 1298, lo cual genera un cambio en la secuencia aminoacídica de un glutamato por una alanina (Gln429Ala)⁽⁵⁷⁾. Esta mutación produce una enzima menos activa, aunque su función está menos alterada que en el polimorfismo 677T^(39,57,58). La presencia de este SNP no se traduce en modificaciones de los niveles de homocisteína ni de folatos.

Respecto al SNP A1298C, existe un solo estudio que ha encontrado su asociación con DTN⁽⁵⁹⁾, el resto no ha encontrado asociación entre ellos. Más aún, se sabe hoy que el SNP A1298C está en fuerte desequilibrio de ligamiento con la variante C677T, rasgo pocas veces considerado en estudios de estos SNP. Esto puede condicionar que no se haya encontrado un efecto independiente de C677T para esta variante polimórfica en los DTN^(51,60-65). Por lo tanto, a la fecha se estima que el SNP A1298C no sería un factor de riesgo para DTN.

¿CÓMO Y POR QUÉ PARTIR EL ESTUDIO DE LAS CAUSAS GENÉTICAS DE ESPINA BÍFIDA EN CHILE CON EL ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE LA MTHFR?

La hipótesis de que la suplementación con ácido fólico modifica procesos relacionados con la vía metabólica de los folatos tanto en la madre como en

el embrión, es un consenso internacional. Resulta importante estudiar los polimorfismos C677T y A1298C del gen de la MTHFR y su posible asociación con la aparición de EB en Chile, pues es una población mixta cuyo origen étnico difiere de las poblaciones previamente analizadas y nos permitiría ahondar más en los factores etiológicos de la patología.

Las metodologías internacionalmente propuestas para este tipo de estudios se agrupan básicamente en dos modelos: 1) un análisis básico de casos y controles, en el cual se evalúa la prevalencia del polimorfismo particular en los casos y se compara con un grupo de características étnicas similares que no porten DTN, usando una aproximación logarítmica lineal^(65,66), y 2) un análisis secundario, en el cual se evalúe la transmisión preferencial de un alelo en particular desde padres heterocigotos a los casos, empleando el test de desequilibrio de transmisión⁽⁶⁷⁾. Dado que en estos estudios sólo los padres heterocigotos son informativos para el análisis final, se requiere un número grande de tríos

(paciente, madre y padre) para asegurar el poder de los mismos⁽⁶⁸⁾.

En resumen, los defectos de cierre de tubo neural son una patología considerada de herencia multifactorial, la cual es prevenible en un 50% a 70% de los casos a través de la ingesta de ácido fólico en el período periconcepcional. Respecto a los genes implicados en su etiopatogenia, existen más de 80 posibles candidatos en estudio actualmente, algunos de ellos relacionados con el metabolismo de los folatos. Dentro de este grupo, el gen más estudiado ha sido el de la metilentetrahidrofolato reductasa, en el cual para ciertas poblaciones la presencia del polimorfismo 677T se asocia a mayor riesgo de defectos de tubo neural. Resulta importante estudiar los polimorfismos del gen de la MTHFR y su posible asociación con la aparición de EB en Chile, pues es una población mixta cuyo origen étnico difiere de las poblaciones previamente analizadas y nos permitiría ahondar más en los factores etiológicos de la patología.

REFERENCIAS

1. Hertrampf E, Cortés F. National food-fortification program with folic acid in Chile. *Food Nutr Bull* 2008;2982(Suppl):S231-237.
2. López-Camelo JS, Castilla EE, Orioli IM, INAGEMP and ECLAMC. Folic acid flour fortification: Impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American Countries. *Am J Med Genet A* 2010;152A:2444-58.
3. Hibbard ED, Smithells RW. Folic acid metabolism and human embryopathy. *Lancet* 1965;285:1254.
4. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 1976;51:944-50.
5. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ, Seller MJ, Nevin NC, Harris R *et al.* Possible Prevention of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Lancet* 1980;1:339-40.
6. Smithells RW, Nevin NC, Seller MJ, Sheppard S, Harris R, Read AP *et al.* Further experience of vitamin supplementation for prevention of neural tube defect recurrences. *Lancet* 1983;1:1027-31.
7. Smithells RW, Sheppard S, Wild J, Schorah CJ. Prevention of neural tube defect recurrences in Yorkshire: final report. *Lancet* 1989;2:498-9.
8. Mills JL, Rhoads GG, Simpson JL, Cunningham GC, Conley MR, Lassman MR *et al.* The absence of a relation between the periconceptional use of vitamins and neural-tube defects. National Institute of Child Health and Human Development Neural Tube Defects Study Group. *N Engl J Med* 1989;321:430-5.
9. Mulinare J, Cordero JF, Ericson JD, Berry RJ. Periconceptional use of multivitamins and the occurrence of neural tube defects. *JAMA* 1988;260:3141-5.
10. Milunsky A, Jick H, Jick SS, Bruell CL, MacLaughlin DS, Rothman KJ *et al.* Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *JAMA* 1989;262:2847-52.
11. Werler MM, Shapiro S, Mitchell AA. Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. *JAMA* 1993;269:1257-61.
12. Shaw GM, Schaffer D, Velie EM, Morland K, Harris JA. Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiology* 1995;6:219-26.
13. Bower C, Stanley FJ. Dietary folate as a risk factor for neural-tube defects: evidence from a case-control study in Western Australia. *Med J Aust* 1989;150:613-9.
14. Laurence KM, James N, Miller MH, Tennant GB, Campbell H. Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural tube defects. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1981;282:1509-11.
15. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991;338:131-7.
16. Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects. *N Engl J Med* 1992;327:1832-5.
17. Kirke PN, Daly LE, Elwood JH. A Randomised trial of low dose folic acid to prevent neural tube defects. *Arch Dis Child* 1992;67:1442-6.

18. Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H *et al.* Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. *N Engl J Med* 1999;341:1485-90. Erratum in: *N Engl J Med* 1999;341:1864.
19. Yates JR, Ferguson-Smith MA, Shenkin A, Guzman-Rodriguez R, White M, Clark BJ. Is disordered folate metabolism the basis for the genetic predisposition to neural tube defects? *Clin Genet* 1987;31:279-87.
20. Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DG, Scott JM. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *QJM* 1993;86:703-8.
21. Daly LE, Kirke PN, Molloy A, Weir DG, Scott JM. Folate levels and neural tube defects. Implications for prevention. *JAMA* 1995;274:1698-702.
22. Wald NJ, Hackshaw AD, Stone R, Sourial NA. Blood folic acid and vitamin B12 in relation to neural tube defects. *Br J Obstet Gynecol* 1996;103:319-24.
23. Gos M, Szpecht-Potocka A. Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. *J Appl Genet* 2002;43:511-24.
24. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG *et al.* Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994;7:195-200.
25. Homberger A, Linnebank M, Winter C, Willenbring H, Marquardt T, Harms E *et al.* Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet* 2000;8:725-9.
26. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z *et al.* Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 1998;9:652-6.
27. Matthews RG, Sheppard C, Goulding C. Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase: biochemistry and molecular biology. *Eur J Pediatr* 1998;157(Suppl2):S54-S59.
28. Filkenstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998;157(Suppl.2):S40- S44.
29. Kluijtmans LA, Wendel U, Stevens EM, Van den Heuvel LP, Trijbels FJ, Blom HJ. Identification of four novel mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Eur J Hum Genet* 1998;6:257- 65.
30. Sibani S, Christensen B, O'Ferrall E, Saadi I, Hiou-Tim F, Rosenblatt DS *et al.* Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofoalte reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. *Hum Mutat* 2000;15:280-7.
31. Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML. The structure and properties of metilenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Biol* 1999;6:359-65.
32. Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:14853-8.
33. Pejchal R, Campbell E, Guenther BD, Lennon BW, Matthews RG, Ludwig ML. Structural perturbations in the Ala>Val polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase: how binding of folates may protect against inactivation. *Biochemistry* 2006;45:4808-18.
34. McNulty H, McKinley MC, Wilson B, McPartlin J, Strain JJ, Weir DG *et al.* Impaired functioning of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase is dependent on riboflavin status: implications for riboflavin requirements. *Am J Clin Nutr* 2002;76:436-41.

35. McNulty H, Doweyle RC, Strain JJ, Dunne A, Ward M, Molloy AM *et al.* Riboflavin lowers homocysteine in individuals homozygous for the MTHFR 677C>T polymorphism. *Circulation* 2006;113:74-80.
36. Molloy AM, Daly S, Mills JL, Whitehead AS, Ramsbottom D, Conley MR *et al.* Thermolabile variant of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. *Lancet* 1997;349:1591-3.
37. Pepe G, Camacho Vanegas O, Giusti B, Brunelli T, Marcucci R *et al.* Heterogeneity in world distribution of the thermolabile C677T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1998;63:917-20.
38. Mutchinick OM, Lopez MA, Luna L, Waxman J, Babinsky VE. High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Mol Genet Metab* 1999;68:461-7.
39. Botto L, Yang Q. 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000;151:862-77.
40. Esfahani ST, Cogger EA, Caudill MA. Heterogeneity in the prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in women of different ethnic groups. *J Am Diet Assoc* 2003;103:200-7.
41. Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M *et al.* Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J Med Genet* 2003;40:619-25.
42. Kirke PN, Mills JL, Molloy AM, Brody LC, O'Leary VB, Daly L *et al.* Impact of the MTHFR C677T polymorphism on risk of neural tube defects: case-control study. *BMJ* 2004;328:1535-6.
43. Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP *et al.* Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 2006;83:701-7.
44. Botto LD, Yang Q. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and birth defects. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Environmental Health, Division of Birth Defects and Pediatric Genetics Atlanta, GA. 1999. Consultado en www.cdc.gov/genetics/hugenet/reviews/MTHFR.html
45. Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, Wasserman CR, Lammer EJ. Maternal vitamin use, genetic variation of infant methylenetetrahydrofolate reductase and risk for spina bifida. *Am J Epidemiol* 1998;148:30-7.
46. Harris MJ, Juriloff DM. An update to the list of mouse mutants with neural tube closure defects and advances toward a complete genetic perspective of neural tube closure. *Birth Defec Res (Part A)* 2010;88:653-69.
47. Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny I.P, Melnyc S, Lussier *et al.* Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet* 2001;5:433-43.
48. Harris MJ, Juriloff DM. Mouse mutants with neural tube closure defects and their role in understanding human neural tube defects. *Birth Def Research (part A)* 2006;79:187-210.
49. Frosst P, Bloom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG *et al.* A Candidate genetic risk factor for vascular disease : a common mutation in metilenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1999;10:111-3.

50. Withehead AS, Gallagher P, Mill JL, Kirke PN, Burke H, Molloy AM *et al.* A genetic defects in 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. *QJM* 1995;88:763-6.
51. Van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK *et al.* Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995;346:1070-1.
52. Shields DC, Kirke PN, Mills JL, Ramsbottom D, Molloy AM, Burke H *et al.* 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 Med Genet* 1999;64:1045-55.
53. Rampersaud E, Melvin EC, Siegel D, Mehlretter L, Dickerson ME, George TM *et al.* Update investigations of the role of methylenetetrahydrofolate reductase in human neural tube defects. *Clin Genet* 2003;63:210-4.
54. Molloy AM, Mills JL, Kirke PN, Ramsbottom D, McPartlin JM, Burke H *et al.* Low blood folates in NTD pregnancies are only partly explained by thermolabile 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase; low folate status alone may be the critical factor. *Am J Med Genet* 1998;78:155-9.
55. Amorim MR, Lima MA, Castilla EE, Orioli IM. Non-Latin European descent could be a requirement for association of NTDs and MTHFR variant 677C>T: a meta-analysis. *Am J Med Genet A* 2007;143A:1726-32.
56. Johanning GL, Tamura T, Johnston KE, Wenstrom KD. Comorbidity of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase gene polymorphisms and risk for neural tube defects. *J Med Genet* 2000;37:949-51.
57. Van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK *et al.* A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects? *Am J Med Genet* 1998;62:1044-51.
58. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Bibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64:169-72.
59. De Marco P, Calevo MG, Moroni A, Arata L, Merello E, Cama A *et al.* Study of MTHFR and MS polymorphisms as risk factors for NTD in the Italian population. *J Hum Genet* 2002;47:319-24.
60. Volcik KA, Blanton SH, Tyerman GH, Jong ST, Rott EJ, Page TZ *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase and spina bifida: evaluation of level of defect and maternal genotypic risk in Hispanics. *Am J Med Genet* 2000;95:21-7.
61. Cunha AL, Hirata MH, Kim CA, Guerr-Shinohara EM, Nonoyama K, Hirata RD. Metabolic effects of C677T and A1298C mutations at the MTHFR gene in Brazilian children with neural tube defects. *Clinica Chimica Acta* 2002;318:139-43.
62. Stegman K, Ziegler A, Ngo ET, Kohlschmidt N, Schröter B, Ermert A *et al.* Linkage disequilibrium of MTHFR genotypes 677C/T-1298A/C in the German population and association studies in probands with neural tube defects (NTD). *Am J Med Genet* 1999;87:23-9.
63. Parle-McDermott A, Mills JL, Kirke PN, O'Leary VB, Pangilinan F, Cox C *et al.* Analysis of the MTHFR 1298 A->C and 677C->T polymorphisms as risk factors for neural tube defects. *J Hum Genet* 2003;48:190-3.

64. O'Leary VB, Mills JL, Pangilinan F, Kirke PN, Cox C, Conley M *et al.* Analysis of methionine synthase reductase polymorphisms for neural tube defects risk association. *Mol Genet Metab* 2005;85:220-7.
65. Weinberg CR, Wilcox AJ, Lie RT. A log-linear approach to case-parent-triad data: assessing effects of disease genes that act either directly or through maternal effects and that may be subject to parental imprinting. *Am J Hum Genet* 1998;62:969-78.
66. Wilcox AJ, Weinberg CR, Lie RT. Distinguishing the effects of maternal and offspring genes through studies of "case-parent triads". *Am J Epidemiol* 1998;148:893-901.
67. Spielman RS, Ewens WJ. The TDT and other family-based test for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet* 1996;59:983-9.
68. Molloy AM, Brody LC, Mills JL, Scott JM, Kirke PN. The search for genetic polymorphisms in the homocysteine/folate pathway that contribute to the etiology of human neural tube defects. *Birth Def Research (part A)* 2009;85:285-94.

CORRESPONDENCIA



Dra. Rosa Andrea Pardo Vargas
Sección Genética, Departamento de Medicina
Hospital Clínico Universidad de Chile
Santos Dumont 999, Independencia, Santiago
Fono: 978 8513
E-mail: rpardo@redclinicauchile.cl