

Polimorfismo C677T del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa en madres de niños afectados con defectos del tubo neural.

Alisandra Morales de Machín¹, Karile Méndez¹, Ernesto Solís¹, Lisbeth Borjas de Fajardo¹, Ana Bracho¹, María Luisa Hernández², Aimara Negrón¹, Wilmer Delgado¹ y Yanira Sánchez¹

¹. Instituto de Investigaciones Genéticas, Universidad del Zulia (IIG-LUZ) Maracaibo, Venezuela.

². Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: Polimorfismo MTHFR C677T; defecto del tubo neural.

Resumen. Los defectos del tubo neural (DTN) son las alteraciones congénitas más frecuentes del sistema nervioso central. El mecanismo de transmisión hereditario de los DTN aislados es multifactorial, se debe a la interacción de factores ambientales y genéticos. El polimorfismo 677C>T del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) ha sido implicado como factor de riesgo para DTN. El objetivo de este trabajo fue investigar la asociación del polimorfismo 677C>T del gen de la MTHFR como factor de riesgo en los DTN. Se analizaron muestras de ADN de 52 madres con antecedente de al menos un hijo con DTN y de 119 madres controles. A través de la reacción en cadena de la polimerasa se amplificó un fragmento de 198 pb, el cual se sometió a digestión con la enzima *HinfI*. La frecuencia alélica de la MTHFR en los grupos problema y control fue de 51,92% y 34,45%; para el alelo T y 48,08% y 65,55%; para el C respectivamente. Se encontró diferencia significativa entre las frecuencias del alelo T y del alelo C (p: 0,002), así como entre las frecuencias genotípicas (p: 0,007) al ser comparadas en ambos grupos. El odds ratio (OR) para el genotipo TT vs CC se estimó como OR: 4,9 [IC 95%: 1,347-6,416] p: 0,002; CT+TT vs CC: OR: 2,9 [IC 95%: 1,347-6,416] p: 0,005; TT vs CT+CC: OR: 2,675 [IC 95%: 1,111-6,441] p: 0,024. Los presentes datos aportan una asociación significativa entre el polimorfismo 677C>T de la MTHFR y riesgo aumentado en las madres con antecedente de hijos con DTN.

C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in mothers of children affected with neural tube defects.

Invest Clin 2015; 56(3): 284 - 295

Keywords: MTHFR C677T polymorphism; neural tube defect.

Abstract. Neural tube defects (NTD) are the most common congenital anomalies of the central nervous system, with a multifactorial pattern of inheritance, presumably involving the interaction of several genetic and environmental factors. The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene 677C>T polymorphism has been implicated as a risk factor for NTD. The main objective of this research was to investigate the association of the 677C>T polymorphism of the MTHFR gene as a genetic risk factor for NTD. Molecular analysis was performed in DNA samples from 52 mothers with antecedent of NTD offspring and from 119 healthy control mothers. Using the Polymerase Chain Reaction, a 198 bases pairs fragment was digested with the restriction enzyme *HinfI*. 677T MTHFR allele frequencies for the problem and the control groups were 51.92% and 34.45%, respectively, and 677C MTHFR allele frequencies were 48.08% and 65.55%, respectively. There were significant differences in allele (p: 0.002) and genotype (p: 0.007) frequencies between these two groups. The odds ratio (OR) to the TT genotype vs the CC genotype was estimated as OR: 4.9 [95% CI: 1,347-6.416] p: 0.002; CT+TT vs CC: OR: 2.9 [95% CI: 1.347-6.416] p: 0.005; TT vs CT+CC: OR: 2.675 [95% CI: 1,111-6.441] p: 0.024. The data presented in this study support the relationship between MTHFR 677C>T polymorphism and risk in mothers with antecedent of NTD offspring.

Recibido: 28-10-2014 Aceptado: 26-03-2015

INTRODUCCIÓN

Los defectos del tubo neural (DTN), son las anomalías más frecuentes y severas del sistema nervioso central (SNC) (1,2), resultan de un fallo en el desarrollo y cierre normal del tubo neural (3,4). Se clasifican según su localización, en espinales y craneales, los defectos espinales incluyen la espina bífida (EB) y sus variedades, oculta y quística (meningocele y mielomeningocele) y los defectos craneales (craneosquisis) que incluyen la anencefalia y el cefalocele (5,6).

Según la presencia o no de tejido neural expuesto, el DTN se clasifica en abierto y cerrado (5,6). Los DTN abiertos que incluyen la EB abierta y la anencefalia, resultan de falla en la neurulación primaria, que involucra plegamiento y fusión de los pliegues neurales. Esto puede ocurrir

a diferentes niveles del axis del cuerpo, lo cual refleja la ocurrencia de múltiples sitios de cierre del tubo neural. El cierre en la región craneal se completa en el día 25 y el cierre en el neuroporo posterior, el cual completa la neurulación primaria, ocurre durante los días 26 a 28 post fertilización (5). La craneorraquisquisis resulta de la falla de fusión de todo el tubo neural, es un DTN abierto severo y poco frecuente (5,6).

Los DTN cerrados, resultan de defectos en el desarrollo del mesoderma axial que forma las vértebras y el cráneo. Producirán encefalocele o meningocele, en los cuales el tubo neural cerrado, está herniado a través de la región afectada del cráneo o de la columna vertebral (5).

Se estima que la frecuencia a nivel mundial es de 1 a 10 por 1.000 nacimientos (7) y de 0,5 a 2 por 1.000 embarazos (4). En Venezuela, Hernández y

col citan que la frecuencia de DTN varía de 0,5 a 2 por 1.000 nacidos vivos (8). La mayoría de los DTN ocurren de forma aislada y su patrón de herencia es multifactorial, resulta de complejas interacciones entre ciertos factores medioambientales y genéticos (9). Martínez y col han citado que los DTN se han asociado con bajo nivel económico, hipertermia, medicación anticonvulsivante, diabetes y factores nutricionales (10).

Se ha planteado la asociación entre el desarrollo de DTN y niveles bajos de folato (11), otros han reportado disminución en la prevalencia de los DTN debido al uso de suplementos vitamínicos que contenían ácido fólico, durante la etapa periconcepcional (2,12-16), o a la fortificación con ácido fólico de alimentos de consumo masivo (17-23).

El ácido fólico es una molécula hidrosoluble, que pertenece al grupo de las vitaminas del complejo B. Se considera un nutriente esencial. El término ácido fólico es usado para la forma sintética, presente en multivitaminas, tabletas de ácido fólico y alimentos fortificados. La forma natural es referida como folato y se consigue en verduras y hortalizas, entre las cuales cabe destacar las acelgas, espinacas, remolachas, coles y guisantes. Asimismo los garbanzos, algunas frutas frescas como las naranjas, melón y plátano; frutos secos tales como almendras y avellanas; también en levaduras e hígado. Una cantidad de folato puede ser destruida durante la cocción, procesamiento y almacenaje (3). Aunque en la embarazada pueden coexistir enfermedades causantes de anemia, la causa más frecuente es el déficit nutricional por la deficiencia aislada o combinada de hierro y ácido fólico (24-26).

En Venezuela, en el estado Zulia, la deficiencia de folato sérico y eritrocitario en embarazadas ha sido reportada en valores de 13% a 39% y de 18% a 47% respectivamente (27-30). En el caso de la mujer no embarazada adolescentes y adultas, la deficiencia de folato sérico ha sido reportada en 13% a 24,6% (27,28, 31-33) y el folato eritrocitario entre 10% a 14% (27, 28, 31). En las mujeres indígenas Bari de Campo Rosario y Yucpa de Peraya de ≥ 18 años, la deficiencia de

folato sérico reportada fue de 89,2% (34) y 26,3% respectivamente (35).

La prevalencia de deficiencia de folato en Venezuela ha sido reportada en 31, 53%; en niños, adolescentes y mujeres embarazadas (36).

Se ha propuesto que existe predisposición a DTN, ante la presencia del polimorfismo 677C>T del gen que codifica la enzima metileno-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Este factor de riesgo es modulado por niveles de folato en el cuerpo (3, 37). El gen de la MTHFR está localizado en la banda 36.3 del brazo corto del cromosoma 1 (1p36.3). Codifica la enzima MTHFR (38), Frosst y col (39) citan que ella a su vez cataliza la reducción de 5, 10 – metileno-tetrahidrofolato a 5 – metileno-tetrahidrofolato, que es la forma de folato predominantemente circulante y es el donador de carbonos para la remetilación de homocisteína a metionina (39), con lo cual es precursor de una cadena de reacciones de metilación de sustancias de interés biológico, como la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas, neurotransmisores y fosfolípidos (40); así el folato es esencial para la función, división y diferenciación celular (3). El polimorfismo 677C>T implica una variación en la posición 677 del nucleótido, que involucra el cambio de una base citosina (C) a timina (T), dando como resultado una sustitución de valina (GTC) por alanina (GCC). Esta variante es termolábil y como consecuencia, las personas, homocigotos 677TT y heterocigotos 677CT, tienen la actividad enzimática reducida en 70% y 35% respectivamente (39). El genotipo homocigoto 677TT está asociado a niveles de homocisteína sérica elevados (hHcy), asociada con bajo nivel de folato en el plasma, aunque esta relación puede no siempre coexistir (41,42,43). La producción de 5-metiltetrahidrofolato requiere de abastecimiento adecuado de folato y la función apropiada de la MTHFR, por lo tanto, si hay enzimas funcionando inapropiadamente o los cofactores no se presentan en cantidades adecuadas existe la posibilidad de originar hHcy (41).

El mecanismo exacto por el cual la hHcy puede contribuir al desarrollo de DTN es desconocido, pero es posible incluir teorías acerca de posibles

efectos estructurales y neurológicos en el embrión (44). La homocisteína es embriotóxica durante el proceso de neurulación (3), e induce DTN en embriones de pollo cuando se administra antes y durante el periodo de neurulación (45). Los niveles disminuidos de metionina, debido a alteración en la remetilación de homocisteína a metionina, podrían resultar en niveles disminuidos de S - adenosil metionina, que es el donador universal de grupos metilos y un sustrato para múltiples reacciones de transmetilación, que incluyen la metilación del ADN, lo que ocasiona daño a la neurulación, por metilación inadecuada de genes, silenciando su expresión (3).

Los eventos comunes a los diversos factores de riesgo ambiental y genético, confluyen en los procesos de neurulación y en el metabolismo del folato/homocisteína (46).

En Venezuela, específicamente en el estado Zulia, a pesar de haberse reportado una frecuencia de 2,28 en 1000 nacidos de DTN en la Costa Oriental del Lago de Maracaibo (47), no se ha descrito sobre la asociación de este polimorfismo como factor de riesgo para la aparición de DTN. Debido a esto el objetivo de este trabajo fue investigar la asociación del polimorfismo 677C>T de la MTHFR como factor de riesgo en los defectos del tubo neural.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se estudiaron 52 madres no relacionadas, con antecedente de al menos un hijo con DTN aislado como grupo problema, se recogió la información si recibieron ácido fólico en etapa periconcepcional y de los hijos con DTN información sobre tipo de defecto, sexo y si fallecieron o no y 119 madres no relacionadas sin este antecedente como grupo control, con edad y condición socioeconómica similar, residentes en la misma área geográfica. Se obtuvo ADN de 171 muestras, a partir de 5 mL de sangre periférica anticoagulada con EDTA 500 mM según técnica convencional (48). Para la realización de este trabajo, se contó con el consentimiento informado de las madres estudiadas y la aprobación del Comité de Bioética

del Instituto de Investigaciones Genéticas de LUZ (IIG-LUZ).

Análisis molecular

La identificación de la transición C>T en el nucleótido 677 del gen de la MTHFR se realizó utilizando el método descrito por Frosst y col (39). La secuencia de los iniciadores utilizados fue la siguiente: 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' y 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3', estos iniciadores están diseñados para generar un producto amplificado de 198 pares de bases (pb), el cual se sometió a digestión con la enzima de restricción *HinfI*, esta enzima reconoce el sitio de restricción creado por la transición C>T en la posición 677. El alelo con la variante polimórfica T se corta en dos fragmentos, uno de 175 y otro de 23 pb y el alelo normal (C) no se corta (39). El producto digerido se caracterizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, y se visualizó utilizando la tinción de bromuro de etidio.

El genotipo homocigoto CC se definió como la presencia de una sola banda de 198 pb, homocigoto TT cuando se visualizó una banda de 175 pb y heterocigoto CT para el polimorfismo cuando se observaron fragmentos de 198 y 175 pb, la banda de 23 pb se sale del gel.

A partir de las frecuencias genotípicas, se calcularon las frecuencias alélicas en los 2 grupos y se verificó el ajuste al modelo de Equilibrio de Hardy Weinberg (49,50) en el grupo control. Se utilizó el estadístico Chi cuadrado (X^2), a un nivel de significación de $< 0,05$ para calcular la diferencia entre la frecuencia alélica entre el grupo problema y el control. Para establecer la relación entre la presencia del alelo T en el polimorfismo 677C>T en el gen de la MTHFR y el incremento de riesgo de DTN, se compararon las frecuencias de los genotipos con la variante (CT y TT) con el genotipo normal (CC), en el grupo problema y el control. Para el procesamiento de este estadístico, se utilizó el paquete SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences).

RESULTADOS

Las 52 madres en el grupo problema tenían edad comprendida entre los 14 y 43 años, siendo el promedio de 25,1 años \pm 5,7 años. Según la información obtenida de las madres del grupo problema, el DTN se produjo en 54 embarazos: 19 fetos fueron evacuados antes de las 30 semanas de gestación, posterior a un ecograma fetal, 19 resultaron mortinatos, 16 nacieron vivos, de los cuales nueve fallecieron durante la primera semana y siete aún viven.

El tipo de DTN fue: anencefalia en 32 embarazos, dos de ellos con mielomeningocele y cinco con raquisquisis, mielomeningocele en 15, meningocele en cinco y encefalocele en dos. Dos mujeres tuvieron el antecedente de dos hijos de diferente sexo con anencefalia (Tabla I). Además 11 presentaron antecedente de pérdida gestacional, cuatro de ellas con pérdida gestacional malformada.

En el grupo de controles se analizaron 119 madres de 19 a 55 años de edad, siendo el promedio de 37,5 años \pm 9,8 años.

El análisis de los genotipos del gen de la MTHFR se observa en la Fig. 1.

Las frecuencias genotípicas y alélicas para el polimorfismo 677C>T, se presentan en la Tabla II. Las comparaciones entre ambos grupos resultaron significativas para las distribuciones alélicas ($p=0,002$) y genotípicas, tanto para los tres genotipos ($p=0,007$), como para la comparación por pares y para la combinación de los genotipos positivos o negativos para T ($p<0,05$). De manera análoga, los ORs resultaron significativos para la comparación CT vs CC: OR= 2,53 [1,127-5,700]; TT vs CC: OR= 4,9 [1,714-14,004]; para CT+TT vs CC: OR= 2,9 [1,347-6,416]; y para TT vs CC+CT: OR= 2,675 [1,111-6,441]; se presentan en la Tabla III.

El polimorfismo analizado se encontró en Equilibrio de Hardy Weinberg en el grupo control.

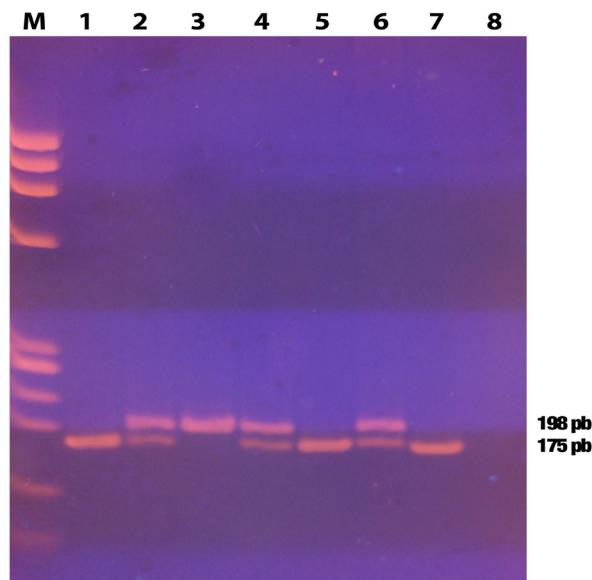


Fig. 1. Imagen de un gel de agarosa al 2% del producto de digestión con la enzima *HinfI*. Análisis del polimorfismo 677C>T. M: marcador de peso molecular ϕ 174 x Hae III. 1: control positivo homocigoto TT para el corte de la enzima *HinfI* y genera una banda de 175 pb, la banda de 23 pb no se evidencia en el gel. 2: control positivo heterocigoto CT es cortado por la enzima y produce una banda de 198 pb, una de 175 pb, la banda de 23 pb no se evidencia en el gel. 3: homocigoto CC no es cortado y genera un fragmento de 198 pb. 4,6: heterocigoto CT. 5,7: homocigoto TT. 8: control de sistema, mezcla de reacción sin ADN.

TABLA I
DEFECTOS DEL TUBO NEURAL. DISTRIBUCIÓN SEGÚN EL SEXO. RECURRENCIA

Defecto	n	Sexo			Recurrencia
		Femenino	Masculino	Desconocido	
Anencefalia	25	14	9	2	2
Anencefalia y Raquisquisis	5	2	3		
Anencefalia y Mielomeningocele	2		1	1	
Mielomeningocele	15	8	5	2	
Meningocele	5	3		2	
Encefalocele	2		1	1	

TABLA II
FRECUENCIA GENOTÍPICA Y ALÉLICA POR GRUPOS

	Grupo problema (n: 52, alelos: 104)	Grupo control (n: 119, alelos: 238)	p*
Genotipos			
CC	10 (19,23%)	49 (41,18%)	
CT	30 (57,69%)	58 (48,74%)	
TT	12 (23,08%)	12 (10,08%)	0,007
Alelos			
C	50 (48,08%)	156 (65,55%)	
T	54 (51,92%)	82 (34,45%)	0,002

*Por el test de χ^2

TABLA III
RIESGO DE DEFECTO DE TUBO NEURAL (ODDS RATIO)
EN GRUPO PROBLEMA Y GRUPO CONTROL

Genotipos	OR	IC 95%	p
CC	1		
CT	2,53	1,127-5,700	0,022
TT	4,9	1,714-14,004	0,002
CT+TT vs CC	2,9	1,347-6,416	0,005
TT vs CT+CC	2,675	1,111-6,441	0,024

OR: Odds ratio. 95% IC: 95% intervalo de confianza

DISCUSIÓN

Los DTN, son un problema de salud pública en el ámbito mundial, por su mortalidad, morbilidad, costo social y económico (51,52). En su conjunto, son una de las primeras causas de nacidos muertos, de mortalidad en la primera infancia y de minusvalías en los niños que sobreviven (9).

La etiología de los DTN es compleja y poco conocida (53), por lo que es importante identificar los factores de riesgo que afectan a una población.

Martínez y col citaron que factores nutricionales y genéticos han sido implicados en la etiología de estos defectos. La deficiencia de folato y una alteración en el metabolismo de la homocisteína dependiente del folato en las madres, como también la presencia de la enzima MTHFR termolábil, han sido asociadas con riesgo incrementado de tener hijos con DTN (54).

Se ha propuesto que existe asociación o predisposición a DTN, ante la presencia del polimorfismo 677C>T del gen de la enzima MTHFR. A los individuos homocigotos TT se les ha asociado con un mayor riesgo de DTN. Con el fin de investigar esta asociación, se han realizado múltiples estudios caso control en diferentes poblaciones, que han revelado una gran heterogeneidad en la prevalencia del polimorfismo 677C>T.

Mientras en ciertas poblaciones no se ha observado un riesgo incrementado de DTN para el genotipo TT, tales como Alemania (55), Francia (56), España (57), Turquía (58,59), Brasil (60), Chile (61). En otras poblaciones tales como Irlanda (52,62,63), Holanda (37,64), Polonia (65), Italia (66), Turquía (67), México (10,68), Puerto Rico (69), el presente estudio y estudios de meta-análisis (70-72) parecen indicar que el polimorfismo 677C>T se asocia con riesgo incrementado de DTN. En el presente estudio la asociación resultó significativa tanto con el genotipo materno 677TT como con el genotipo 677CT. La diferencia en los resultados es probablemente secundaria a la heterogeneidad poblacional y de diseño metodológico.

Estos resultados enriquecerán y reforzaran el asesoramiento genético de las familias con DTN en esta población, sugiriendo un régimen alimentario rico en folato, también permitirá sustentar la terapia preventiva con ácido fólico periconcepcional para este grupo problema y para las familias con afectados de DTN, la razón de administrar el requerimiento necesario desde antes de la concepción se debe a que el tubo neural se cierra entre los días 25 a 28 de la gestación, antes de que la mayoría de las mujeres se den cuenta de que están embarazadas; en la literatura revisada se observó que en Venezuela, las mujeres embarazadas que habían recibido ácido fólico, lo hicieron a partir del primer trimestre o después y otras no lo recibieron (30,73-75); de igual manera en el presente trabajo 50 mujeres recibieron ácido fólico a partir del segundo trimestre y dos nunca lo recibieron.

Además extender esta medida para la población general de mujeres en edad reproductiva, como ya lo han sugerido otros investigadores (76), a través de proyectos de intervención y promoción permanente acerca de los beneficios del consumo de ácido fólico y deben dar las orientaciones, para que se tomen algunas decisiones desde el punto de vista preventivo, tales como proponer al Ministerio del Poder Popular para la Salud, que se estudien posibles medidas de suplementación y fortificación con ácido fólico de alimentos de consumo masivo como harinas, cereales, pastas. Con la finalidad de reducir la recurrencia y ocurrencia de los DTN en nuestro país. Tanto, concentraciones bajas de folato, como la homocisteína elevada asociada con genotipos CT y TT, pueden ser corregidas con la administración de ácido fólico (63).

La dosis recomendada de ácido fólico para la prevención de DTN en todas las mujeres en edad reproductiva es de 0,4 mg por día (77), sin embargo, en los casos en que existe el antecedente de familiares o hijos con DTN se deben consumir 4 mg diarios (78). El suplemento debe administrarse como mínimo desde un mes antes de la concepción y durante el primer trimestre de

la gestación. Mosley y col. (79) han citado que la organización encargada de la regulación de drogas y alimentos en Estados Unidos ha propuesto la fortificación de cereales en una cantidad de 140 µg de ácido fólico por 100 g de cereal .

Dada la trascendencia en el ámbito familiar, social y económico de estos problemas; es necesario seguir investigando para ayudar a resolver los problemas metodológicos y hacer estudios multicéntricos para evaluar los puntos que aún están en controversia.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia (Proyecto CC – 0361 – 13). A Enrique Alejandro Machín Morales por toda la ayuda prestada.

REFERENCIAS

1. **Stevenson R, Seaver L, Collins J, Dean J.** Neural tube defects and associated anomalies in South Carolina. *Birth Defects Res Part A.* 2004; 70: 554-558.
2. **Czeizel A, Dudás I, Paput L, Bánhidly F.** Prevention of neural-tube defects with periconceptional folic acid, methylfolate, or multivitamins?. *Ann Nutr Metab* 2011; 58: 263-271.
3. **Van Der Put N, Van Straaten H, Trijbels F, Blom H.** Folate, homocysteine and neural tube defects: An over view. *Exp Biol Med* 2001; 226 (4): 243-270.
4. **Greene N, Stanier P, Copp A.** Genetics of human neural tube defects. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 113-129.
5. **Greene N, Copp A.** Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube. *Prenat Diagn* 2009; 29: 303-311.
6. **Mitchell L.** Epidemiology of neural tube defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2005; 135: 88-94.
7. **Au K, Ashley-Koch A, Northrup H.** Epidemiologic and genetic aspects of Spina bifida and other neural tube defects. *Dev Disabil Res Rev* 2010; 16(1): 6-15.
8. **Hernández M, Romero M, Morales A, Angarita M, Silva Ch, Delgado W, et. al.** Defectos del tubo neural en productos de abortos espontáneos. *Rev Obstet Ginecol Venez* 2009; 69(1):12-19.
9. **Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF.** Genética de las enfermedades comunes con herencia compleja. En: Thompson & Thompson. *Genética en medicina.* 7ª edición. España: Editorial Elsevier Masson; 2008.p.151-174.
10. **Martínez L, Delgado I, Valdéz R, Ortíz R, Rojas A, Limón C, Sánchez M, Ancer J, Barrera H, Villarreal J.** Folate levels and N⁵, N¹⁰ Methylenetetrahydrofolate reductase genotype (MTHFR) in mothers of offspring with neural tube defects: A case-control study. *Arch Med Res* 2001; 32: 277 – 282.
11. **Smithells R, Sheppard S, Schorah C.** Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 1976; 51: 944-950.
12. **Smithells R, Sheppard S, Schorah C, Seller M, Nevin N, Harris R, Read A, Fielding D.** Apparent prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Arch Dis Child* 1981; 56: 911-918.
13. **Sheppard S, Nevin N, Seller M, Wild J, Smithells R, Read A, Harris R, Fielding D, Schorah C.** Neural tube defect recurrence after partial vitamin supplementation. *J Med Genet* 1989; 26: 326-329.
14. **Milunsky A, Jick H, Jick S, Bruell C, MacLaughlin D, Rothman K.** Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *JAMA* 1989; 262: 2847-2852.
15. **Shaw G, Schaffer D, Velic E, Morland K, Harris J.** Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural

- tube defects. *Epidemiology* 1995; 6: 219-226.
16. **Martínez L, Limón C, Valdez R, Sánchez M, Villarreal J.** Efecto de la administración semanal de ácido fólico sobre los valores sanguíneos. *Salud Públ México* 2001; 43 (2): 103-107.
 17. **Morris J, Wald N.** Quantifying the decline in the birth prevalence of neural tube defects in England and Wales. *J Med Screen* 1999; 6: 182-185.
 18. **Castilla E, Orioli I, López J, Dutra M, Nazer J.** Latin American collaborative study of congenital malformations (ECLAMC). Preliminary data on changes in neural tube defect prevalence rates after folic acid fortification in South America. *Am J Med Genet* 2003; 123A: 123-128.
 19. **Shurtleff D.** Epidemiology of neural tube defects and folic acid. *Cerebrospinal Fluid Res* 2004; 1: 5.
 20. **Corral E, Moreno R, Pérez G, Ojeda M, Valenzuela H, Reascos M, Sepúlveda W.** Defectos congénitos cráneo-encefálicos: variedades y respuesta a la fortificación de la harina con ácido fólico. *Rev Méd Chile* 2006; 134(9): 1129-1134.
 21. **Nazer H, Cifuentes O, Aguila R, Juárez M, Cid M, Godoy M.** Effects of folic acid fortification in the rates of malformations at birth in Chile. *Rev Med Chile* 2007; 135: 198-204.
 22. **Calvo E, Biglieri A.** Impacto de la fortificación con ácido fólico sobre el estado nutricional en mujeres y la prevalencia de defectos del tubo neural. *Arch Argent Pediatr* 2008; 106(6): 492-498.
 23. **Barboza M, Umaña L.** Impacto de la fortificación de alimentos con ácido fólico en los defectos del tubo neural en Costa Rica. *Rev Panam Salud Pública* 2011; 30 (1): 1-6.
 24. **Agüero O, Layrisse M.** Megaloblastic anemia of pregnancy in Venezuela. *Am J Obstet Gynecol* 1958; 76: 903-908.
 25. **Layrisse M, Agüero O, Blumenfeld N, Wallis H, Dugarte I, Ojeda A.** Megaloblastic anemia of pregnancy: characteristics of pure megaloblastic anemia and megaloblastic anemia associated with Iron deficiency. *Blood* 1960; 15: 724-740.
 26. **Diez-Ewald M.** Anemia del embarazo. Revisión. *Invest Clin* 1991; 32(1): 41-54.
 27. **Molina R, Diez-Ewald M.** Anemia nutricional del embarazo en Maracaibo. Venezuela. *Invest Clin* 1971; 39: 15-28.
 28. **Diez-Ewald M, Molina R.** Iron and folic acid deficiency during pregnancy in western Venezuela. *Am J Trop Med Hyg.* 1972; 587-591.
 29. **Molina R, Diez-Ewald M, Fernández G, Velazquez N.** nutricional anaemia during pregnancy. A comparative study of two socio-economic classes. *J Obstet Gynecol Brit Comm* 1974; 81(6): 454-458.
 30. **Diez-Ewald M, Fernández G, Oberto J, Molina R.** Nutritional anemia during pregnancy. A study in a middle class population treated with placebo. *Invest Clin* 1975; 16 (2): 51-59.
 31. **Diez-Ewald M, Vizcaíno G, Zambrano-Rodríguez N.** Niveles de ácido fólico y vitamina B12 en habitantes de la ciudad de Maracaibo. *Invest Clin* 1987; 28 (2): 75-85.
 32. **Carruyo-Vizcaíno C, Diez-Ewald M, Vizcaíno G, Arteaga-Vizcaíno M.** Concentración de hemoglobina y nutrientes en una población estudiantil adolescente de bajos recursos económicos. Relación con el rendimiento académico. *Invest Clin* 1990; 31 (4): 189-205.
 33. **Carruyo-Vizcaíno C, Vizcaíno G, Diez-Ewald M, Arteaga-Vizcaíno M, Torres-Guerra E.** Concentración de hemoglobina y nutrientes en adolescentes de clase social media. Relación con el rendimiento académico. *Invest Clin* 1995; 36 (3): 117-130.
 34. **Diez-Ewald M, Torres E, Layrisse M, Leets I, Vizcaíno G, Arteaga-Vizcaíno M.**

- Prevalence of anemia, iron, folic acid and vitamina B12 deficiency in two Bari indian communities from Western Venezuela. *Invest Clin* 1997; 38(4): 191-201.
35. **Diez-Ewald M, Torres-Guerra E, Leetz I, Layrisse M, Vizcaíno G, Arteaga-Vizcaíno M.** Anemia en poblaciones indígenas del occidente de Venezuela. *Invest Clin* 1999; 40 (3): 191-202.
 36. **García-Casal M, Landaeta M, Osorio C, Leets I, Matus P, Fazzino F, Marcos E.** Ácido fólico, vitamina B12 en niños, adolescentes y mujeres embarazadas en Venezuela. *An Venez Nutr* 2005; 18 (2): 1-10.
 37. **Van Der Put N, Gabreëls F, Stevens E, Smeitink J, Trijbels F, Eskes T, Van den Heuvel L, Blom H.** A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1044-1051.
 38. **Goyette P, Sumner J, Milos R, Duncan A, Rosenblatt D, Matthews R, Rozen R.** Human methylene-tetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994; 7: 195-200.
 39. **Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Mathews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LA.** A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10 (1): 111-113.
 40. **Mattson M, Shea T.** Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neuro Sci.* 2003; 26: 137-146.
 41. **Jacques P, Bostom A, Williams R, Ellison C, Eckfeld J, Rosemberg I, Selhub J, Rozen R.** Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine concentrations. *Circulation.* 1996; 93: 7-9.
 42. **Vizcaíno G, Diez-Ewald M, Herrmann F, Schuster G, Pérez-Requejo J.** Relationships between homocysteine, folate and vitamina B12 levels with the methylenetetrahydrofolate reductase poly-morphism, in Indians from Western Venezuela. *Thromb Haemost.* 2001; 85: 186-187.
 43. **Vizcaíno G, Diez-Ewald M, Herrmann F, Schuster G, Torres-Guerra E, Arteaga-Vizcaíno M.** La homocisteinemia y su relación con el polimorfismo de la metilentetrahidrofolato reductasa en varios grupos étnicos del occidente de Venezuela. *Invest Clin.* 2005; 46 (4):347-355.
 44. **Unfried G, Griesmacher A, Weismüller W, Nagele Fritz, Huber J, Tempfer C.** The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and idiopathic recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol.* 2002; 99: 614-619.
 45. **Rosenquist T.** Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: Effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 15.227-15.232.
 46. **Suárez-Obando F, Ordóñez A, Zarante I.** Defectos del tubo neural y ácido fólico: patogenia, metabolismo y desarrollo embriológico. Revisión de la literatura. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 2010; 60: 49-60.
 47. **Pineda-Del Villar L, Navarro-Serrano G, Del Villar A.** Defectos del tubo neural en el hospital Pedro Garcia Clara. Estado Zulia. Venezuela. *Invest Clin.* 1993; 34(1): 41-52.
 48. **Gustincich S, Carminci P, Del Sal G, Mamfiolli G, Schneider C.** A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques.* 1991; 11: 300-302.
 49. **Pierce B.** Genética poblacional y evolutiva. En: *Genética un enfoque conceptual.* 2da. Edición. Editorial Médica Panamericana, SA. 2006. 676-720.
 50. **Iniesta R, Guinó E, Moreno V.** Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit.* 2005; 19 (4): 333-341.

51. Pitkin R. Folate and neural tube defects. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85(Suppl): 285-288.
52. Shields D, Kirke P, Mills J, Ramsbottom D, Molloy A, Burke H, Weir D, Scott J, Whitehead A. 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.* 1999; 64: 1045-1055.
53. Padmanabhan R. Etiology, patogénesis and prevention of neural tube defects. *Congenital Anomalies.* 2006. [citado 11 Noviembre 2012]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1741-4520.2006.00104.x/pdf>.
54. Martínez de Villarreal L, Villarreal J, Arredondo P, Hernández R, Velasco M, Ambriz R, Herrera J, Yañez J, Morales J, Treviño M, Limón A, Guzmán A, Bárcenas M, Cepeda J, Sánchez A, Hernández R, García J, Garza J, Tijerina M, García C, Negrete R. Decline of neural tube defects cases after a folic acid campaign in Nuevo León, México. *Teratology.* 2002; 66: 249-256.
55. Stegmann K, Ziegler A, Ngo E, Kohlschmidt N, Schröter B, Ermert A, Koch M. 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: 23-29.
56. Mornet E, Muller F, Leavoisé A, Delezoide A, Col J, Simón B, Serre J. Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects. *Hum Genet.* 1997; 100: 513-514.
57. Gutiérrez J, Pérez F, Calvo M, Tamparillas M, Gracia J. Implicación de los polimorfismos C677T y A1298C del gen MTHFR en el desarrollo de los defectos del tubo neural en la población española. *Med Clin (Barc)* 2003; 120 (12): 441-445.
58. Erdogan MO, Yildiz SH, Solak M, Eser O, Cosar E, Eser B, Koken R, Buyukbas S. C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene does not affect folic acid, vitamin B12, and homocysteine serum levels in Turkish children with neural tube defects. *Genet Mol Res* 2010 Jun 22; 9(2):1197-203.
59. Eser B, Cosar M, Eser O, Erdogan MO, Aslan A, Yildiz H, Boyaci G, Buyukbas S, Solak M. 677C>T and 1298A>C polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase gene and biochemical parameters in Turkish population with spina bifida occulta. *Turk Neurosurg.* 2010; 20(1):9-15.
60. Alvarez A, D'Almeida V, Vergani N, de Oliveira A, de Lima F, Brunoni D. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): Incidence of mutations C677T and A1298C in brazilian population and its correlation with plasma homocysteine levels in spina bifida. *Am J Med Genet* 2003; 119A: 20-25.
61. Nitsche F, Alliende M, Santos J, Pérez F, Santa María L, Hertrampf D, Cortés F. Frecuencia del polimorfismo C677T de la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en mujeres chilenas madres de afectados con espina bifida y en controles normales. *Rev Méd Chile* 2003; 131: 1399-1404.
62. Parle-McDermott A, Mills J, Kirke P, O'Leary V, Swanson D, Pangilinan F, Conley M, Molloy A, Cox C, Scott J, Brody L. Analysis of the MTHFR 1298A→C and 677C→T polymorphisms as risk factors for neural tube defects. *J Hum Genet* 2003; 48: 190-193.
63. Kirke P, Mills J, Molloy A, Brody L, O'Leary V, Daly L. Impact of the MTHFR C677T polymorphism on risk of neural tube defects: case-control study. *BMJ.* 2004; 328(7455): 1535-1536.
64. 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.** Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995; 346 (8982): 1070-1071.
65. **Pietrzyk J, Bik-Multanowski M, Sanak M, Twardowska M.** Polymorphisms of the 5, 10-methylenetetrahydrofolate and the methionine synthase reductase genes as independent risk factors for spina bifida. *J Appl Genet* 2003; 44(1): 111-113.
66. **De Franchis R, Buoninconti A, Mandato C, Pepe A, Sperandeo MP, Del Gado R, Capra V, Salvaggio E, Andria G, Mastroiacovo P.** The C677T mutation of the 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene is a moderate risk factor for spina bifida in Italy. *J Med Genet.* 1998; 35(12):1009-1013.
67. **Boduroglu K, Alanay Y, Alikasifoglu M, Aktas D, Tuncbilek E.** Analysis of MTHFR 1298A>C in addition to MTHFR 677C>T polymorphism as a risk factor for neural tube defects in the Turkish population. *Turk J Pediatr* 2005; 47 (4): 327-333.
68. **Blanco J, Lacasaña M, García R, Borja V, Hernández C, Aguilar C.** Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and the risk of anencephaly in Mexico. *Mol Hum Reprod* 2007; 13(6):419-24.
69. **García Fragoso L, García-García I, De la Vega A, Renta J, Castilla C.** Presence of the 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T mutation in Puerto Rican patients with neural tube defects. *J Child Neurol* 2002; 17:30-32.
70. **Van Der Put N, Eskes T, Blom H.** Is the common 677C→T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. *Q J Med.* 1997; 90: 111-115.
71. **Yan L, Zhao L, Long Y, Zou P, Ji G, Gu A, Zhao P.** Association of the maternal MTHFR C677T polymorphism with susceptibility to neural tube defects in offsprings: Evidence from 25 case-control studies. *Plos One* 2012; 7: e41689.
72. **Zhang T, Lou J, Zhong R, Wu J, Zou L, Sun Y, Lu X, Liu L, Miao X, Xiong G.** Genetic variants in the folate pathway and the risk of neural tube defects: A meta-analysis of the published literature. *Plos One* 2013; 8: e59570.
73. **Molina R, Diez-Ewald M.** Efectos de la terapéutica con hierro y hierro-folato en la anemia nutricional de la embarazada. Comunicación preliminar. *Invest Clin* 1972; 13(2): 44-57.
74. **Diez-Ewald M, Fernández G, Velásquez N, Molina R.** Importancia de la administración prenatal de ácido fólico en el estado hematológico de la madre y el recién nacido. *Invest Clin* 1973; 14(2): 58-73.
75. **Diez-Ewald M, Fernández G, Bonilla E, Portillo B, Vizcaíno G, Machado H.** Concentraciones séricas de ácido fólico y cinc en suero materno y cordón umbilical. Influencia en el desarrollo del embarazo y el parto y condiciones del recién nacido. *Invest Clin* 1988; 29(4): 205-217.
76. **Diez-Ewald M.** ¿Por qué ácido fólico? Editorial. *Invest Clin* 2000; 41(1): 1-2.
77. **Department of Health and Human Services: Public Health Service.** Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of Spina bifida and other neural tube defects. *MMWR* 1992; 41 (RR-14): 1-7.
78. **MRC Vitamin Study Research Group.** Prevention of neural tube defect: results of The Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991; 338: 131-137.
79. **Mosley B, Cleves M, Siega-Riz A, Shaw G, Canfield M, Kim Waller D, Werler M, Charlotte A.** Neural tube defects and maternal folate intake among pregnancies conceived after folic acid fortification in the United States. *Am J Epidemiol* 2009; 169: 9-17.