



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y

NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**"ESTUDIO MULTICÉNTRICO DE FACTORES DE RIESGO
GENÉTICO ASOCIADOS AL MIELOMENINGOCELE".**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:

Dra. Gabriela Ortiz Cruz

TUTOR DE TESIS

Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz

Jefe del Departamento de Genética

INCMNSZ

México, D.F.

Julio 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Es un sentimiento maravilloso el descubrir las características unificadoras de un complejo de fenómenos diversos que parecen totalmente desconectados en la experiencia directa de los sentidos”. “Todo debe simplificarse hasta donde sea posible, y nada más”.

Albert Einstein

Dedicatoria
A Lia, mi razón

Agradecimientos.

A la siempre incondicional, la inquebrantable, mi madre.

A mis hermanos por su apoyo, paciencia y consejos.

A Alberto y Lia por ser mi motivo e inspiración.

A mi maestro el Dr. O. Mutchinick, por haber despertado en mi la alegría por el trabajo y el conocimiento.

A este Instituto, a mis compañeros de generación y a mis compañeros de trabajo, por forjarme con su existencia y amistad como un mejor médico y como un mejor ser humano.

Gabriela Ortiz C.

RESUMEN

Introducción. Los defectos del tubo neural (DTN) constituyen un grupo heterogéneo, complejo y frecuente de malformaciones congénitas (MC). El mielomeningocele (MMC) es una de las variedades más frecuentes de DTN. En México la prevalencia de DTN es de 1/364 nacimientos y la de MMC es de 1/1000 nacimientos. El MMC es un problema de salud pública en nuestra población y se requieren de investigaciones con el propósito de identificar factores de riesgo genéticos y ambientales asociados a esta MC. **Objetivos.** Investigar y caracterizar ciertas variantes genéticas como factores asociados al desarrollo del MMC y valorar su utilidad como estimadores del riesgo en nuestra población.

Métodos. Mediante discriminación alélica por PCR en tiempo real se analizaron 5 variantes (SNP) en los genes *ALDH1L1*, *ATIC*, *BHMT*, *GART* y *NCAM1* seleccionados de acuerdo a su evidencia reportada de asociación con MMC. Se analizó una muestra de 250 tríos completos provenientes de 15 centros de Rehabilitación Infantil Teletón de 15 diferentes estados del país, así como a 250 controles (recién nacidos vivos no malformados, pareados por región de nacimiento con los casos).

Resultados. Al comparar frecuencias genotípicas y alélicas entre casos y controles no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Tras la estratificación por sub-fenotipos, la variante alélica G del gen *NCAM1* mostró un OR de 2.22 (IC 95% 1.18-4.30; $X^2=6.99$; $p=0.008$) al comparar el grupo de localización lumbosacro con el resto. La variante *ALDH1L1* mostró transmisión preferencial del alelo G (TDT $X^2=4.813$; $p=0.03$). En el análisis de interacción génica no se encontraron interacciones significativas.

Conclusiones. La magnitud de las diferencias observadas para las frecuencias alélicas entre nuestra muestra y las de otras poblaciones de diferente origen étnico puede ser un indicador de las características propias de nuestra población. Además puede reflejar la necesidad de realizar estudios de este tipo en cada población específica. Al estratificar por sub-fenotipos de localización se encontró que la variante rs2298526 del gen *NCAM1* (A>G) representa un factor de riesgo para el MMC de localización más inferior (OR de 2.22 para MMC lumbosacro). Dado el patrón de expresión de *NCAM1* durante la neurulación y los resultados encontrados en este estudio sería conveniente evaluar a este gen no solo en el riesgo para MMC y otras variedades de espina bífida abierta, si no también en la espina bífida oculta. Nuestros resultados apoyan el papel que desempeñan los genes *NCAM1* y *ALDH1L1* en el riesgo de desarrollar MMC en nuestra población. Estos hallazgos permiten apoyar la hipótesis de que mecanismos genéticos diversos pueden participar en el desarrollo de esta MC. En estudios futuros será importante la validación de nuestros hallazgos en una o más muestras de MMC de la población mestiza-mexicana y de las diversas etnias de nuestro país.

Palabras clave. MMC, DTN, estudio de asociación, variantes genéticas, SNP.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	6
INDICE DE FIGURAS	8
INDICE DE TABLAS	9
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES	12
2.1. Generalidades/Conceptos	12
2.2. Embriogénesis del tubo neural	14
2.2.1. Morfogénesis normal de la placa y tubo neurales.....	16
2.2.2. Biología celular y molecular de la formación del neuroepitelio y cierre del tubo neural..	22
2.3. Características epidemiológicas de los defectos del tubo neural	25
2.4. Etiología del mielomeningocele y factores de riesgo reconocidos	26
2.5. Análisis de genes candidato en la etiología del mielomeningocele	28
2.6. Presentación clínica del mielomeningocele	30
2.7. Valoración y tratamiento integrales de los individuos con mielomeningocele	31
2.8. Morbilidad / Mortalidad / Pronóstico	31
2.9. Prevención	33
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
4. JUSTIFICACIÓN	35
5. HIPÓTESIS	36
6. OBJETIVOS	
6.1. Objetivo general	36
6.2. Objetivos específicos	36
7. METODOLOGÍA	
7.1. Diseño del estudio	37
7.2. diseño de la muestra	37
7.2.1. Cálculo del tamaño de muestra	39
7.2.2. Criterios de inclusión.....	39
7.2.3. Criterios de no inclusión	39
7.2.4. Criterios de eliminación de casos.....	40
7.3. Metodología para el estudio de genotipificación	
7.3.1. Selección de variantes génicas para su genotipificación.....	40
7.3.1.1. Gen <i>ALDH1L1</i>	42
7.3.1.2. Gen <i>ATIC</i>	43
7.3.1.3. Gen <i>BHMT</i>	44
7.3.1.4. Gen <i>GART</i>	45
7.3.1.5. Gen <i>NCAM1</i>	47
7.3.2. Toma de muestras biológicas para extracción de ADN.....	48
7.3.3. Obtención de células para extracción de ADN	48
7.3.4. Extracción de ADN	49
7.3.5. Dilución de muestras	49
7.3.6. Genotipificación de las variantes genéticas mediante el uso de sondas TaqMan	49
7.4. Análisis estadístico de los resultados	
7.4.1. Variables en estudio	50

7.4.2. Análisis general	50
7.4.3. Análisis de tríos	50
7.4.4. Análisis de casos y controles	51
8. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	51
9. RESULTADOS	52
10. DISCUSIÓN.....	62
BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXOS	
Anexo I	77
Anexo II.....	80
Anexo III	85

ABREVIATURAS

10f-THF: 10-formil tetrahidrofolato.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AF: Ácido fólico.

ALDH1L1: miembro L1 de la familia 1 de aldehído deshidrogenasa.

ARN: ácido ribonucleico.

ATIC: 5-aminoimidazol 4-carboxido ribonucleotido formiltransferasa.

BHMT: betaína-homocisteína S-metiltransferasa.

BMP: proteína morfogenética ósea.

CAM: molécula de adhesión celular.

CBS: cistationina-beta sintetasa.

CRIT: centro de rehabilitación infantil Teletón.

DHFR: dihidrofolato reductasa.

DHLP: punto de flexión dorsolateral (*dorsolateral hingepoint*).

DTN: Defectos del tubo neural.

EACG: encuesta de antecedentes clínico-genéticos.

EB: Espina bífida.

EBA: Espina bífida abierta.

EBO: Espina bífida oculta.

EFCA: encuesta de frecuencia de consumo de alimentos.

GAG: glucosaminoglucano.

GART: sintetasa de fosforibosilglicinamida.

HapMap-ASW: población del proyecto HapMap con ancestría africana, residentes en el suroeste de EUA.

HapMap-CEU: población del proyecto HapMap con ancestría del norte y occidente de Europa, residentes en Utah.

HapMap-JPT: población japonesa de Tokyo, del proyecto HapMap.

HapMap-Mex: población del proyecto HapMap con ancestría mexicana, residentes en los Ángeles, California.

MAF: frecuencia del alelo menor.

MC: Malformaciones congénitas.

MDR: programa de reducción de dimensionalidad multifactorial (*multifactor dimensionality reduction*).

MeSH: *medical subject headings*.

MHP: punto de flexión medio (*midline hinge point*).

MMC: Mielomeningocele.

mARN: ARN mensajero

MTHFR: metilendetrahidrofolato reductasa.

MTR: metionina sintetasa.

MTRR: metionina sintetasa reductasa.

NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada.

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida.

NCAM1: molécula de adhesión celular neuronal 1.

NCBI: centro nacional de información biotecnológica.

OR: razón de momios.

PAX3: factor 3 de la familia de factores de transcripción *paired box*.

PCP: vía de señalización de polaridad celular planar.

PF: Post-fecundación.

RN: recién nacido.

RR: riesgo relativo.

SDG: Semanas de gestación.

SHH: *Sonic hedgehog*.

SNC: Sistema nervioso central.

SNP: polimorfismo de nucleótido único.

TCNII: transcobalamina II.

TDI: prueba de desequilibrio de transmisión.

THF: tetrahidrofolato.

TN: Tubo neural.

TYMS: timidilato sintetasa.

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Clasificación general de la espina bífida	13
Figura 2. Formación del tubo y cresta neurales	16
Figura 3. Embrión de 16 días, disco embrionario	17
Figura 4. Superficies dorsales del disco embrionario durante la tercera semana de gestación	18
Figura 5. Prolongación notocordal.....	18
Figura 6. Desarrollo de la placa neural.....	19
Figura 7. Desarrollo de la placa, surco y pliegue neurales	19
Figura 8. Neurulación en embriones humanos.....	20
Figura 9. Secuencia rostrocaudal del cierre del tubo neural	21
Figura 10. Morfogénesis y biomecánica del proceso de flexión de la placa neural	23
Figura 11. Localización por estado en la República Mexicana de los diversos Centros de Rehabilitación Infantil participantes	37
Figura 12. <i>ALDH1L1</i> , estructura genómica.....	42
Figura 13. Reacciones dentro de la vía de folatos.....	43
Figura 14. <i>ATIC</i> , estructura genómica	44
Figura 15. <i>BHMT</i> , estructura genómica.....	44
Figura 16. Ciclos de folato y de metionina.....	45
Figura 17. <i>GART</i> , estructura genómica.....	46
Figura 18. <i>NCAM1</i> , estructura genómica.....	47
Figura 19. Distribución de la localización del MMC	52
Figura 20. Frecuencia alélica de las variantes estudiadas en nuestra muestra y en otras poblaciones	63
Figura 21. Frecuencia alélica del gen <i>NCAM1</i> , de acuerdo al nivel del MMC.....	66
Figura 22. Diferencia en la frecuencia del alelo G del gen <i>NCAM1</i> en MMC de localización alta y en MMC de localización baja	67

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Clasificación embriológica de los defectos del tubo neural	14
Tabla 2. Clasificación clínico-neurológica y radiológica del disrafismo espinal.....	15
Tabla 3. Genes que han mostrado asociación significativa para DTN.....	41
Tabla 4. Detalle de las variantes génicas seleccionadas	42
Tabla 5. Detalle de las sondas Taqman para las variantes genéticas en estudio.....	50
Tabla 6. Comparación de frecuencias alélicas previamente reportadas en distintas poblaciones y las encontradas en este estudio en los casos y controles	53
Tabla 7. Comparación de frecuencias genotípicas previamente reportadas en distintas poblaciones y las encontradas en este estudio en los casos y controles	54
Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas para las variantes génicas en estudio en los diferentes grupos analizados en la muestra	55
Tabla 9. Comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas entre casos y controles, incluyendo solo los genotipos homocigotos.....	56
Tabla 10. Frecuencias alélicas y genotípicas, de las variantes en estudio de acuerdo al nivel de localización del MMC.	57
Tabla 11. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas entre los grupos de localización alta y los de localización baja.....	58
Tabla 12. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas entre el grupo de MMC de localización alta y los controles	59
Tabla 13. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas entre el grupo de MMC de localización baja y los controles.....	60
Tabla 14. Resultados de la prueba TDT para los tríos y las variantes en estudio.....	61
Tabla 15. Resultados que muestran diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias génicas entre nuestra población y otras de diferente origen étnico.	63
Tabla 16. Equilibrio Hardy-Weinberg para las variantes génicas.....	77
Tabla 17. Frecuencias “p” y “q” para <i>ALDH1L1</i> y <i>NCAM1</i> por grupo.....	77
Tabla 18. Frecuencias de p^2 , $2pq$ y q^2 para <i>ALDH1L1</i> y <i>NCAM1</i> en los distintos grupos en estudio	78
Tabla 19. Frecuencias esperadas para <i>ALDH1L1</i> y <i>NCAM1</i> por grupo	78
Tabla 20. Tabla comparativa de las frecuencias observadas y esperadas para <i>ALDH1L1</i> y <i>NCAM1</i> en los distintos grupos en estudio	78
Tabla 21. Tabla del cálculo de X^2 para <i>ALDH1L1</i> y <i>NCAM1</i>	79
Tabla 22. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas entre el fenotipo torácico y el resto (toracolumbar-lumbar-lumbosacro-sacro).	80

Tabla 23. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas entre el fenotipo toracolumbar y el resto (torácico-lumbar-lumbosacro-sacro).....	81
Tabla 24. Comparación de frecuencias genotípicas y alélica entre el fenotipo lumbar y el resto (torácico-toracolumbar-lumbosacro-sacro).....	82
Tabla 25. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas entre el fenotipo lumbosacro y el resto (torácico-toracolumbar-lumbar -sacro).....	83
Tabla 26. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas entre el fenotipo sacro y el resto (torácico-toracolumbar-lumbar-lumbosacro).	84
Tabla 27. Resultados TBA para casos pareados con controles en modo exhaustivo.	85
Tabla 28. Resultados TBA para análisis con tríos en modo exhaustivo	85
Tabla 29. Resultados TBA para casos pareados con controles y para tríos, en modo forzado para cada una de las posibles combinaciones génicas	85

1. INTRODUCCIÓN.

Las malformaciones congénitas (MC) afectan aproximadamente a 1 de cada 33 nacimientos. Según la Organización Mundial de la Salud ⁽³²⁾ resultan en 3.2 millones aprox. de discapacidades por año ⁽³³⁾. Se ha estimado que en el mundo, cada año 270,000 recién nacidos mueren durante el período perinatal a consecuencia de alguna MC mayor. En la mayoría de las poblaciones estudiadas los defectos del tubo neural (DTN) representan las MC más frecuentes, después de las cardiopatías congénitas ⁽¹⁾. Los DTN constituyen un grupo heterogéneo, complejo y frecuente de malformaciones congénitas del sistema nervioso central que resultan de falla en los procesos de neurulación ^(1, 67-68). La anencefalia y la espina bífida (EB) en sus diversas variedades representan más del 90% de los tipos de DTN. EB es el término general para los DTN que afectan la región espinal distinguiéndose dos tipos principales: la EB quística o abierta (EBA) y la EB cerrada u oculta (EBO).

La prevalencia al nacimiento de los DTN varía de 1 a 10 por cada 1000 recién nacidos entre poblaciones de distintos países, así como dentro de un mismo país ^(1, 10). En nuestra población la prevalencia de DTN (incluyendo anencefalia, EB y encefalocele) es de 2.75 por 1000 RN, es decir 1 de cada 364 nacimientos ^(3, 68). La variedad más frecuente de las EB es el mielomeningocele (MMC), representando el 80% aproximadamente. En nuestra población la frecuencia del MMC es de 1 por cada 1000 nacimientos ⁽³⁾.

La gravedad del MMC varía de acuerdo a su nivel de localización y tamaño (extensión) del defecto, siendo causa frecuente de mortalidad en el periodo perinatal, sea por el defecto *per se* o por complicaciones asociadas a dicha MC. Los afectados que sobreviven al periodo crítico, son sometidos a tratamientos quirúrgicos requiriendo posteriormente de un estrecho seguimiento en condiciones especiales de controles periódicos cercanos, que necesitan de equipos multidisciplinarios para el tratamiento de las complicaciones frecuentes, tanto neurológicas como de otros órganos y de tratamientos a muy largo plazo de rehabilitación sensorial y motora ^(37, 40, 50, 52). Además del problema médico que representan estas MC también afectan emocionalmente al paciente y su familia, y constituyen un considerable costo económico para las familias de los afectados y para los diferentes sistemas de salud del país.

2. ANTECEDENTES.

Entendiendo el problema de salud que representan los DTN, en especial el MMC, es necesario obtener el mayor grado de conocimiento posible sobre sus causas y mecanismos de desarrollo, para así poder establecer estrategias de prevención y/o tratamiento que permitan reducir su frecuencia y complicaciones asociadas. Como primer paso en la adquisición de este conocimiento, es importante analizar el panorama actual que se tiene, dado el avance científico, sobre el desarrollo normal del tubo neural (TN).

A continuación se tratará a detalle primero sobre el desarrollo embrionario normal del tubo neural, previa descripción de las generalidades relacionadas a estas MC, y posteriormente sobre distintos aspectos del MMC como son su comportamiento epidemiológico, modelos animales, estudios de asociación en distintas poblaciones así como los factores de riesgo reconocidos, medidas preventivas, entre otros.

2.1. Generalidades / Conceptos.

Los defectos del tubo neural constituyen un grupo de malformaciones frecuentes que en general pueden dividirse en presentaciones craneales y/o espinales ⁽⁴⁴⁾. Las presentaciones craneales incluyen: anencefalia, encefalocele, craneoraquisquisis y seno dérmico congénito. Las espinales incluyen: EB abierta (quística) y cerrada.

El término **disrafismo** (del Griego $\delta\nu\sigma$ = mal y $\rho\alpha\phi\eta$ = sutura) se refiere a un cierre defectuoso del TN, y por tanto solo debe aplicarse a anomalías de la neurulación primaria ⁽⁵⁷⁾. Sin embargo su uso se ha ampliado para incluir todo trastorno espinal congénito en el que hay diferenciación anómala y/o cierre incompleto de las estructuras dorsales de la línea media: piel, músculos, vertebras, meninges y sistema nervioso ⁽⁵⁸⁾. A causa de su origen embriológico común, las anomalías espinales caudales también se incluyen en este grupo.

El término **Espina Bífida** (EB) se refiere a una fusión defectuosa en la región posterior de los elementos óseos espinales. Los **defectos espinales** clásicamente se categorizan en defectos abiertos o en defectos cerrados (Figura 1), en base a consideraciones embriológicas y a la presencia o ausencia de tejido neural expuesto. Los términos de EB quística y de EB oculta se utilizan para referirse a los defectos espinales abiertos y cerrados (Tabla 2), respectivamente, los cuales se detallan a continuación:

❖ **Defectos espinales abiertos ó EB quística:** resultan de una falla de fusión de los pliegues rostrales del TN entre los días 18 y 28 de desarrollo embrionario. El tejido neural y/o meninges están expuestos al ambiente externo a través de un defecto óseo congénito ⁽⁴²⁾. Las lesiones pueden ocurrir en cualquier sitio a lo largo de la espina, pero son más frecuentes en la región lumbosacra. Suelen involucrar otras regiones del SNC (*por ej.:* hidrocefalia y/o malformación de Chiari asociadas) y en general se acepta que son a causa de una falla en el proceso de neurulación primaria. El tipo más frecuente de EB abierta, y por mucho, es el MMC.

❖ **Defectos espinales cerrados ó EB oculta:** se localizan y confinan a la médula y clásicamente se acepta que son el resultado de una falla en la neurulación secundaria. El tejido neural no está expuesto y se observa completamente epitelizado, aunque la piel que le recubre puede ser displásica ⁽⁴³⁾. Pueden haber estigmas cutáneos de su presencia como: un nevo veloso, hemangiomas capilares, hoyuelos, manchas hipocrómicas, distrofia y masas subcutáneas. Este tipo de defecto, como hallazgo radiológico único y en ausencia de manifestaciones cutáneas o neurológicas, es muy común ($\approx 5\%$ de la población general) y no confiere un riesgo incrementado de DTN para la descendencia, ni de recurrencia para la hermandad del afectado.

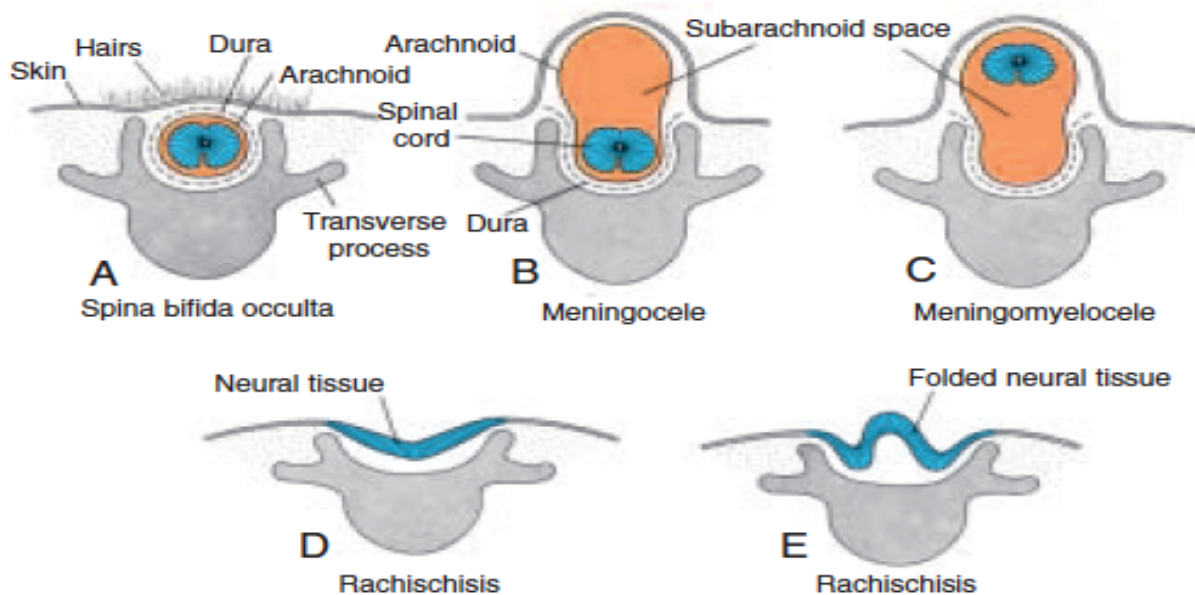


Figura 1. Clasificación general de la espina bífida. A. Espina bífida oculta. B-E. Diversos tipos de espina bífida abierta. Moore ⁽³⁵⁾.

De acuerdo a su clasificación categórica por probable origen embriológico (Tabla 1) o por las manifestaciones clínico-neurológicas y radiológicas (Tabla 2), se reconocen distintos tipos de DTN.

Tabla 1. Clasificación embriológica de los defectos del tubo neural.

Categoría	Nombre	Definición / Origen ^(*)
Neurulación primaria	Craneoraquisquisis	Cordón espinal abierto, expuesto / Falla en los pliegues neurales para elevarse y fusionarse desde la región del cerebro posterior y a lo largo de toda la columna espinal.
	Anencefalia	Ausencia de bóveda craneal y de tejido cerebral reconocible / Falla de los pliegues neurales craneales para elevarse y fusionarse.
	Mielomeningocele	Segmento de cordón espinal abierto que protruye a través de un defecto óseo posterior en la línea media / Originado por falla de los pliegues neurales lumbares y/o sacros para elevarse y fusionarse.
	Lipoma	Masa dorsal en la línea media cubierta por una mezcla de tejidos que contiene células grasas y que protruye a través de una espina ósea bífida / “Disyunción prematura del ectodermo cutáneo del neuroectodermo”* y dispersión de células mesenquimatosas hacia el interior del tubo neural donde se vuelven células grasas.
	Variedades de lipoma	Lipomielomeningocele, lipomielocele, lipoma intradural.
	Hemimielomeningocele o hemimielocele	Un MMC o un meningocele en la mitad de un cordón espinal caudal dividido / Falla en la neurulación de uno de los dos cordones. Se consideran anomalías de gastrulación y de neurulación primaria
Neurulación secundaria	Filum terminal estrecho (con médula anclada)	Filum terminal anormalmente corto y grueso / Originado por falta de diferenciación retrogresiva del tubo neural secundario.
	Lipoma del filum terminal	Engrosamiento fibrolipomatoso del filum terminal. Causado por células totipotenciales residuales de la eminencia caudal y que se diferencian hacia tejido graso*.
	Mielocistocele lumbar	Dilatación quística del tubo neural caudal, sin conexión abierta hacia el canal central más rostral / Regresión incompleta del ventrículo terminal.
Gastrulación y formación de la notocorda	Regresión caudal / agenesia caudal	Secuencia malformativa: agenesia de la columna espinal, ano imperforado, agenesia de ductos urogenitales, displasia-aplasia renal e hipoplasia pulmonar / Defecto de las células notocordales para formar el notocordo.
	Diastematomelia	Cordón espinal caudal duplicado / Falla en los dos primordios del notocordo para integrarse en la línea media durante la gastrulación. Puede haber anomalía de segmentación vertebral, EB y escoliosis.
	Otros trastornos de la integración notocordal	Fístula entérica dorsal, Quistes neuroentéricos, Seno dérmico.

(*) Ver sección de Embriogénesis del TN para correlación. *Tomada y modificada de Tortori-Donati (57).*

Tabla 2. Clasificación clínico-neurológica y radiológica del disrafismo espinal.

Clasificación	Tipos
Disrafismo espinal abierto	MMC, Mielocele, Hemimielomeningocele, Hemimielocele
Disrafismo espinal cerrado	<p>Con masa subcutánea lumbosacra: Lipoma con defecto dural (lipoMMC, lipomielosquisis), Mielocistocele terminal, Meningocele.</p> <p>Con masa subcutánea cervical: mielocistocele cervical, MMC cervical, Meningocele.</p>
	<p>Sin masa subcutánea:</p> <p>✓Estados disráficos simples: EB posterior, lipoma intradural e intramedular, lipoma del filum terminal, filum terminal estrecho, cordón espinal anormalmente largo, ventrículo terminal persistente.</p> <p>✓Estados disráficos complejos: Fístula entérica dorsal, Quiste neuroentérico, malformaciones de división del cordón (diastematomelia, diplomelia), seno dérmico, síndrome de regresión caudal, disgenesia espinal segmentaria.</p>

Otro término a tener en cuenta es el de **placoda**, la cual representa un segmento de tejido neural embrionario no neurulado, es decir, congelado en el estadio de placa neural ⁽⁵⁸⁾.

En todos los defectos espinales abiertos se encuentra una placoda, y en varios tipos de defectos espinales cerrados es posible su presencia. La placoda se puede categorizar como terminal o segmentaria, dependiendo de su localización a lo largo del cordón espinal. Una placoda terminal se localiza en el extremo caudal del cordón espinal, y a su vez puede ser apical o parietal, dependiendo de si involucra el mismo ápex o un segmento más largo del cordón.

2.2. Embriogénesis del tubo neural.

Los defectos del tubo neural resultan de una interrupción en la cascada embriogenética normal que ocurre durante un período limitado y específico de tiempo, entre las semanas 2 y 4 del desarrollo embrionario humano para el caso de las EBA y entre las semanas 5 y 6 para las EBO.

El proceso de desarrollo de esta cascada embriogenética incluye tres etapas principales: la de gastrulación (semanas 2 a 3), la etapa de neurulación primaria (semanas 3 a 4), y la de neurulación secundaria y de diferenciación retrogresiva (semanas 5 a 6)⁽³⁴⁻³⁶⁾ (Figura 2).

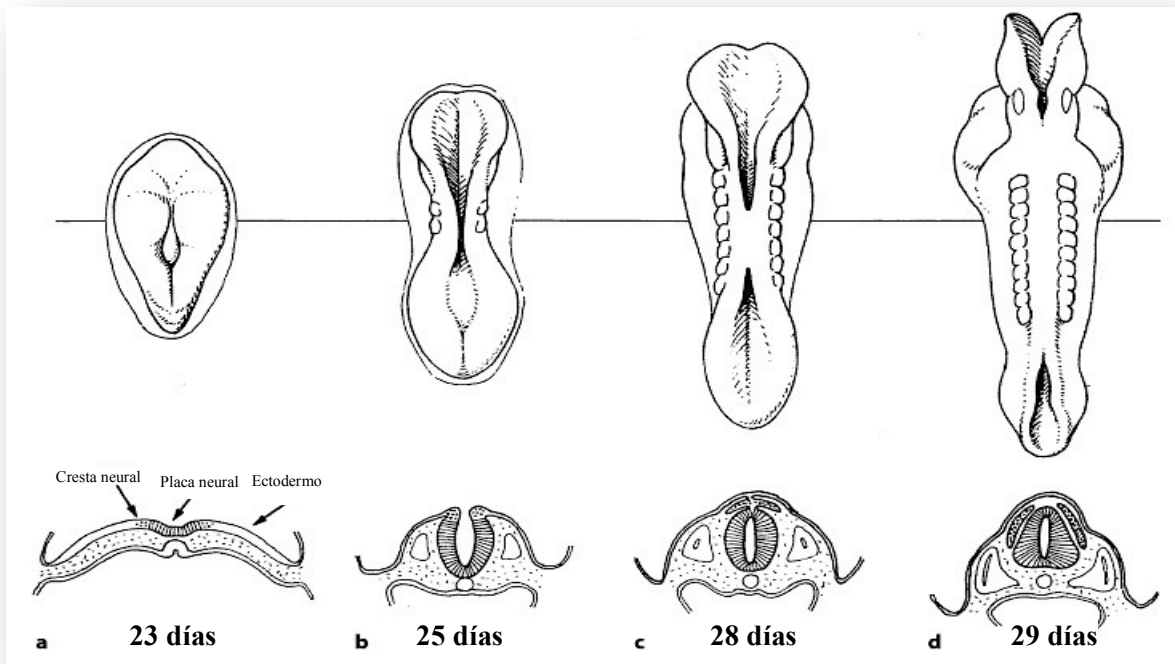


Figura 2. Formación del tubo y cresta neurales. Vistas dorsales y secciones transversales de embriones humanos donde se aprecia la elongación de la placa neural (a), canalización de la misma (a y b), elevación de las pliegues neurales laterales (b) así como su fusión (c) y el cierre del tubo neural (d). Tomado y modificado de (78).

2.2.1. Morfogénesis normal de la placa y tubo neurales.

Tras la fecundación y durante las primeras dos semanas del desarrollo embrionario el cigoto se convertirá en un organismo multicelular mediante un proceso de segmentación; hacia el tercer día post-fecundación (PF) se distinguirá como una mórula dentro de la cual se diferenciarán dos grupos celulares: el de células internas y el de células externas. Hacia el 4-5 días PF el embrión se denomina blástocisto y contiene dos capas suspendidas entre los sacos amniótico y de Yolk. La primera segregación dentro de la masa celular interna forma el hipoblasto que contiene las células que generarán al embrión y al epiblasto dentro del cual se forma el amnios que encerrará a la cavidad amniótica. Estos eventos tempranos son importantes para la formación de la **placa procordal** (día 13 PF) que constituye la primera característica morfológica de la orientación craneocaudal.

Durante la tercera y cuarta semanas de gestación (SDG) el embrión es conocido como néurula, caracterizado por el desarrollo del TN a partir de la placa neural. La néurula es la primera manifestación del sistema nervioso y de la etapa de gastrulación (tercera SDG), la cual se describe a continuación.

A la vez que se forma la placa procordal, en el extremo caudal del embrión aparece en la línea media la **estría primitiva** la cual se elongara durante los siguientes tres días hasta alcanzar su longitud final (16 día PF).

Mientras la estría se desarrolla, las células de su zona profunda migran y forman el mesénquima. Una parte del tejido mesenquimatoso origina el mesoblasto que formara el mesodermo intraembrionario.

Algunas células del epiblasto desplazan al hipoblasto, formando el endodermo intraembrionario en el techo del saco vitelino. Las células restantes del epiblasto dan lugar al ectodermo intraembrionario. Es así como mediante el proceso de gastrulación, las células del epiblasto originan tres capas germinativas en el embrión.

En el extremo craneal de la estría primitiva se forma el nodo de Hensen que contiene una depresión central, la fóvea primitiva. Algunas células mesenquimatosas del nodo y de la estría migran prospectivamente, formando la **prolongación notocordal** (día 16 PF) que se elongara (día 17-21 PF) en sentido craneal hasta la **lámina procordal** donde el ectodermo y endodermo están en contacto. Durante este evento, la estría primitiva degenera hasta desaparecer en la región sacrococcígea del embrión (Figuras 3 y 4).

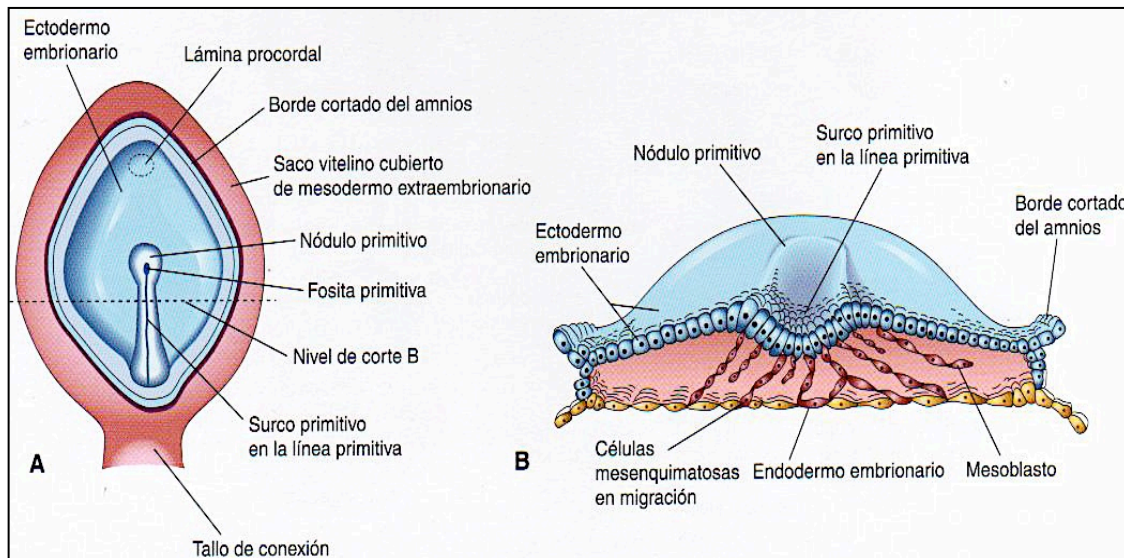


Figura 3. A) Embrión de 16 días de edad, con amnios extirpado para visualizar disco embrionario. **B)** Mitad craneal del disco embrionario; migración de células mesenquimatosas desde la línea primitiva para formar el mesoblasto que da origen al mesodermo embrionario; la mayoría del endodermo embrionario surge también del epiblasto. Moore ⁽³⁵⁾.

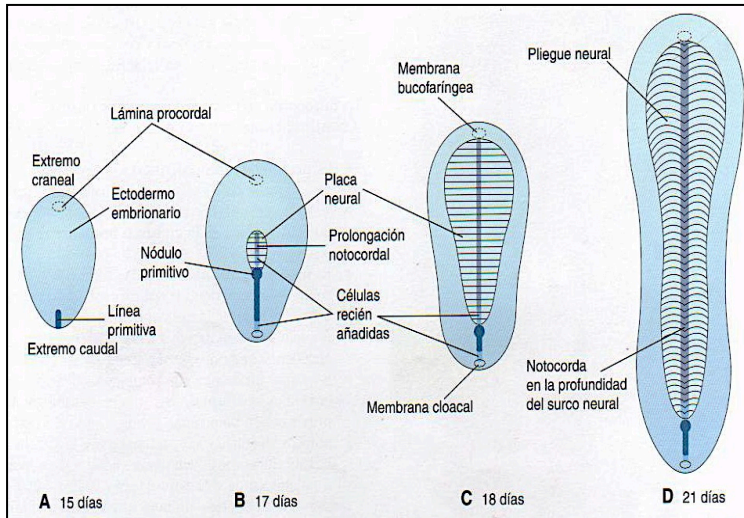


Figura 4. Superficies dorsales del disco embrionario durante la tercera semana de gestación. La línea primitiva y la prolongación notocordal se elongan. La prolongación notocordal y el mesodermo vecino inducen la formación de la placa neural en el ectodermo suprayacente. A finales de la 3 SDG, la prolongación notocordal se transforma en notocorda. *Moore (35)*.

El suelo de la prolongación notocordal se fusiona con el endodermo embrionario subyacente alrededor de los días 18 a 20 PF. Tras procesos degenerativos graduales este suele desaparecer comunicando el canal notocordal con el saco vitelino. El resto de la prolongación notocordal forma una **lámina ó placa notocordal**.

Cuando la prolongación notocordal alcanza la lámina procordal las células notocordales comienzan a proliferar y la lámina notocordal se invagina para originar la **notocorda**, la cual se extiende desde la membrana bucofaringea hasta el nódulo primitivo. La notocorda induce el engrosamiento del ectodermo embrionario suprayacente y forma la **placa neural** (Figura 5), el origen del SNC. La notocorda degenera y desaparece a medida que se forman los cuerpos vertebrales, y persiste posteriormente como núcleo pulposo de cada disco intervertebral.

El ectodermo de la placa neural (**neuroectodermo**) dará origen al SNC: encéfalo y médula espinal, además de otras estructuras como la retina. El neuroectodermo humano es visible hacia el 16 día PF como un epitelio columnar pseudoestratificado sobre la línea media de la notocorda. Al inicio la placa neural tiene una longitud similar a la de la notocorda

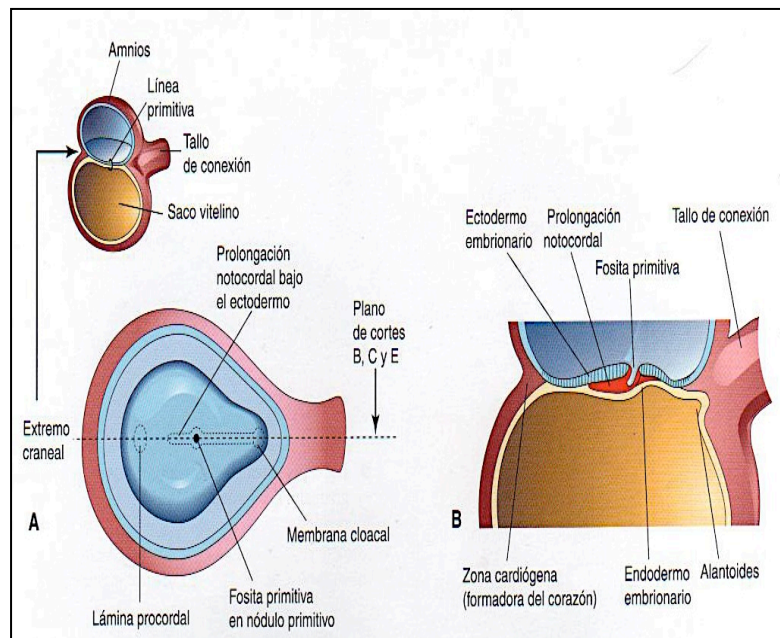


Figura 5. Prolongación notocordal. A. Vista dorsal del disco embrionario, 16 dpf. B. Corte medial que ilustra el desarrollo del proceso y canal notocordales en etapas iniciales. *Moore (35)*.

El ectodermo de la placa neural (**neuroectodermo**) dará origen al SNC: encéfalo y médula espinal, además de otras estructuras como la retina. El neuroectodermo humano es visible hacia el 16 día PF como un epitelio columnar pseudoestratificado sobre la línea

media de la notocorda. Al inicio la placa neural tiene una longitud similar a la de la notocorda

subyacente. A medida que la notocorda se alarga, la placa neural se ensancha y finalmente se prolonga hasta la membrana bucofaringea, más allá de la notocorda (Figura 6).

Alrededor del día 18, la placa neural se invagina a lo largo de su eje central para formar un *surco neural medio longitudinal*, los pliegues neurales laterales a este surco continúan elevándose para converger hacia la línea media, formando un tubo neural cerrado (Figura 7).

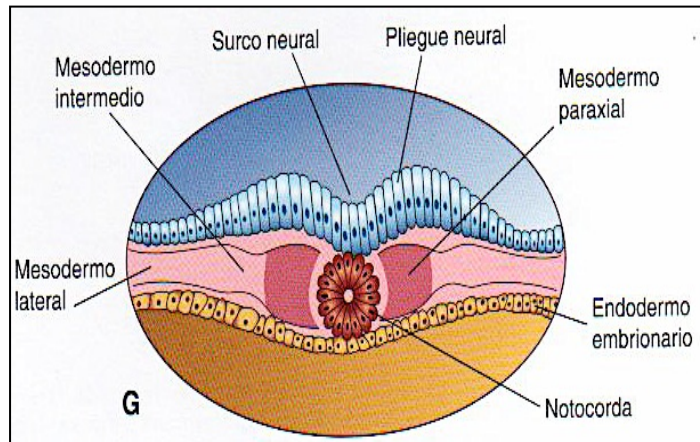


Figura 7. Desarrollo de la placa, surco y pliegues neurales ⁽³⁵⁾.

Durante los días 19 a 21 PF las **células de la cresta neural** migran en sentido dorsolateral a cada lado formando la **cresta neural**. Estas células también migran en distintas direcciones y se dispersan dentro del mesénquima, sometiendo a diferenciación terminal hacia una gran variedad de tipos celulares (melanocitos, células de Schwann, ganglios raquídeos y los del sistema nervioso autónomo, las cubiertas meníngeas del SNC, y la médula suprarrenal). La cresta neural continúa su desarrollo hasta el 32 día PF, después de que los pliegues neurales se han fusionado.

Conforme se forman la notocorda y el TN, el mesodermo embrionario prolifera lateralmente formando el mesodermo paraxial. Hacia el final de la 3 SDG este mesodermo se diferencia e inicia su división en pares de somitas, alcanzando un número de 38 pares hacia los días 20-30 PF. Las somitas originarán las vértebras y los músculos esqueléticos, así como la dermis adyacente de la piel. La formación de somitas a partir del mesodermo paraxial, según estudios

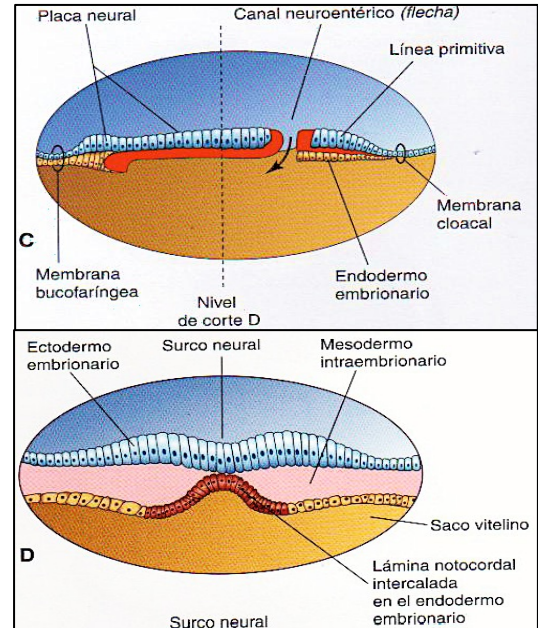


Figura 6. Desarrollo de la placa neural. ⁽³⁵⁾

El cierre del TN implica la aposición y fusión primero del ectodermo cutáneo y luego del neuroectodermo. El ectodermo cutáneo se separa del neuroectodermo (proceso llamado disyunción) mientras el TN se cierra, posteriormente el ectodermo de superficie se diferencia hacia la epidermis.

experimentales, implica la expresión de genes de la vía de señalización Notch, genes *Hox* y otros factores de señalización.

Lo mencionado corresponde al proceso de **neurulación primaria** el cual es un desarrollo morfológico complejo caracterizado por varios eventos relacionados, que son: 1) La organización del neuroepitelio para formar la placa neural; 2) La invaginación de la placa neural, primero en el surco neural y luego a lo largo de los bordes laterales del tubo neural, resultando en elevación y aposición en la línea media de los pliegues neurales y 3) Fusión de los pliegues neurales laterales para cerrar el TN (Figura 8).

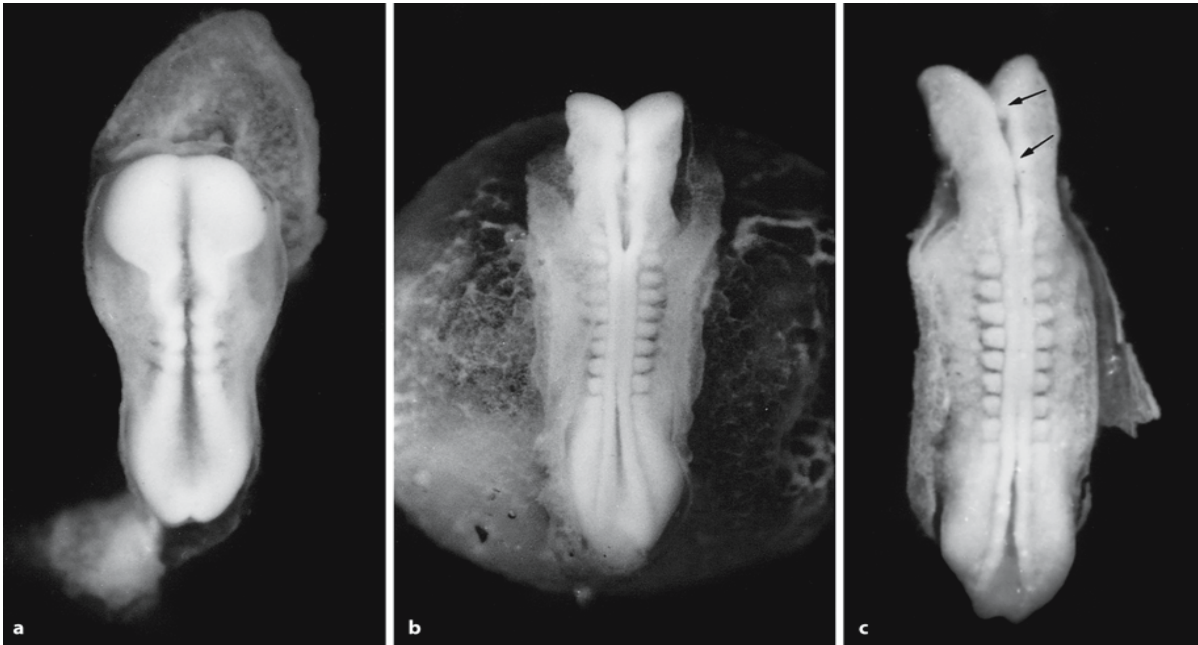


Figura 8. Neurulación en embriones humanos. a) Embrión de 5 somitas en estadio 10 de Carnegie. b) Embrión de 10 somitas en estadio 10 Carnegie. c) Embrión en misma etapa que el de (b), pero en el que el TN se a cerrado a nivel de la futura región cervical. Se observa otro sitio de iniciación del cierre del TN en la unión mesencefálica-rombencefálica (flechas inferiores), y las paredes mediales del mesencéfalo parecen hacer contacto una con la otra (flechas superiores). (78)

El cierre del TN en el humano ocurre durante un período de 4 a 6 días, en forma de oleadas de cierre a lo largo del neuroeje craneocaudal ⁽²³⁾. En el humano, la primer parte del TN en cerrar es la región del rombencéfalo caudal o **cordón espinal craneal**. El *neuroporo anterior* o cefálico se cierra entre los días 24-25 PF y el *neuroporo posterior* o caudal (cuando existen 25 pares de somitas) entre los días 26-27 PF. Posteriormente el TN se diferenciará en encéfalo y médula espinal mientras que las crestas neurales formarán el sistema nervioso periférico y parte del sistema nervioso autónomo. Paralelo al proceso de la neurulación primaria, el mesodermo lateral para-axial formará los *arcos vertebrales posteriores*. Con el cierre del neuroporo caudal el sistema nervioso es cubierto en su totalidad con piel. Se ha estimado que

el sitio de cierre del neuroporo caudal es opuesto a las somitas 30/31 ⁽²⁴⁾, correspondientes al nivel de la segunda vértebra sacra, y en general se acepta que el neuroporo caudal se cierra entre las vértebras torácica 11 y segunda sacra (Figura 9).

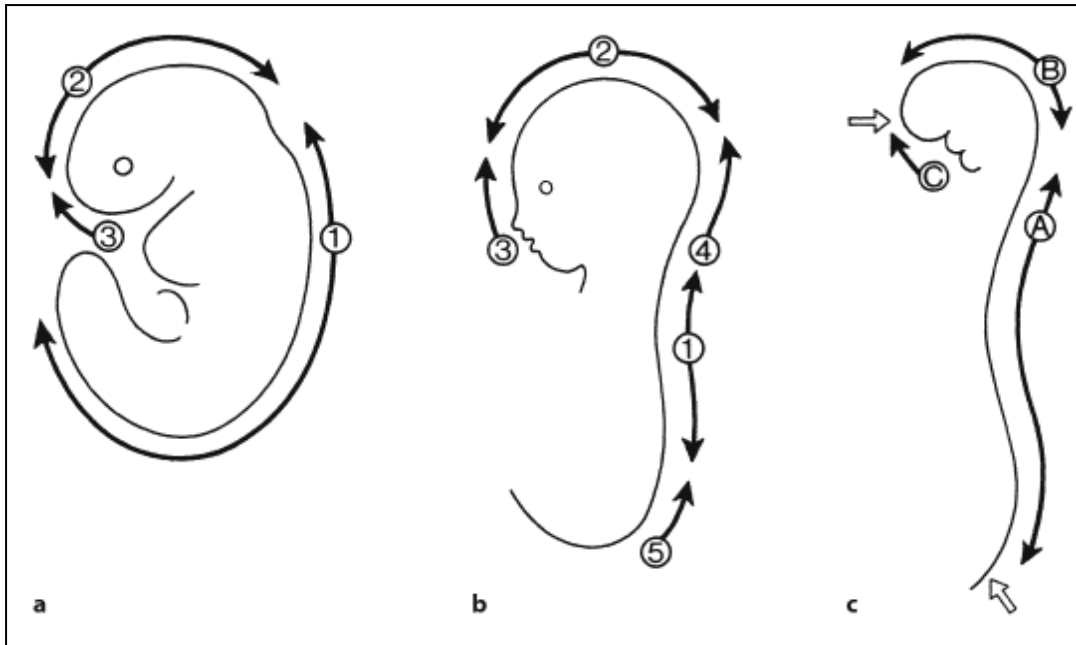


Figura 9. Secuencia rostrocaudal del cierre del tubo neural. (a) Embriones de ratón. (b) Modelo multicierre de Van Allen ⁽⁸⁰⁾; (c) Cierre multisitio del TN, tal como se observa en embriones humanos (Nakatsu et al.⁷⁹). ⁽⁷⁸⁾

El cierre del neuroporo craneal y la oclusión del tubo neural craneal establecen el sistema ventricular craneal, el cual una vez aislado se somete a presión intraluminal que provee una fuerza conductora para el crecimiento cerebral. Una falla para mantener esta presión conductora en pacientes con defectos abiertos del TN se ha propuesto como mecanismo para la génesis de la malformación de Chiari frecuentemente asociada⁽²⁵⁾.

El desarrollo de los metámeros sacrocóccigeos del cordón espinal y filum terminal (caudales al neuroporo posterior) ocurre por **neurulación secundaria** y diferenciación retrogresiva, procesos que continúan hasta el día 48 aproximadamente. La neurulación secundaria se da principalmente por medio de condensación y epitelización, sin invaginación neural. Hacia este momento los remanentes de la estría primitiva han sufrido regresión hacia el polo embrionario caudal y forman una masa de células totipotenciales que conforman la **eminencia caudal media**. Hacia los días 25 a 27, la eminencia caudal se extiende del neuroporo posterior hacia la membrana cloacal dando lugar al TN sacro-caudal correspondiente al filum terminal y a las vértebras caudales a la segunda sacra por un mecanismo de canalización. El lumen de este TN se continuará con el del tubo neural primario. El siguiente evento tras la neurulación secundaria

es el de **diferenciación retrogresiva**, un proceso apoptótico en el que ocurre una combinación de regresión, degeneración y diferenciación posterior. *Finalmente se puede concluir que en el humano, la mayoría del cordón espinal (al menos hasta Sacra-2) se forma por neurulación primaria y el filum terminal y el cordón espinal sacro inferior se forman por neurulación secundaria.*

Existen dos teorías fundamentales respecto a la embriogénesis del mielomeningocele, ambas comprenden un trastorno de la neurulación primaria. La teoría de la falta de cierre, sugerida por von Recklinghausen, propone que los DTN representan una falla primaria en el cierre del tubo neural. En la teoría de la sobredistensión, introducida en 1769 por Morgagni y popularizada por Gardner, se propone que los DTN se originan a través de la sobredistensión y ruptura de un TN previamente cerrado. La teoría del no cierre es más ampliamente aceptada. La de la sobredistensión puede contribuir con ciertos modelos experimentales de DTN, particularmente los causados por vitamina A y los del ratón mutante T-curly⁽³¹⁾.

Una **falla en la neurulación primaria** dará lugar a defectos abiertos del tubo neural, mientras que una **falla o defecto en la neurulación secundaria** da lugar a defectos cerrados del tubo neural.

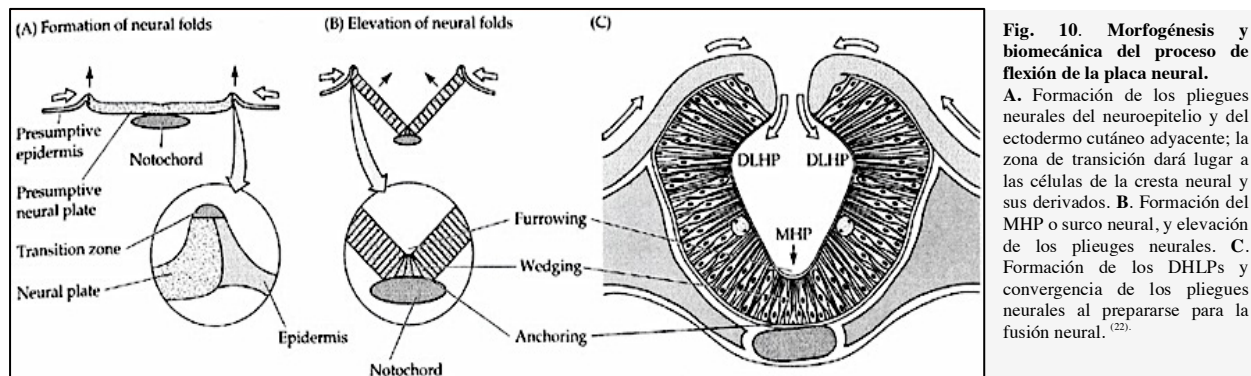
2.2.2. Biología celular y molecular de la formación del neuroepitelio y del cierre del tubo neural.

En los últimos años se ha logrado un mayor conocimiento del control molecular y genético del desarrollo neural temprano y vertebral, en particular a partir de modelos murinos. Momentos críticos en el desarrollo neuroembrionario son la inducción del neuroepitelio y la especificación de la notocorda por medio de factores de transcripción.

Durante la inducción del neuroepitelio para desarrollar la placa neural ocurren cambios en la forma celular como consecuencia de una reorganización de los microtúbulos así como por eventos de adhesión-interacción intercelular. La expresión de una proteína homeodominio Sonic hedgehog (SHH) por la notocorda controla la diferenciación de las motoneuronas del asta anterior. La proteína Sonic hedgehog es un importante morfógeno de transducción de señal cuyos receptores incluyen a las proteínas transmembrana patched y smoothed y que en unión receptor-ligando inician una cascada de señalización importante para el desarrollo embrionario. El evento final en la neurulación primaria es la convergencia medial y fusión de los

pliegues neurales. Varias observaciones sugieren que el gen homeobox *PAX3* tiene un papel importante en este proceso. Oligonucleótidos antisentido que bloquean la función de *Pax3* resultan en defectos del tubo neural en ratones ^(28, 56, 59). La aposición y fusión de los pliegues neurales laterales es la fase menos conocida de la neurulación. El comportamiento de células neuroepiteliales en aposición puede involucrar interacciones tipo molécula-molécula, molécula-célula o célula-célula.

En general, la neurulación suele referirse como el equivalente a la invaginación de la placa neural; tal proceso ha sido exhaustivamente estudiado en embriones de pollo e involucra varios eventos (Figura 10). El primero se refiere a cambios en la forma celular en la línea media de la placa neural; estas células cambian de una forma columnar a una en cuña para formar el surco neural o MHP (por sus siglas en inglés: Midline Hinge Point). Después, cambios similares ocurren en la forma celular en regiones discretas del TN dorsolateral, originando los DLHPs (por sus siglas en inglés: dorsolateral hinge points), a partir de los cuales los pliegues neurales laterales se elevan para aproximarse y fusionarse en la línea media. En embriones de mamíferos se han observado cambios morfológicos similares a los descritos



A partir de diversa evidencia experimental ⁽⁴⁵⁾ se ha sugerido que fuerzas extrínsecas al neuroepitelio promueven en parte el proceso de plegamiento del TN. La convergencia media del ectodermo cutáneo adyacente empujaría los pliegues neurales hacia la línea media; la expansión de la matriz extracelular mesodérmica o la acumulación de células mesodérmicas debajo del neuroepitelio elevarían los pliegues neurales suprayacentes; finalmente, la elongación del notocordio y/o del notoplato (es decir, el notocordio y las células del MHP suprayacentes) elongarían craneocaudalmente al TN y por simple deformación mecánica, dirigirían los pliegues neurales uno con otro (proceso referido como bamboleo o pandeo Euleriano).

Existe otro concepto tradicional, en el cual el proceso de plegamiento de la placa neural se conduce por cambios en la forma de la célula neuroepitelial; fue propuesto por His en 1984. His sugirió que si las células en una superficie plana cambian hacia una forma en cuña, ya sea por constricción apical o por expansión basal, la superficie se invaginará. El acuñaamiento parece restringirse a las regiones de los puntos de angulación (hinge points); consecuentemente, la placa neural se invagina en estos puntos específicos. La angulación del MHP, según estudios experimentales en los que se radia o remueve el notocordo, no es necesaria ni suficiente para que la neurulación ocurra. Además, si se aísla experimentalmente la placa neural de los tejidos más laterales, las células de las regiones MHP realizan la angulación pero no se da la neurulación. Lo anterior ha llevado a sugerir que la angulación del MHP dirige el doblamiento sitio específico. El DHLP tiene un papel más importante en el doblamiento de la placa neural. En embriones de pollo tratados con citocalasina D (un agente que altera los microfilamentos) no se desarrolla angulación en los DLHPs; los pliegues neurales en estos embriones fallan para converger, y por consecuencia presentan disrafismo.

Un tercer concepto tradicional es que el acuñaamiento celular es causado por la contracción de microfilamentos apicales orientados en forma circunferencial. La actina y la miosina se localizan ambas en los apices de las células neuroepiteliales, y los microfilamentos apicales se unen fuertemente a la meromiosina pesada, un componente del complejo actina-miosina. Finalmente, el calcio, un mediador de la contracción de microfilamentos, se ha encontrado en vesículas cubiertas en los apices de las células neuroepiteliales y es liberado durante la neurulación; el doblamiento de la placa neural se ve alterado por agentes que inhiben la liberación de calcio, y es promovido por agentes que la potencian.

Al menos tres mecanismos parecen contribuir por si solos o en combinación, con la fusión de los pliegues neurales: 1) Interacciones de glucoproteínas de superficie como glucosaminoglucanos (GAGs) y/o moléculas de adhesión celular (CAMs); 2) Interdigitación de filopodos o gemaciones de superficie celular; y 3) Formación de uniones (puentes) intercelulares. El reconocimiento de superficie celular puede ser el evento inicial que lleva a los pliegues neurales a una aposición. Procesos de interdigitación pueden contribuir para establecer las conexiones entre las superficies celulares en aposición. Finalmente, las uniones intercelulares pueden ayudar a establecer conexiones más permanentes entre las células neuroepiteliales adyacentes ^(22, 24, 62).

Las moléculas de adhesión celular NCAM, ECAM y la cadherina parecen ser importantes para la separación del neuroectodermo del ectodermo cutáneo. Antes de la neurulación, tanto las células epidermicas como las neuroectodermicas expresan ECAM. Mientras la neurulación procede, las células neuroepiteliales dejan de expresar ECAM y comienzan a expresar NCAM y cadherina; como resultado, los dos tipos de tejido cesan su adhesión y se disocian. En embriones de anfibios en los que se induce la expresión de NCAM en las células de superficie ectodérmica existen dificultades para separar el TN del ectodermo cutáneo ^(81, 62).

2. 3. Características epidemiológicas de los defectos del tubo neural.

La prevalencia al nacimiento de los DTN varía de 1 a 10 por 1000 recién nacidos entre poblaciones de distintos países, así como dentro de un mismo país ^(1, 10). En China la prevalencia es alta, con un aproximado de 27.4 casos por cada 10,000 embarazos ⁽²⁶⁾. En particular, la Provincia de Shanxi muestra la ocurrencia más alta de DTN, con una tasa reportada de 138.7-199.4/10,000 ⁽²⁷⁾. En México ⁽⁵⁾, la anencefalia tiene una prevalencia de 10.21 por cada 10,000 recién nacidos, y la EB de 11.21 por cada 10,000 recién nacidos; la prevalencia de EB y anencefalia al nacimiento es por tanto de 2.13 por cada 1,000 recién nacidos, es decir 1 de cada 467 nacimientos ⁽³⁾.

El MMC es el tipo más común de DTN, representando el 50% aproximadamente. En nuestra población la frecuencia del MMC es de 1 por cada 1000 nacimientos ⁽³⁾. Excluyendo a la anencefalia y al encefalocele, otros tipos de DTN son relativamente poco frecuentes ⁽⁶⁾. En estudios hechos previo a la disponibilidad del tamizaje prenatal y la suplementación vitamínica profiláctica, la incidencia al nacimiento de EB y anencefalia se reportaba mayor en la población blanca Europea que en la población negra ⁽³⁶⁾. En Norteamérica, el riesgo de DTN es mayor en la población hispana (más de 3 veces el riesgo respecto a la población blanca no hispana).

Estudios de migración en población blanca migrante muestran que la prevalencia de DTN corresponde al riesgo del lugar a donde han migrado en comparación con su lugar de origen, lo cual resalta la importancia de los factores ambientales en la patogénesis de estas MC. En contraste, estudios similares en descendientes de poblaciones negras y migrantes asiáticos en Europa y América del Norte no mostraron prevalencias substancialmente mayores que las de sus lugares de origen.

En cuanto a razón de géneros, únicamente la anencefalia muestra una preferencia por el género femenino, especialmente entre productos prematuros, observándose una proporción femenino:mascúlo de 3:1. Esta diferencia de géneros no se ha observado para otras variedades de DTN ⁽⁶⁹⁻⁷⁰⁾.

2.4. Etiología del Mielomeningocele y factores de riesgo reconocidos.

La etiología de los DTN en el ser humano es básicamente desconocida. Se acepta que tanto factores genéticos como ambientales contribuyen al desarrollo de estas MC. Reportes de casos y estudios epidemiológicos han identificado cierto número de factores no genéticos asociados, siendo los de mayor importancia la deficiencia de folatos y de vitamina B12 ^(4, 6), la hiperglicemia en relación a diabetes materna ⁽⁷⁾, la obesidad materna preconcepcional ⁽⁸⁾ y ciertos anticonvulsivantes como el valproato de sodio. La exposición a este último compuesto durante el período periconcepcional aumenta el riesgo para EB en ≈ 12 veces ⁽⁹⁾. La descendencia de madres con obesidad preconcepcional y la de madres diabéticas, tienen un riesgo relativo de 4.08 ⁽⁸⁾ y de 11.5 ⁽⁷⁾ respectivamente, de gestar un producto con un MMC.

El otro factor muy importante es la predisposición genética, fundamentada en hallazgos epidemiológicos de agregación familiar. Así, el riesgo de recurrencia de un DTN, en particular anencefalia y MMC para hermanos del afectado es 20 a 50 veces mayor que el riesgo de la población general, más aun para una pareja que haya tenidos dos o más hijos previos afectados o que existan en la familia antecedentes de otros casos con MMC, aunque sea de parentesco no tan cercano. La concordancia en gemelos monocigotos es considerablemente mayor que en gemelos dicigotos. El riesgo de recurrencia para los hermanos de gemelos monocigotos afectados es del 20%. Esta y otras líneas de evidencia epidemiológica han llevado a la conclusión de que más de 70% de la varianza fenotípica de los DTN es atribuible a factores genéticos ^(28, 47, 71).

La suplementación con 2-4 mg de ácido fólico (AF) durante el periodo periconcepcional, 8 semanas previas a la fecundación y un periodo similar posterior a esta, reduce el riesgo de recurrencia del MMC en un 70% y 0.4 mg administrados durante el mismo período, el de ocurrencia de casos nuevos en un 50% ^(15, 16).

En ratones con dieta deficiente en folatos se puede observar un retraso significativo del crecimiento, pero que no ocasiona *per se* DTN ⁽⁴⁷⁾. No se sabe exactamente por que

mecanismo la suplementación o fortificación con AF tiene un efecto preventivo sobre esta MC, aunque una serie de teorías existen al respecto. Unos proponen que niveles apropiados o elevados de AF o folatos favorecen diversos procesos relacionados con la proliferación celular coadyuvando a la síntesis de nucleótidos y la expresión génica ⁽⁴⁶⁾. También niveles séricos e intracelulares de folatos favorecen el buen funcionamiento de determinados sistemas metabólicos dependientes de metilación del ADN y control de los niveles de homocisteína ⁽⁴⁸⁾ que es un tóxico endotelial. Dentro del mismo conjunto de vitaminas del grupo B, la B2 actúa como cofactor de la enzima metilendetrahidrofolato reductasa (MTHFR), la B6 como cofactor de la cistationina-beta-sintetasa (CBS), otro mecanismo de degradación de la homocisteína, y la B12 que es cofactor para la metionina sintetasa (MTR), importante paso en la síntesis de metionina, aminoácido esencial para la iniciación de la síntesis de proteína en el ribosoma y base de la S-adenosil-metionina, reservorio principal de grupos metilos que participan en la regulación de la expresión génica a nivel del ADN e histonas. Por tanto, niveles séricos y celulares en una mujer, y el suplemento apropiado para el producto que se está gestando, favorecen considerablemente la prevención del MMC y otros DTN. Los niveles apropiados de 5,10-metilendetrahidrofolato, un genotipo homocigoto silvestre de la variante 677CC e incluso heterocigoto C677T del gen *MTHFR* y niveles normales de vitamina B2 garantiza niveles también normales de 5-MTHFR y disponibilidad de grupos metilo para satisfacer las necesidades del organismo.

Además se ha propuesto que una reducción del inositol sérico materno incrementa el riesgo de DTN en 2.6 veces ^(49, 55). A la fecha no se han reportado ensayos clínicos en humanos que prueben el papel del inositol en estas MC.

Ya que la embriogénesis neural en general, y la neurulación en particular involucran una red compleja de múltiples procesos celulares, de morfogénesis tisular, y de la expresión temporal de múltiples factores de transcripción y de señalización celular, no es sorprendente que el MMC sea el resultado de múltiples interacciones entre factores genéticos y ambientales. Los DTN son etiológicamente heterogéneos en su origen y representan el resultado final de diversas alteraciones durante el desarrollo embrionario ^(31, 10).

De acuerdo a lo expresado previamente, aún suplementando durante el periodo periconcepcional con la dosis recomendada de AF, aproximadamente 50% de los DTN escapan a la prevención esperada, pudiendo deberse a procesos y mecanismos independiente de la suplementación con esta vitamina del grupo B y deberse a una variación del genoma de los no

respondedores que aún no ha sido suficientemente estudiada. Siendo el MMC una afección de etiología multifactorial como la mayoría de la patología compleja común del niño y el adulto, debe descartarse el efecto de un gen mayor y mejor explorar el efecto pequeño de múltiples genes que en interacción entre sí y con factores ambientales diversos, en particular nutricionales, permita estimar el riesgo de ocurrencia y recurrencia para el MMC y otros DTN.

2.5. Análisis de genes candidato en la etiología del Mielomeningocele.

Investigaciones recientes sugieren que variantes génicas raras en uno o más genes pueden contribuir etiológicamente a trastornos complejos, incluyendo los DTN. Estudios de mutaciones en series de genes ortólogos que causan DTN en el ratón poco han aportado al conocimiento de la etiología de los DTN en el humano ^(10, 28-29, 47). El observar en modelos de ratones knockout para ciertos genes el desarrollo de DTN implica la existencia de genes de alta penetrancia para DTN ⁽²⁹⁾. Estudios de asociación en humanos en grupos de pacientes con MMC ^(63, 66), han mostrado resultados estadísticamente significativos en relación a ciertas variantes de genes relacionados a vías de señalización de polaridad celular planar (PCP)(vía no canónica de Wnt), de Sonic hedgehog (SHH), de BMP (bone morphogenetic protein), de Wnt y de Notch ⁽²⁸⁾. Recientemente se ha propuesto que procesos primarios de cilogénesis son importantes para la neurulación primaria por medio de su interacción con la vía de SHH ^(56, 72).

Determinados genes considerados como genes candidato pueden ser clasificados en tres categorías funcionales: 1) Genes relacionados a la metilación (*Por ej.: BHMT, CBS, DNMT3B, MTRR, MTR*), 2) Genes que codifican para enzimas del ciclo de folatos (*Por ej.: MTHFR, MTHFD1, DHFR, TYMS, TCNII, ALDH1L1, ATIC, GART, SARDH*) y 3) Genes relacionados al transporte de folatos (*Por ej.: SLC19A1, CUBN, FOLR2*).

Además existen grupos de genes cuyos productos participan en diferentes funciones celulares y síntesis de proteínas que colaboran en algunos de los procesos críticos para el cierre normal del tubo neural. Estos productos proteicos incluyen aquellos del citoesqueleto, los relacionados al ciclo celular y neurogénesis, los relacionados a viabilidad celular y los relacionados con interacciones superficie celular/matriz extracelular ^(10, 28, 47).

Durante los últimos 10 años un gran número de estudios se han enfocado en la investigación de genes que participan en el metabolismo de los folatos, de la vitamina B12 y de la homocisteína y su relación con los DTN. Estudios de variantes genéticas de genes del

metabolismo de folatos ^(63,66) en pacientes de razas diferentes han mostrado en diversas poblaciones, incluyendo la nuestra ⁽²¹⁾, ser factor de riesgo (FR) asociado a los DTN. El hallazgo más robusto obtenido ha sido el relacionado a dos variantes genéticas (C677T y A1298C) en el gen *MTHFR* las cuales se han asociado en general con un riesgo incrementado para DTN, 80% más de riesgo para un embrión homocigoto 677TT. La variante C677T del gen *MTHFR*, que porta la sustitución de un residuo de alanina por uno de valina, codifica para una variante termolábil que en un individuo con un genotipo TT reduce la actividad de la enzima *MTHFR* en un 70%, incrementando el riesgo para DTN (aproximadamente en 1.8 veces) así como los niveles de homocisteína, y condicionando alteraciones de la metilación global y específica del ADN. Lo anterior sobre todo en el caso de una dieta deficiente en folatos.

Nuestras investigaciones en genes del metabolismo de los folatos en población mestiza mexicana muestran que la prevalencia en sujetos normales de las variantes C677T y A1298C del gen *MTHFR* son muy diferentes a los de otras poblaciones, siendo la frecuencia del alelo T (58.6%) la más alta en numerosos estudios a la fecha ^(17, 19-21). En cambio la variante A1298C en nuestra población muestra una frecuencia considerablemente menor (14.7%) a la observada en población caucásica y anglosajona ⁽²⁰⁾. Estos hallazgos pueden explicar en parte la alta prevalencia de DTN observados en nuestra población. Diferencias similares observamos en variantes de otros genes como rs1805087 del gen *MTR*; rs1801394 de *MTRR*; rs2236225 de *MTHFD1*; rs1801198 de *TCN2*; del19pb de *DHFR*; rep28pb de *TYMS* y rs2424913 de *DNMT3b*. Recientemente mapeamos casi todo el país para la variante C677T en 3000 recién nacidos normales, observándose un claro gradiente de menor a mayor de norte a sur y de oeste a este del alelo de riesgo T (en preparación).

Ha sido demostrado que la variante C776G en el gen del transportador de la cobalamina (*TCN2*) disminuye la concentración celular y plasmática de la transcobalamina y por tanto, influye en la disponibilidad celular de vitamina B12. En población mexicana se ha observado una asociación entre este polimorfismo y los niveles de homocisteína ⁽¹⁷⁾ lo cual, hace a este gen otro candidato a ser estudiado en nuestra población como posible factor de predisposición para DTN. Las mutaciones en genes *PCP* contribuyen con un 0.75-22.2% de los DTN aislados, con una baja tasa mutacional en los DTN espinales, pero mayor en los defectos craneales (anencefalia) ⁽²⁹⁾.

Por todo lo mencionado, consideramos necesario la investigación de las causas genéticas en la etiología del MMC, en la que se incluyan múltiples genes implicados en distintas vías

bioquímicas y del desarrollo relacionadas con el proceso morfogénico normal del tubo neural, para lograr detectar posibles patrones de variantes de riesgo propios de nuestra población así como efectos de interacción génica de diferentes combinaciones genotípicas (Interacción gen-gen), que individualmente pudieran no mostrar asociaciones de riesgo estadísticamente significativas.

2. 6. Presentación clínica del Mielomeningocele.

La mayoría de los DTN son aparentes al momento del nacimiento. Los DTN cerrados tienen una presentación variable, lo más común es una masa quística y algún estigma cutáneo (ya sea un área de hipo o hiperpigmentación, aplasia cutis, seno dérmico congénito, teleangiectasia/hemangioma capilar, hipertrichosis, apéndices cutáneos, o una hendidura glútea asimétrica) ⁽³⁸⁾.

La segunda razón de búsqueda de atención médica, en este tipo de MC, es una asimetría en longitud y/o volumen de los miembros pélvicos. Otras presentaciones incluyen: escoliosis progresiva, dolor lumbar con o sin déficit neurológico dependiendo de su asociación con una médula anclada ⁽³⁹⁾.

Respecto al recién nacido con un DTN abierto, en específico con un **MMC**, es necesario realizar una evaluación integral para conocer la extensión del defecto, incluyendo la medición del perímetro cefálico, valoración de la función motora y sensitiva así como del sistema nervioso autónomo. Usualmente el nivel de la disfunción sensitiva es ligeramente mayor que el de la disfunción detectada en la exploración motora. Si la diferencia en el nivel segmentario entre los dos lados es mayor a 1 nivel, un problema neurológico oculto debe sospecharse (como lo es la hemimelia).

En los casos con MMC es común encontrar defectos congénitos asociados, sobre todo del mismo SNC. La hidrocefalia es el defecto más comúnmente asociado; se presenta en el 90% de los casos con MMC lumbosacro. La malformación de Chiari tipo II se refiere a una protrusión de la médula por debajo del foramen magno, y que se sobrepone al cordón espinal superior (puede causar parálisis de nervios craneales bajos y apena central); esta se presenta en más del 70% de los casos con MMC. En un 10-15% de los pacientes con MMC se presenta retraso mental grave.

2. 7. Valoración y tratamiento integrales de los individuos afectados con Mielomeningocele.

La resonancia magnética nuclear es el estudio de elección para valorar el tejido neural y para identificar los contenidos del defecto en el recién nacido con MMC. Permite la visualización de anomalías asociadas, tanto intraespinales como intracraneales. La tomografía computarizada permite la visualización directa de la anatomía y el defecto ósea. Este estudio también se usa para determinar la presencia o ausencia de hidrocefalia u otras anomalías intracraneales. El estudio Urodinámico se indica para valorar el involucro del sistema urinario en los afectados.

Para el tamizaje prenatal se utiliza la ultrasonografía y los niveles séricos maternos de alfa-feto proteína. En la etapa postnatal el USG es de utilidad para la búsqueda rápida de hidrocefalia.

El recién nacido con un MMC debe mantenerse con adecuada temperatura corporal y el defecto debe ser cubierto con un apósito humedecido en solución estéril. El paciente debe colocarse en posición prona para prevenir la presión sobre el defecto ⁽⁴⁰⁾ y las consecuentes complicaciones neurológicas.

El MMC debe cerrarse quirúrgicamente de forma inmediata. El cierre implica técnicas neuroquirúrgicas clásicas ⁽⁴⁰⁾. En caso de hidrocefalia se indica la derivación ventriculoperitoneal al momento del cierre del MMC. Los pacientes con malformación de Chiari sintomática deben ser sometidos a una craneotomía suboccipital y descompresión de la fosa posterior y de las amígdalas.

En general los afectados con estas MC requieren de valoración inicial multidisciplinaria integrada por un equipo de Neurocirugía, Urología, Ortopedia y Terapia Física. Para su seguimiento requerirán de un equipo compuesto por Neonatología, Neurología Pediátrica, Ortopedia Pediátrica, Urología, Medicina Física, Cirugía Ortopédica y Psicología.

2.8. Morbilidad / Mortalidad / Pronóstico.

Dentro de los DTN más comunes se encuentran el MMC y la anencefalia, esta última es incompatible con la vida; la supervivencia de los recién nacidos afectados por anencefalia se limita a unas pocas horas (<2 días). Otros DTN puede dar lugar a un deterioro neurológico progresivo,

que puede presentarse temprano tras el nacimiento o en etapas posteriores. Los déficits neurológicos pueden ser a causa de la hidrocefalia acompañante, de una malformación de Chiari tipo II, de una médula anclada, o de una banda fibrosa que comprime los elementos neurales. Otra posible complicación es la meningitis (infecciosa o química), especialmente en los DTN abiertos como el MMC.

El DTN más común y compatible con la vida es el **Mielomeningocele**. La parálisis, la incontinencia vesical e intestinal, y la hidrocefalia son las complicaciones clínicas más comunes en esta MC. En un 10-15% de los pacientes se presenta retraso mental grave. A pesar de un cuidado médico intensivo, un 10-15% de los afectados fallecen durante la infancia temprana. La mayoría de los afectados con MMC aislado (es decir, sin anomalías mayores en otros órganos) y tratados oportunamente sobreviven hacia la etapa adulta, y su expectativa de vida es cercana a la de la población general, sin embargo, invariablemente presentan algún grado de discapacidad multisistémica ⁽³⁷⁾. Un 65% tienen inteligencia normal, aunque de estos, un 60% muestran algún grado de trastorno intelectual (particularmente dificultades en matemáticas y en la solución de problemas). En estos niños también se ha descrito trastorno por déficit de atención sin hiperactividad. En un 85% de los casos se presenta hidrocefalia, pero no guarda relación con el grado de inteligencia; alrededor de un 80% presentan suficiencia social (aunque muchos suelen requerir cateterización vesical intermitente). Las complicaciones a mediano y largo plazos suelen ser infecciosas y de disfunción vesical ⁽⁴¹⁾.

Para el MMC, y en ausencia de MC adicionales, la tasa de mortalidad en 1990 era del 21%. Actualmente se espera una supervivencia media de 30 ⁽⁵⁰⁾. Previamente las principales causas de muerte durante la infancia eran la ventriculitis y las complicaciones relacionadas a la derivación ventricular por hidrocefalia; actualmente es la disfunción del tronco cerebral a causa de la malformación de Chiari, que lleva a disfunción respiratoria y disfunción para deglutir ⁽⁵¹⁾. En la mayoría de los estudios a largo plazo, son las complicaciones renales la causa más común de muerte en pacientes que sobreviven hacia la edad adulta.

La hidrocefalia se ha considerado como una secuela casi inevitable del mielomeningocele, requiriendo derivación neuroquirúrgica hasta en el 80-90% de los casos. Las tasas de infección del shunt de derivación son mayores en pacientes con MMC que en otros grupos de hidrocefalia. La tendencia en las últimas décadas hacia un manejo más conservador, evitando en lo posible el uso de shunts de derivación, permitiendo incluso una ventriculomegalia moderada, ha disminuido las complicaciones relacionadas a este ⁽⁵²⁾.

Las consecuencias neuroanatómicas del MMC se extienden más allá de la displasia local del cordón espinal. La mayoría de los casos presentan la constelación de anomalías cerebrales constituyentes de la malformación de Chiari tipo II, las cuales son más evidentes en el rombencéfalo, donde hay un desplazamiento del contenido de la fosa posterior hacia el canal cervical superior. También se pueden encontrar anomalías del cerebro anterior, como interdigitación de los surcos cerebrales y alargamiento de la masa intermedia del talamo. La malformación de Chiari tipo II se presenta en casi todos los pacientes con MMC y es causa de sintomatología en aproximadamente 1/3 de los pacientes afectados. McLone ⁽⁵³⁾ ha establecido que son las malformaciones de Chiari II y sus efectos los que determinan la calidad de vida para el paciente con MMC.

Respecto a la ambulación, en ausencia de retraso del desarrollo (que se observa en 13% de pacientes con MMC) los niveles de movilidad independiente se relacionan de forma estrecha con el nivel de lesión neurológica. Para lesiones lumbares bajas y sacras, la movilidad independiente se da en casi todos los casos. Para lesiones por encima de L2, la pérdida de función de los músculos cuádriceps e ileo-psoas traducen una muy baja probabilidad de movilidad independiente ⁽⁵⁴⁾.

2.9. Prevención.

Al momento no existe un tratamiento efectivo para el MMC una vez que el TN ha fallado en su cierre ⁽¹⁾, y dado que el cierre normalmente se completa hacia el día 28 de gestación aproximadamente, la terapia preventiva debe administrarse periconcepcionalmente, definiéndose esta entre 8 semanas antes y 8 semanas después de la concepción.

Diversos ensayos clínicos en humanos han mostrado que la suplementación materna con AF previo al embarazo y durante etapas tempranas del mismo, puede prevenir tanto la ocurrencia como la recurrencia de los DTN ⁽¹¹⁾. La suplementación periconcepcional con 0.4mg/día de ácido fólico reduce la ocurrencia de DTN en un 50% o más ⁽¹³⁾, y la suplementación periconcepcional con 4mg/día de ácido fólico reduce la recurrencia de DCTN hasta en un 75% ⁽¹⁴⁾. Lo anterior ha llevado a la recomendación generalizada de que toda mujer en edad fértil o que planea un embarazo debe recibir un suplemento de 0.4mg de AF diario ⁽¹⁵⁾, y aquella mujer que haya tenido previamente un hijo con DTN debe recibir 2 a 4mg/día de forma periconcepcional⁽¹⁶⁾.

Sin embargo, existe un subgrupo de MMC que no son prevenibles con las estrategias actuales, ya que la incidencia de casos resistentes a AF es de 0.5-0.7 por 1000 embarazos aproximadamente ⁽¹⁷⁾. Respecto al inositol, a la fecha no se han realizado ensayos clínicos en humanos que prueben el posible papel protector del inositol para MMC. Sin embargo, en ensayos clínicos para el tratamiento de trastornos psiquiátricos, el inositol ha sido bien tolerado en dosis relativamente altas, y en ratones no se han detectado efectos teratógenos en los fetos tratados ⁽⁶⁵⁾.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los Defectos del Tubo Neural son la segunda causa más frecuente de malformaciones congénitas en la gran mayoría de las poblaciones estudiadas. Son defectos graves, de mal pronóstico y frecuentemente letales. De estos, su prevalencia al nacimiento varía (0.5-5/1000) en diversos grupos étnicos y poblaciones de distintos países así como dentro de un mismo país ^(1, 3-4, 10). Los DTN incluyen diversos tipos, siendo la anencefalia y el MMC por muchos los más frecuentes (70-80% de los casos de DTN).

En México los DTN (anencefalia y espina bífida) tienen una muy elevada prevalencia al nacimiento siendo de 2.75/1000 ó 1/36 recién nacidos (RN) ⁽³⁾. Debido a la alta prevalencia al nacimiento del MMC (1-1.5/1000), al impacto psicosocial, el alto costo del tratamiento y la morbi-mortalidad que representa se han realizado durante las últimas dos décadas numerosas investigaciones con el propósito de identificar factores de riesgo genéticos y ambientales asociados a esta MC. Si bien estudios exitosos han permitido identificar ciertos genes relacionados, se estima que aproximadamente el 80% del riesgo genético para los DTN en general, y para el MMC en particular, continúa siendo desconocido.

Además la investigación de la varianza genotípica de esta MC se complica aún más por la heterogeneidad del riesgo de ocurrencia observado en diversos grupos culturales y étnicos. La dificultad mayor en el estudio de la mayoría de las MC es su etiología multifactorial, resultado de la predisposición genética basada en un sistema poligénico en interacción con factores nutricionales y ambientales diversos, pudiendo esta interacción tener un efecto aditivo y/o multiplicativo de predisposición a la presentación del MMC.

El poder identificar factores de riesgo genético asociados a estos defectos permitiría aportar conocimiento sobre la etiología de estas MC y así dirigir estrategias de prevención específicas.

4. JUSTIFICACIÓN.

Dada la alta frecuencia del MMC, la complejidad que implica su tratamiento, la cronicidad de la afección y el gran costo emocional y económico para el paciente, su familia y los sistemas de salud, esta malformación congénita representa un importante problema de salud pública, justificándose plenamente en costo y beneficio el esfuerzo de apoyar el desarrollo de investigaciones que permitan una mayor comprensión de su etiología, con especial énfasis en factores de riesgo genéticos, que permitan establecer estrategias adecuadas de prevención para la población en riesgo.

Es importante también considerar la marcada diferencia en la frecuencia de presentación y riesgo de recurrencia del MMC en distintas poblaciones y grupos étnicos, muy probablemente explicable por la contrastante estructura genómica de estas y por características ambientales en que las mismas se reproducen ^(1, 67).

Consistente con lo mencionado, son necesarios estudios multicéntricos y multidisciplinarios que analicen las posibles interacciones gen-gen como etiológicamente relacionados a la presentación del MMC en nuestra población. Estos deberán incluir la investigación de múltiples genes que puedan contribuir al desarrollo de estas MC. Genes que participan en las diferentes instancias del desarrollo del tubo neural mencionadas previamente y que se describen en la metodología del presente trabajo de investigación (Tabla 3).

Resultados promisorios para la caracterización de genes candidatos de riesgo para DTN surgen de la investigación de variantes génicas de las vías metabólicas de los folatos, la vitamina B12, adhesión y de señalización intercelular, entre otros.

Consideramos que el estudio de factores genéticos asociados al MMC en diferentes grupos de la población mexicana permitirá conocer mejor el comportamiento de estos factores, entender mejor la etiología del MMC y de los DTN en general.

Este conocimiento muy probablemente facilitará la elaboración de programas de prevención más acorde a las características genéticas de la familia y extrapolarlos de manera más personalizada a diferentes grupos de población genotípicamente similares que comparte hábitos de vida semejantes.

5. HIPÓTESIS.

Determinadas variantes en los genes *ALDH1L1*, *ATIC*, *BHMT*, *GART* y *NCAM1*, ya sea en forma aislada o por efecto de la interacción gen-gen, representan factores de riesgo para MMC en la población en estudio.

6. OBJETIVOS.

6.1. OBJETIVO GENERAL.

Investigar y caracterizar ciertas variantes genéticas como factores de riesgo para el desarrollo de MMC y valorar su utilidad como estimadores del riesgo a nivel familiar y poblacional, y que podrían aplicarse a otros DTN.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de 4 variantes en 4 genes relacionados con el metabolismo de folatos: *ALDH1L1*, *ATIC*, *BHMT* y *GART*, en la muestra a estudiar.
2. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de 1 variante en el gen *NCAM1*, cuyo producto actúa como molécula implicada en la adhesión neuronal, en la muestra a estudiar.
3. Determinar que variantes génicas, sea en forma individual o en interacción entre sí, constituyen asociaciones de riesgo para MMC.
4. Determinar por medio de la prueba de desequilibrio de transmisión (TDT) si existe transmisión preferencial de alguna de las formas alélicas de los genes mencionados.
5. Determinar si estas asociaciones de riesgo tienen un comportamiento común o existe variación entre familias y diferentes grupos poblacionales de donde proviene la muestra a ser analizada.
6. Determinar si existe correlación genotipo-fenotipo, fundamentando la localización del MMC como expresión de gravedad variable.
7. Analizar si variantes genéticas identificadas como factores de riesgo en otras poblaciones son también factor de riesgo para que ocurra el MMC en nuestra población, e identificar comportamiento propio a nuestra población.
8. Determinar si los factores de riesgo identificados en otras poblaciones que confieren susceptibilidad para la ocurrencia del MMC se presentan también y en igual magnitud en nuestra muestra de población mestiza-mexicana.

7. METODOLOGIA.

7.1. Diseño del estudio.

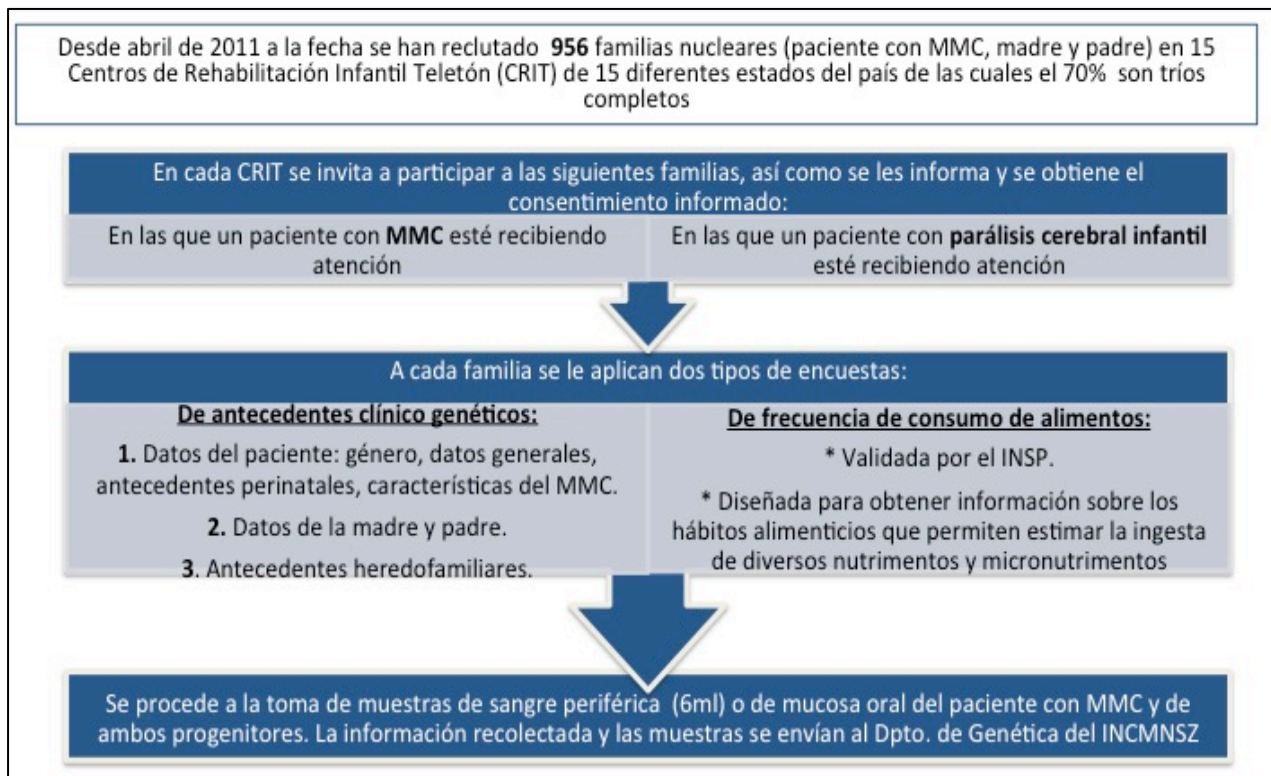
Se trata de un estudio descriptivo, colaborativo-multicéntrico, en el que participan 15 Centros de Rehabilitación Infantil Teletón (CRIT) de 15 diferentes estados del país (Figura 11). El estudio es retrospectivo y prolectivo. Es un estudio de asociación genética basado en familias y además en casos y controles.



Figura 11. Localización por Estado en la República Mexicana de los diversos Centros de Rehabilitación Infantil Teletón participantes. Total=15.

7.2. Diseño de la muestra.

La población total de estudio ha estado siendo reclutada a partir de 15 Centros de Rehabilitación Infantil Teletón desde abril de 2011 y hasta la fecha, tal como se ilustra en el siguiente diagrama:



Es de resaltar que además de los criterios de selección de la muestra que se mencionarán más adelante, se eligieron a los casos de acuerdo al nivel de localización del MMC, con el fin de incluir todos los sub-fenotipos posibles (definiendo sub-fenotipo como cada nivel de localización del defecto en: Torácico, toracolumbar, lumbar, lumbosacro y sacro).

Para lo anterior se eligieron a todos los casos disponibles de los sub-fenotipos menos frecuentes (Torácico, toracolumbar, sacro) que cumplieran con los criterios de selección establecidos; el resto de la muestra necesaria se repartió proporcionalmente entre los sub-fenotipos más frecuentes (lumbar y lumbosacro).

Como controles se utilizaron muestras sangre de 250 recién nacidos vivos, de ambos sexos, no malformados, pareados por región de nacimiento con los casos. El ADN de este grupo de controles se obtuvo a partir de gotas de sangre periférica preservadas en papel filtro. Personal especializado en tamiz neonatal realizó las tomas de muestra de sangre periférica del talón de recién nacidos vivos de 12 estados de la República Mexicana (Aguascalientes, Baja California Sur, Campeche, Coahuila, Durango, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Quintana Roo y Sinaloa) como parte del “Programa de detección de hipotiroidismo congénito”.

7.2.1. Cálculo del tamaño de muestra.

Se analizó una muestra de 250 tríos completos (paciente-madre-padre) de acuerdo al cálculo de tamaño efecto de muestra realizado con el programa QUANTO última versión (1.2.4; 2009) de acceso libre, para un modelo genético aditivo, con una frecuencia del alelo menor de 0.10 (considerando la variante genética con la MAF menos frecuente), prevalencia de la enfermedad de 0.001 y un OR de 2.0, poder estadístico del 80% y significancia $p < 0.01$ (aplicando corrección de Bonferroni) a dos colas.

7.2.2. Criterios de inclusión.

De los casos:

1) Pacientes con MMC confirmados después de los estudios de rutina clínicos y de gabinete por los respectivos especialistas, cuyos progenitores aceptarán voluntariamente participar después de leer la carta de información y firmar el consentimiento informado.

2) Que hayan nacido y residan en algún estado de la República Mexicana, y que al menos los abuelos tanto maternos como paternos sean de origen mexicano.

3) Que las madres aceptarán responder las encuestas de frecuencia de consumo de alimentos (EFCA) y de antecedentes clínico-genéticos (EACG).

4) Que los progenitores aceptarán se les tome una muestra de sangre periférica (o en su defecto de mucosa oral) a cada uno y a su hija o hijo con MMC.

Del grupo de comparación:

1) Recién nacidos vivos, no malformados, pareados por región de nacimiento con los casos, y que al menos sus abuelos tanto paternos como maternos sean de origen mexicano.

7.2.3. Criterios de no inclusión.

De los casos:

1) Falta de un diagnóstico confirmado de MMC en alguna de sus variedades.

2) Que no fuera posible estudiar a ambos progenitores o alguno se negara a la toma de muestra de sangre periférica o de células de mucosa oral o que se negarán a contestar las encuestas.

3) Que el(la) paciente sea adoptado.

4) Que el(la) paciente presentará un MMC como parte de un síndrome o asociado a otras malformaciones que sugieran una posible relación etiológica establecida.

Del grupo de comparación:

1) Que el ADN obtenido de determinada muestra no cumpliera con los criterios de calidad y cantidad requeridos.

7.2.4. Criterios de eliminación de casos.

1) Aquellos casos en que el diagnóstico clínico sugiera MMC, pero que estuvieran aún en estudio y no se haya confirmado el mismo.

2) Familias que hayan aceptado participar, que se hayan completado las encuestas, se obtuviera muestra de sangre del paciente, pero que ambos progenitores decidieran no donar una muestra de sangre o mucosa oral.

3) Que el paciente haya sido dado de alta y no se haya completado la aplicación de las encuestas y/o toma de muestras de sangre.

4) Que la familia decidiera en cualquier momento del estudio que no se analizará la información y muestras biológicas de su hijo(a) y/o de alguno de los progenitores.

7.3. Metodología para el estudio de genotipificación.

7.3.1. Selección de variantes genéticas para su genotipificación.

Las variantes genéticas analizadas en este trabajo se seleccionaron en base a los siguientes criterios de inclusión:

1) Haber mostrado evidencia biológica en algún estudio previo de la literatura que sugiriera una asociación estadísticamente significativa con DTN en el humano.

2) Preferencialmente encontrarse en regiones codificantes y ser de sentido erróneo condicionando un cambio de aminoácido en el producto proteico del gen correspondiente.

3) Tener una frecuencia del alelo menor igual o mayor al 10%, ya sea en población mexicana, o tomando como referencia población con ancestría mexicana del Proyecto "HapMap" ^(65, 73).

4) Que los genes y sus variantes participaran en alguna de las vías metabólicas o de señalización implicadas ya sea de forma directa o indirecta con el mecanismo normal de neurulación.

De acuerdo al primer criterio de inclusión mencionado se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva, comprendiendo los términos MeSH (Medical Subject Headings): defectos del tubo neural, estudios de asociación genética, mielomeningocele. Se buscaron estudios de asociación genética en PubMed/NCBI, en idioma inglés, publicados en el período comprendido entre enero de 1994 y junio de 2012. Se encontraron 130 publicaciones, que incluían el estudio de 132 genes con funciones conocidas que involucran varios aspectos de la actividad biológica. De los estudios publicados mencionados, 9.6% se realizaron en una muestra de más de 500 pacientes, 18% con más de 400, y 30% con más de 250.

De los genes analizados en estos estudios, 50 mostraron una asociación con tendencia a la significancia o con franca significancia estadística en relación a riesgo o protección para presentar DTN. De estos 50 genes con asociación significativa, 16 se realizaron en estudios con poco poder estadístico ya que se concluyeron a partir de muestras menores a 150 pacientes con DTN. Por tanto, 34 genes (Tabla 3) candidato, en base a estos antecedentes, han mostrado asociación estadísticamente significativa para DTN en el período analizado.

Tabla 3. Genes que han mostrado asociación significativa para DTN.

Función	Genes
Transporte de folatos, B12	<i>SLC19A1, CUBN, FOLR2</i>
Metabolismo de folatos	<i>ALDH1L1, ATIC, DHFR, GART, MTHFD1, MTHFD1L, MTHFR, SARDH, TYMS, TCNII</i>
Ciclo metionina	<i>BHMT, MTRR, MTR</i>
Metiltransferasas	<i>CHKA, ICMT, PCMT1, PRMT1, DNMT3B</i>
Transulfuración	<i>CBS, CTH</i>
Metabolismo de glucosa	<i>GLUT1, HK1, LEPR, UCP2</i>
Reparación de ácidos nucleicos	<i>APE1, XPD</i>
Reconocimiento celular / Señalización	<i>NCAM1, NOS3</i>
Modelos animales y embriogénesis	<i>PDGFRA, T, TP53</i>

De acuerdo a los criterios de inclusión 2 a 5, se eligieron variantes genéticas en los genes **ALDH1L1**, **ATIC**, **BHMT** y **GART**, relacionados con el metabolismo de los folatos, y al gen **NCAM1** implicado en la adhesión neuronal.

Tabla 4. Detalle de las variantes génicas seleccionadas ^(65,73).

Gen candidato	Locus	Exones / pb / SNPs	rs SNP / Nomenclatura / Alelo ancestral	Clasificación funcional / ADN / Proteína	MAF población referencia (n)
ALDH1L1	3q21.3	23 exones / 94,439 pb / 782 SNPs	rs1127717 / NM_012190.2:c.2378 A>G / A	Sentido erróneo / GAC por GGC / Asp793Gly	HapMap Mex (100): MAF G = 0.120
ATIC	2q35	16 exones / 37,957 pb / 572 SNPs	rs2372536 / NM_004044.6:c.347C >G / C	Sentido erróneo / ACT por AGT / Thr116Ser	HapMap JPT (90): MAF G= 0.244
BHMT	5q14.1	8 exones / 20,512 pb / 372 SNPs	rs3733890 / NM_001713.2:c.716G >A / G	Sentido erróneo / CGA por CAA / Arg239Gln	HapMap Mex (100): MAF A= 0.420.
GART	21q22.1	23 exones / 44,858 pb / 670 SNPs	rs8788 / NM_175085.2:c.126 1G>A / A	Sentido erróneo / GTC por ATC / Val421Ile	HapMap Mex (100): G = 0.130 (*)
NCAM1	11q23.1	20 exones / 317,164 pb / 5,555 SNPs	rs2298526 / NM_000615.6:c.52+20078T>C / G	Variante intrónica	HapMap JPT (90): MAF A=0.130

(*) En la población el alelo menor corresponde al alelo ancestral.
(n) Corresponde al número de alelos sobre el que se estimó la frecuencia alélica.

A continuación se describen las características estructurales y funcionales de cada uno de los genes que contienen las variantes elegidas para su estudio, así como las características correspondientes a cada una de estas variantes.

7.3.1.1. Gen *ALDH1L1*.

Nombre del Gen: Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1.

Localización y tamaño: Se localiza en el loci 3q21.3. Tiene 23 exones (94,439 bases) (Figura 12).

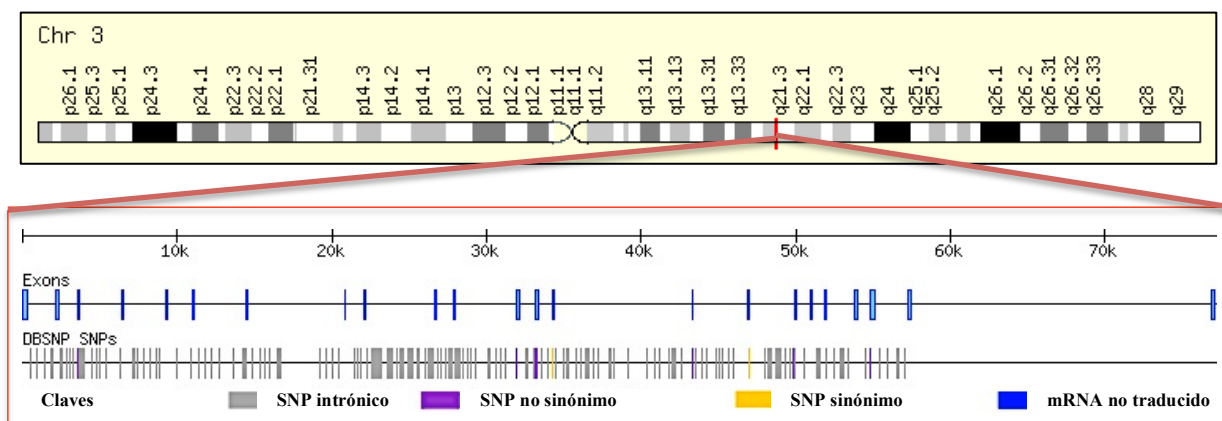


Figura 12. *ALDH1L1*, estructura genómica. DBSNP: base de datos de SNPs.

Expresión: La proteína es de 902 aminoácidos. ALDH1L1 se expresa a la alta en hígado y riñón; también en cerebro, cordón espinal, corteza cerebral y cerebelo. Durante la embriogénesis, esta enzima metabólica de folatos se expresa específicamente en las células radiales de la glia negativas para la expresión de PAX3, en la línea media del tubo neural durante la embriogénesis murina temprana.

Función: enzima citosólica que cataliza la oxidación dependiente de NADP(+) del 10-formiltetrahidrofolato hacia tetrahidrofolato y CO₂, y la escisión hidrolítica del 10-formiltetrahidrofolato hacia tetrahidrofolato y ácido fórmico. La enzima también oxida algunos aldehídos (NADPH) (Figura 13).

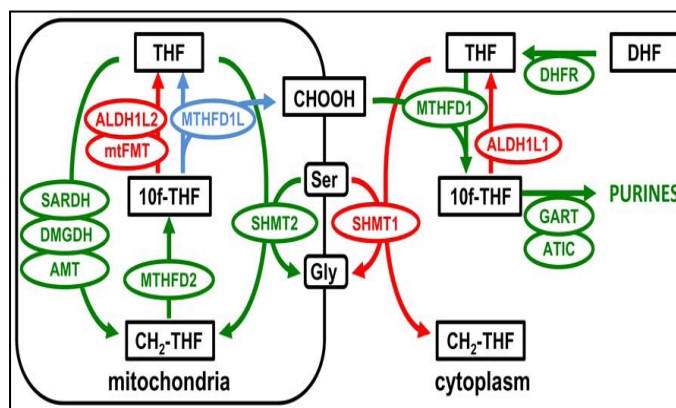


Figura 13. Reacciones dentro de la vía de folatos, relevantes para la biosíntesis de purinas. Tomado de Marini (59)

Sentido biológico: La regulación a la alta de ALDH1L1 durante el desarrollo del SNC correlaciona con una proliferación celular reducida; la mayoría de las células ALDH1L1 (+) en la línea media son quiescentes. Anthony TE et al (60), propone que la expresión específica de ALDH1L1 en la línea media y su habilidad para suprimir de forma dominante la proliferación en una forma respondedora a

folatos, sugieren que las mutaciones que contribuyen a enfermedad son de ganancia de función más que de pérdida de tal.

Polimorfismos: Tiene 782 SNPs. El de interés para este estudio es el correspondiente al rs1127717, el cual es de sentido erróneo al condicionar la sustitución de Asparagina por Glicina en la posición 793 de la proteína mediante una transición de adenina a guanina en el nucleótido 2378. La frecuencia para el alelo menor de este SNP en población mexicana es del 12%, de acuerdo a lo reportado en el HapMapMex.

7.3.1.2. Gen ATIC.

Nombre y tamaño del Gen: 5-aminoimidazole 4-carboxide ribonucleotide formyltransferase.

Localización y tamaño: Se localia en el loci 2q35. Tiene 16 exones correspondientes a 37,957 bases (Figura 14).

Expresión: La proteína es de 591 aminoácidos. Se expresa principalmente en los siguientes tejidos: hígado, células sanguíneas (monocitos, linfocitos) y en cerebro.

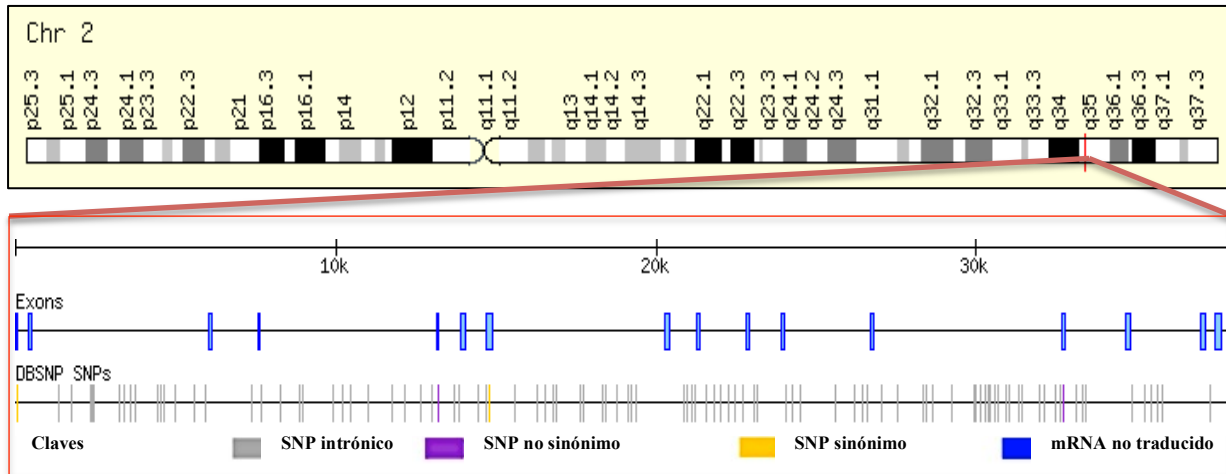


Figura 14. ATIC, estructura genómica. DBSNP: base de datos de SNPs.

Función: Proteína bifuncional que cataliza los últimos dos pasos en la vía bio-sintética *de novo* de purinas (Figura 13).

Sentido biológico: Al participar en la biosíntesis de purinas a partir de la 10f-THF, y al encontrar ORs menores a 1 en los estudios de asociación, es posible que el polimorfismo tenga un efecto positivo sobre la vía, resultando en un efecto protector. La expresión de la proteína en el cerebro apoya esta teoría. SNP: Tiene 572 SNPs. El de interés para este estudio es el asignado con el rs2372536 que corresponde a una transversión de una citosina a una guanina en el nucleótido 347, y que condiciona el cambio de una treonina por una serina en la posición 116. La frecuencia para el alelo menor (G) de este SNP es del 27.5% para población japonesa del HapMap (JPT).

7.3.1.3. Gen BHMT.

Nombre del Gen: betaína-homocisteína S-metiltransferasa

Localización y tamaño: se localiza en el loci 5q14.1. Tiene 8 exones; 20,512 bases

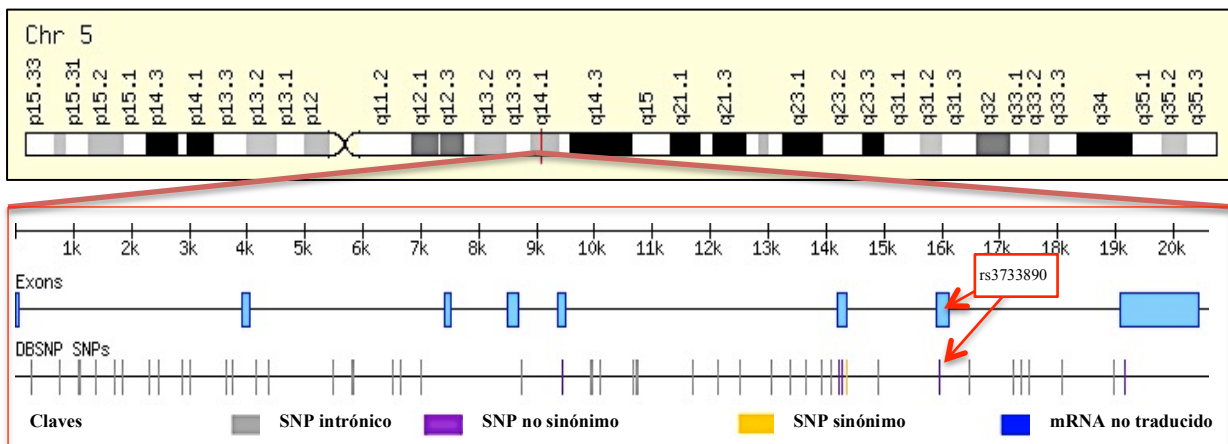


Figura 15. BHMT, estructura genómica. DBSNP: base de datos de SNPs. Se indica la posición aproximada de la variante de interés.

Expresión: la proteína es de 406 aminoácidos; se constituye en un homotetrámero. Su mRNA se ha encontrado casi exclusivamente en hígado y riñón.

Función: cataliza la conversión de betaína y homocisteína a dimetilglicina y metionina, respectivamente (Figura 16).

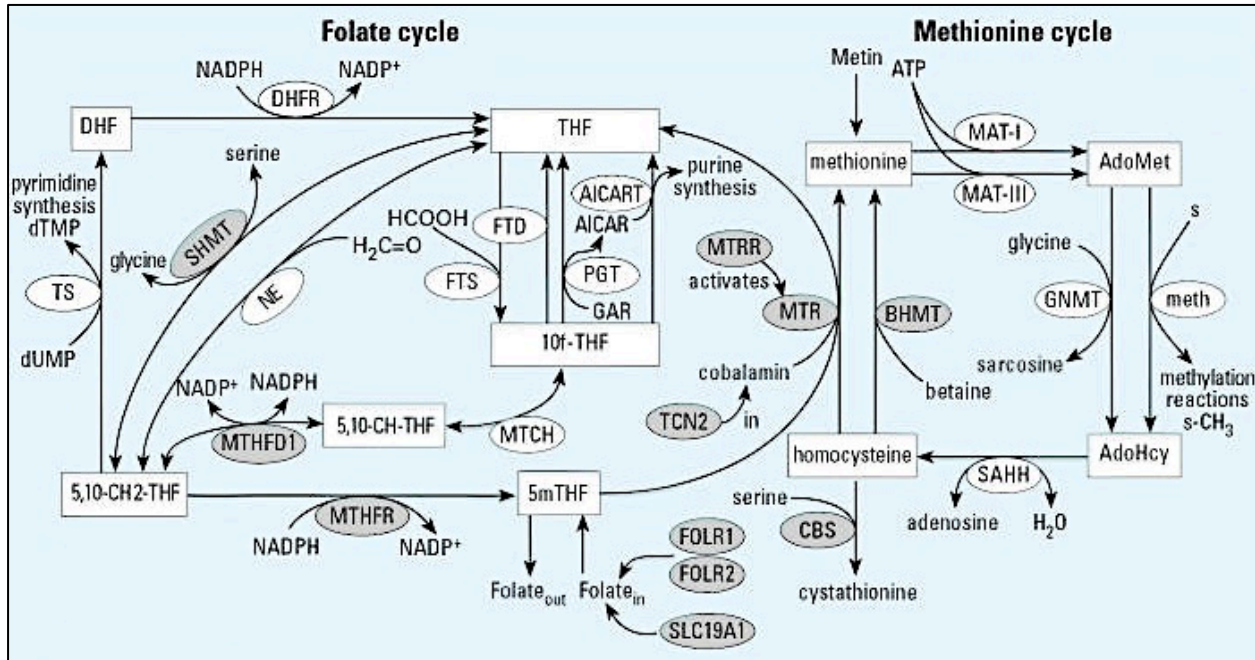


Figura 16. Ciclos de folato y de metionina. Se muestran los sustratos en rectángulos y las enzimas en elipses (82).

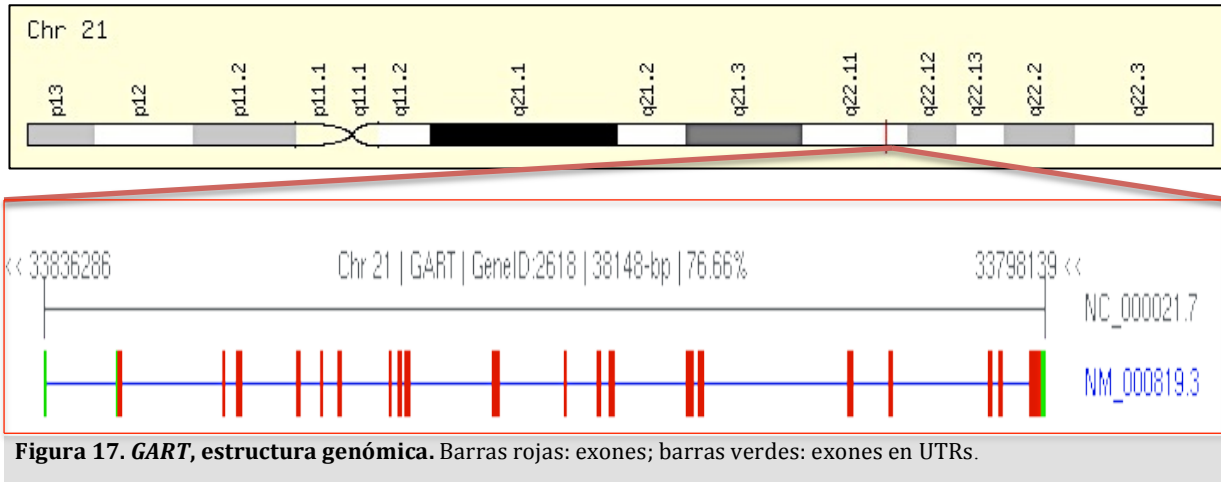
Sentido biológico: se considera que variantes en el gen BHMT, podrían ser modificadores genéticos del riesgo de DTN, ya que su producto es una enzima dependiente de folatos que participa en el metabolismo de homocisteína. Se ha reportado que individuos con genotipos homocigotos para ciertos polimorfismos de nucleótido único del tipo no sinónimos en este gen, muestran niveles circulantes reducidos de homocisteína y que tales variantes confieren una protección para el riesgo de desarrollar MMC (64).

SNP: Se han reportado 372 SNPs. El de interés para este estudio es el rs3733890 el cual corresponde a una transición de guanina hacia adenina en el nucleótido 716. Esta transición traduce el cambio de una arginina por una glicina en la posición 239 de la proteína. La frecuencia del alelo menor (G) es del 42% en población mexicana del HapMap.

7.3.1.4. Gen GART.

Nombre del gen: Sintetasa de fosforibosilglicinamida, formiltransferasa de fosforibosilglicinamida, sintetasa de fosforibosilaminoimidazol.

Localización y tamaño: Se localiza en 21q22.11. Tiene 23 exones (44,858 bases; 38 kb) (Figura 17).



Expresión: La proteína es de 1,010 aminoácidos. El proceso de corte y empalme alternativo de este gen resulta en dos variantes de transcritos que codifican diferentes isoformas. El mRNA se ha encontrado en toda célula; es de destacar en: sistema cardiovascular, bazo, cerebro, tracto respiratorio y médula ósea.

Función: Proteína trifuncional con funciones de formiltransferasa de fosforibosilglicinamida, de sintetasa de fosforibosil--glicinamida y de sintetasa de fosforibosil-amino-imidazol, las cuales se requieren para la biosíntesis de novo de purinas. Es la segunda enzima en tal vía, después de ATIC (Figura 13).

Sentido biológico: siendo un gen que codifica para una enzima que participa en la vía del metabolismo de folatos (de un carbono), y dado su patrón de expresión (cerebro) y su función durante el desarrollo (se considera un gen housekeeping que posiblemente se expresa en todas las células en división), se considera un gen candidato para su asociación con riesgo de desarrollar DTN. Es probable que las variaciones de riesgo en este gen sean del tipo de pérdida de función, ya que como antecedente, en los pacientes con síndrome de Down (trisomía 21 regular) existe elevación de los niveles séricos de purina, sugiriendo un posible efecto de sensibilidad a dosis.

SNP: Se han reportado 670 SNPs en GART. El de interés para este estudio es el rs8788 correspondiente a una transición de guanina a adenina en la posición 1261, traduciendo el cambio de una valina por isoleucina en el aminoácido 42. La frecuencia del alelo menor (el correspondiente a guanina, en este caso) es del 12% para población mexicana de acuerdo al HapMap.

7.3.1.5. Gen NCAM1.

Nombre y tamaño del Gen: Molécula de adhesión celular neuronal 1.

Localización y tamaño: Se localiza en el loci: 11q23.1. Tiene 20 exones; 317,164 bases (317.16 kb) (Figura 18).

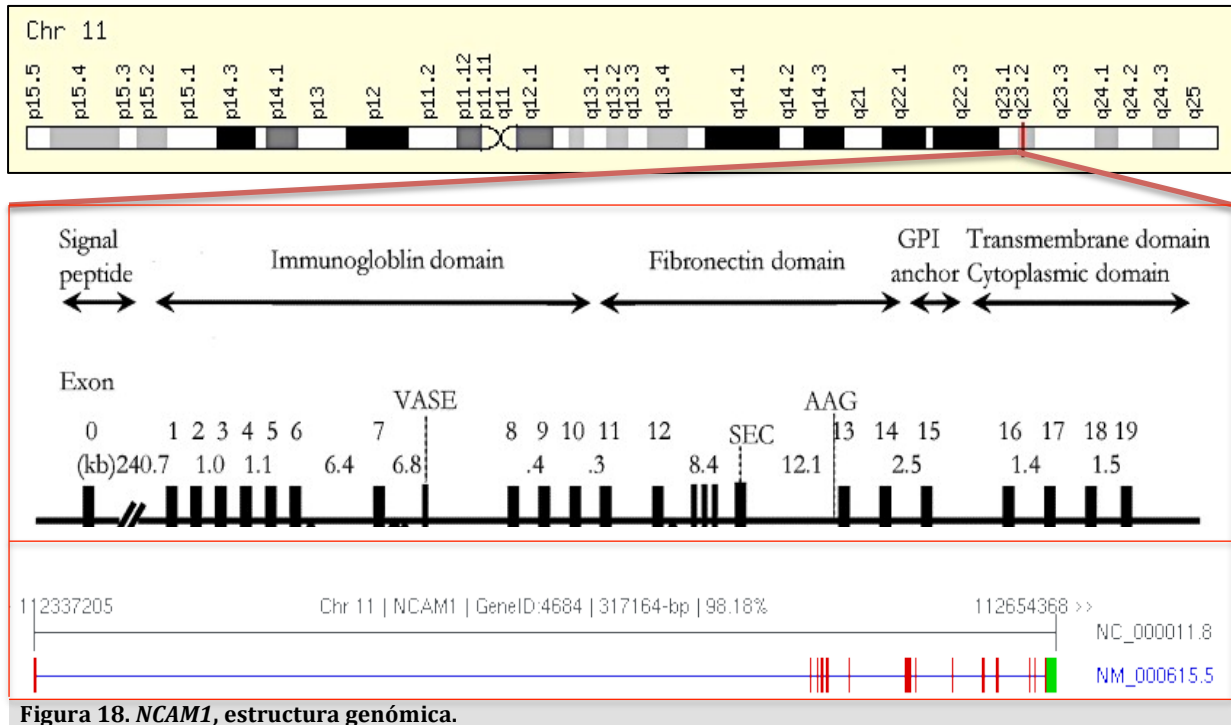


Figura 18. NCAM1, estructura genómica.

Expresión: El gen codifica para una proteína integral de membrana de 858 aminoácidos. Por medio del proceso de corte y empalme alternativos existen múltiples variantes. Se expresa en cerebro, neuronas y sistema nervioso periférico.

Función: la proteína es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas. Está involucrada en las interacciones célula-célula así como en las interacciones célula-matriz durante el desarrollo y la diferenciación embrionarios. Se ha implicado en el desarrollo del sistema nervioso (adhesión neurona-neurona), y en el de las células involucradas en la expansión de células T y dendríticas (fasciculación y extensión de neuritas). En si la proteína es una molécula de adhesión celular involucrada en la adhesión neurona-neurona, en la fasciculación de neuritas, en la extensión de neuritas, etc.

Sentido biológico: Se ha establecido que participa en el proceso de neurulación en ciertos modelos animales (*Xenopus*; *pez cebra*; *ratón*). En humanos, según los estudios de Deak et al ⁽⁶²⁾ su expresión no ocurre en el tubo neural al momento del cierre, pero si después en el mesodermo adyacente en neuronas diferenciadas del SNC. Variantes en este gen se han asociado con riesgo de MMC.

SNP: Se han reportado 5,555 SNPs. El elegido para este estudio es la variante intrónica rs2298526 correspondiente a una transición de adenina hacia guanina. La frecuencia del alelo menor (adenina) es del 13% en población japonesa del HapMap (JPT).

7.3.2. Toma de muestras biológicas para extracción de ADN.

A las familias que cumplieran con los criterios de selección y que aceptaron participar en el estudio previo consentimiento informado por escrito, se les tomó una muestra de sangre periférica de 6 ml en un tubo vacutainer con EDTA.

En caso de que la extracción de sangre se dificultase se tomó una muestra de células de mucosa presentes en una muestra de saliva las cuales se depositaron en un tubo con 10 ml de enjuague bucal al 10% sin alcohol.

7.3.3. Obtención de células para extracción de ADN.

Se realizó mediante el siguiente procedimiento:

- 1) Se obtuvieron leucocitos a partir de 6 ml de sangre total mediante lisis de eritrocitos con una solución de sucrosa y tritón al 5% en Tris 0.1Mm (TTS).

- 2) Se realizó un lavado de los leucocitos con solución TTS en tubos plásticos de 50 ml, centrifugándose la muestra a 3000rpm durante 15 min, el botón obtenido se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 μ L, en donde se realizaron 2 lavados adicionales con TTS, centrifugándose a 14000 rpm durante 5 min.

- 3) Se concluyó esta fase realizando 2 lavados con solución PBS 1X, después de lo cual el botón se recuperó en criotubos a los que se agregó RNeasy® (Ambion) y se congelaron a -70 C° para una futura extracción de ADN para los estudios de genotipificación por medio de la discriminación alélica con sondas TaqMan de Applied Biosystems® (Illumina, San Diego, CA, USA).

- 4) El tubo con las células de mucosa oral fue centrifugado durante 5 minutos a 3000 rpm para eliminar el enjuague bucal. El botón de células fue lavado con 5 ml de PBS 1X. Posteriormente las células fueron recuperadas en criotubos con RNeasy®(Ambion) y congeladas a -70°C para una futura extracción de ADN para los estudios de genotipificación por medio de la discriminación alélica con sondas TaqMan de Applied Biosystems® (Illumina, San Diego, CA, USA).

7.3.4. Extracción de ADN.

La extracción de ácidos nucleicos de las muestras sanguíneas y de mucosa oral se realizó empleando el kit *QIAamp DNA mini* (QIAGEN®) usando el equipo de extracción automatizada QIAcube (QIAGEN®) que cuenta con programas específicos de purificación de acuerdo a la cantidad y tipo de muestra a ser procesada.

Brevemente el proceso consiste en:

- 1) Una vez colocada la alícuota de 200 µL del concretado celular en el equipo se inicia el proceso de extracción con la lisis celular.
- 2) Se coloca la muestra en una columna con resina, se realizan lavados a la resina para eliminar restos de sales y proteínas y por último se eluye el ADN en un tubo limpio.

Obtenido el ADN se determinó su concentración en cada muestra con espectrofotometría (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) a una longitud de onda de $\lambda=260\text{nm}$. Para esto se usó como blanco la solución de elución AE para las muestras de los controles, y agua para las muestras de las familias. De acuerdo a la especificaciones del kit y del equipo se obtuvieron de 5 a 15 microgramos de ADN por muestra y su pureza de acuerdo a la relación DO 260/DO 280. Si el valor de dicha relación resultara diferente al intervalo de 1.8-2.0, la muestra de ADN se purificaba con lavados con 1mg de glicógeno e isopropanol al 100% y un lavado posterior con etanol al 70% el cual se evaporaba mediante el uso de un concentrador al vacío (Speed-Vac, Eppendorf Co.) Posteriormente el ADN se mantiene a -70°C hasta su uso.

7.3.5. Dilución de muestras.

Para poder obtener un buen desempeño en la genotipificación por medio de discriminación alélica, se realizaron diluciones de las muestras de estudio en stock a fin de obtener una concentración final de 5 ng/µL en 100µL de agua libre de DNAsas y RNAsas.

7.3.6. Genotipificación de las variantes genéticas mediante el uso de sondas TaqMan.

Los ensayos de genotipificación mediante discriminación alélica por PCR en tiempo real con uso de sondas Taqman ® permiten el análisis automatizado de locus específicos de forma rápida, eficaz y a bajo costo, obteniéndose resultados reproducibles de alta calidad e internacionalmente comparables. La genotipificación en 750 muestras de ADN en 250 familias nucleares (tríos de caso, padre y madre) así como en 250 controles, se realizó empleando

sondas Taqman ® de *Applied Biosystems* (AB) las cuales se encuentran disponibles comercialmente (Tabla 5).

Tabla 5. Detalle de las sondas Taqman ® para las variantes genéticas en estudio.

Gen	Loci	rs SNP	# Ensayo TaqMan ® (AB)	Espectro fluorescencia
<i>ALDH1L1</i>	3q21.3	rs1127717	C__11908221_20	VIC C / FAM T
<i>ATIC</i>	2q35	rs2372536	C__16218146_10	VIC C / FAM G
<i>BHMT</i>	5q14.1	rs3733890	C__11646606_20	VIC A / FAM G
<i>GART</i>	21q22.1	rs8788	C__2443537_1_	VIC C / FAM T
<i>NCAM1</i>	11q23.1	rs2298526	C__12072169_1_	VIC C / FAM T

7.4. Análisis estadístico de los resultados.

7.4.1. Variables en estudio.

Se evaluarán las siguientes *variables dependientes*: tener MMC. La *variable independiente* correspondió al estado de portar en estado ya sea homo o heterocigoto la variable genética en alguno o varios de los 5 genes en estudio.

7.4.2. Análisis general.

La caracterización de la población en estudio se realizó mediante el uso de estadística descriptiva de acuerdo a las frecuencias alélicas y genotípicas para las variantes de los genes: *ALDH1L1*, *ATIC*, *BHMT*, *GART* y *NCAM1*. Para el análisis estadístico se utilizaron pruebas de tendencia central para variables continuas y no paramétricas para comparación de proporciones. Para las no paramétricas se utilizó X^2 y prueba exacta de Fisher. Se investigó si las frecuencias alélicas y genotípicas de las 5 variantes en los 5 genes estudiados se encuentran o no en equilibrio de Hardy-Weinberg. El valor de significancia para todas las pruebas se ajustó a $p \leq 0.05$. Sobre los resultados se aplicó corrección de Bonferroni para múltiples pruebas.

7.4.3. Análisis de tríos.

El diseño basado en familias se utilizó para analizar la variación genotípica en los tríos (caso, padre y madre) mediante la prueba de desequilibrio de transmisión (TDT) ⁽⁷⁴⁾. Este método

compara la distribución de genotipos observada en los casos para la esperada de acuerdo a los genotipos de los progenitores para una característica bialélica con modo de herencia mendeliano clásico, bajo la hipótesis nula de “no ligamiento y no asociación” o “no asociación en presencia de ligamiento” ⁽⁷⁵⁾. Este análisis se realizó con el programa STATA/SE v.12.1.

Para el análisis de interacción gen-gen se utilizó el programa MDR-PDT v.2.0 (Multifactor Dimensionality Reduction – Pedigree Disequilibrium Test; *en www.multifactorialdimensionalityreduction.org*) el cual permite identificar efectos de interacción en múltiples loci en familias con estructuras diversas ⁽⁷⁶⁻⁷⁷⁾. Se aplicó tanto un análisis exhaustivo como uno forzado para todas las combinaciones posibles entre las variantes génicas estudiadas, considerando significativo un valor TBA (*testing balanced accuracy*) mayor a 0.55.

7.4.4. Análisis de casos y controles.

Se investigó si existía correlación genotipo-fenotipo al comparar las frecuencias génicas y alélicas entre los casos de acuerdo al nivel de localización del MMC y considerando solo a los individuos homocigotos tanto para el alelo silvestre como para el mutante (o de la variante en estudio), así como entre casos con MMC de “localización alta” vs controles y entre casos con MMC “localización baja” vs controles. Se definió como MMC de “localización alta” al grupo que incluye a aquellos casos con defectos localizados en región **torácica ó toracolumbar**; el MMC de “localización baja” corresponde por otro lado al agrupamiento de los individuos con defectos localizados en los **niveles lumbar, lumbosacro y sacro**.

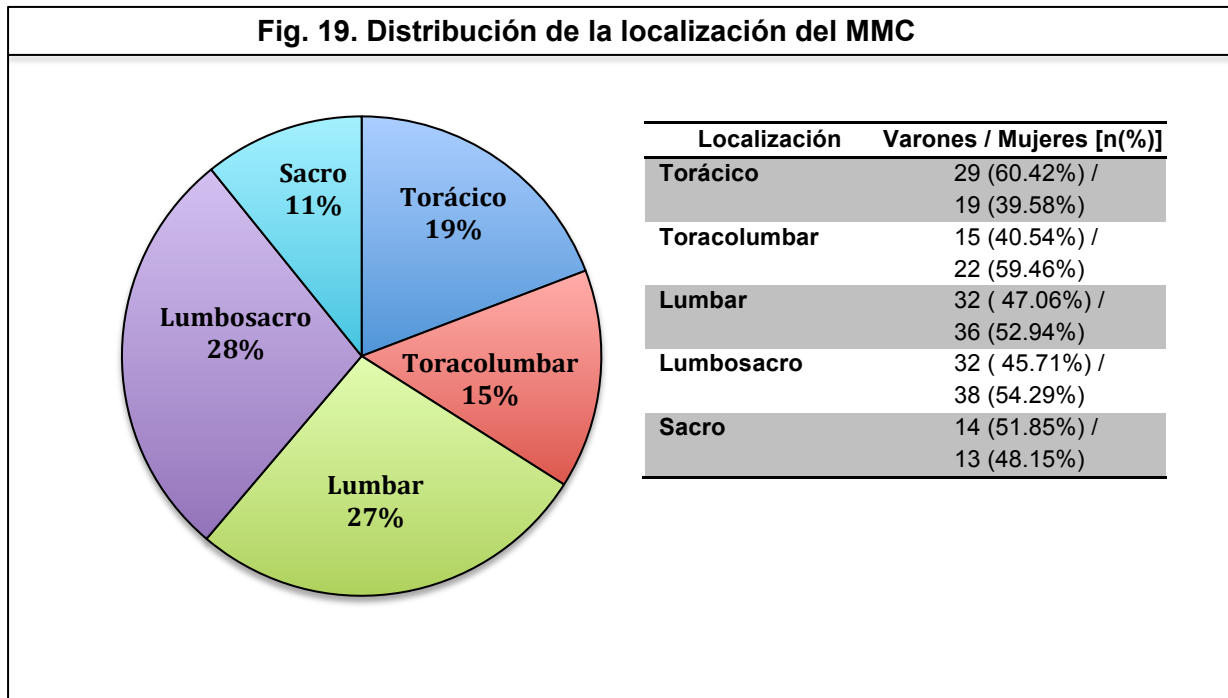
Para el análisis de interacción génica se utilizó nuevamente el programa MDR v.2.0 beta 8.4, especificando un análisis pareado (casos-controles) y realizando tanto un análisis exhaustivo como uno forzado para todas las combinaciones posibles entre las variantes génicas estudiadas, considerando como significativo un valor TBA (*testing balanced accuracy*) mayor a 0.55.

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS.

Las familias incluidas en el proyecto de investigación principal (Genómica del Mielomeningocele: Estudio Multicéntrico en Pacientes de 17 Diferentes Centros de Rehabilitación Infantil Teletón de Diferentes Estados del País) del cual deriva el presente estudio, han sido informadas ampliamente sobre las características (motivos, importancia-impacto) del mismo, y han firmado el correspondiente consentimiento informado.

9. RESULTADOS.

Se incluyeron 250 tríos completos, compuestos cada uno por: un caso con MMC y ambos progenitores. De los 250 casos con MMC, el 48.8% (122) son varones y el 51.2% (128) son mujeres, y la distribución de géneros en los 250 controles fue de 45.6% (114) varones y de 54.4% (136) mujeres. La distribución del nivel de localización del MMC en los 250 casos se muestra en la figura 19.



No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la proporción de géneros entre casos y controles, ni para la distribución de géneros entre los diversos fenotipos (dados por el nivel de localización del MMC), ni tampoco para la distribución de la muestra entre los diferentes estados de origen. Excepto al estratificar por localización del defecto, se observó una diferencia entre la proporción de géneros para el nivel torácico (60.42% varones vs 39.58% mujeres) respecto al resto, aunque no alcanzando significancia estadística (RR 1.60, IC 95% 0.95-2.79; $\chi^2 = 3.21$, valor $p = 0.07$).

Tras la genotipificación de las 250 familias y de los 250 controles, para las variantes *ALDH1L1* A2378G, *ATIC* C347G, *BHMT* G716A, *GART* G1261A y *NCAM1* T>C, se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas para el grupo de casos con MMC y para el grupo de controles, y se compararon con las frecuencias alélicas (tabla 6) y genotípicas (tabla 7) previamente reportadas en diversas poblaciones.

Tabla 6. Comparación de frecuencias alélicas previamente reportadas en distintas poblaciones (*) y las encontradas en este estudio en el grupo de controles y en el de casos para las variantes génicas seleccionadas.

VARIANTE	GENOTIPO	ALDH1L1	ATIC	BHMT	GART	NCAM1
POBLACION		A2378G	C347G	G716A	G1261A	A>G
Europeos (HapMap-CEU)	Alelo S	0.827	0.725	0.686	0.243	0.600
	Alelo M	0.173	0.275	0.314	0.757	0.400
Total n=		226	120	226	226	120
Japoneses (HapMap-JPT)	Alelo S	0.884	0.756	0.750	0.052	0.133
	Alelo M	0.116	0.244	0.250	0.948	0.867
Total n=		172	90	172	172	90
Chinos (HapMap-CHB)	Alelo S	0.890	0.800	0.683	-	0.200
	Alelo M	0.110	0.200	0.317	1.00	0.800
Total n=		82	90	82	90	90
Afroamericano (HapMap-ASW)	Alelo S	0.755	-	0.786	0.156	-
	Alelo M	0.245	-	0.214	0.844	-
Total n=		98	-	98	96	-
Mexicanos (HapMap-Mex)	Alelo S	0.880	-	0.580	0.130	-
	Alelo M	0.120	-	0.420	0.870	-
Total n=		100	-	100	100	-
CONTROLES	Alelo S	0.918	0.684	0.610	0.084	0.382
	Alelo M	0.082	0.316	0.390	0.916	0.618
Total n=		500	500	500	500	500
CASOS	Alelo S	0.900	0.640	0.632	0.078	0.410
	Alelo M	0.100	0.360	0.368	0.922	0.586
Total n=		500	500	500	500	500

(*) Fuente: base datos SNP NCBI (National Center for Biotechnology Information) ⁽⁶⁵⁾

(-) Sin reportes sobre las frecuencias en tal población.

(n=) Número de alelos en el que se baso la estimación de las frecuencias.

HapMap-ASW: residentes en el suroeste de EUA con ancestría africana. **HapMap CEU:** residentes en Utah, con ancestría del norte y occidente de Europa. **HapMap-JPT:** japoneses en Tokyo. **HapMap-Mex:** mexicanos por ancestría, residentes en los Ángeles, California. **Alelo S:** Alelo silvestre; **Alelo M:** Alelo mutante o con el polimorfismo en estudio.

Tabla 7. Comparación de frecuencias genotípicas previamente reportadas en distintas poblaciones (*) y las encontradas en este estudio en el grupo de controles y en el de casos para las variantes génicas seleccionadas.

VARIANTE	GENOTIPO	ALDH1L1	ATIC	BHMT	GART	NCAM1
POBLACION		A2378G	C347G	G716A	G1261A	A>G
Europeos (HapMap-CEU)	HS	0.673	0.500	0.478	0.053	0.333
	HT	0.310	0.450	0.416	0.381	0.533
	HM	0.018	0.050	0.106	0.566	0.133
Total n=		226	120	116	226	120
Japoneses (HapMap-JPT)	HS	0.767	0.556	0.547	-	-
	HT	0.233	0.400	0.407	0.105	0.267
	HM	-	0.044	0.047	0.895	0.733
Total n=		172	90	172	172	90
Chinos (HapMap-CHB)	HS	0.780	0.600	0.488	0	0.022
	HT	0.220	0.400	0.390	0	0.356
	HM	0	0	0.122	1.00	0.622
Total n=		82	90	82	90	90
Afroamericanos (HapMap-ASW)	HS	0.612	-	0.592	0	-
	HT	0.286	-	0.388	0.312	-
	HM	0.102	-	0.020	0.688	-
Total n=		98	-	98	96	-
Mexicanos (HapMap-Mex)	HS	0.760	-	0.320	0.020	-
	HT	0.240	-	0.520	0.220	-
	HM	-	-	0.160	0.760	-
Total n=		100	-	100	100	-
CONTROLES	HS	0.856	0.460	0.380	0.004	0.168
	HT	0.124	0.448	0.460	0.160	0.428
	HM	0.020	0.092	0.160	0.836	0.404
Total n=		500	500	500	500	500
CASOS	HS	0.812	0.412	0.404	0.008	0.188
	HT	0.176	0.456	0.456	0.140	0.452
	HM	0.012	0.132	0.140	0.852	0.360
Total n=		500	500	500	500	500

(*) Fuente: base datos SNP NCBI (National Center for Biotechnology Information)⁽⁶⁵⁾; (-) Sin reportes sobre las frecuencias en tal población; (n=) Número de alelos en el que se baso la estimación de las frecuencias.

HapMap-ASW: residentes en el suroeste de EUA con ancestría africana. **HapMap CEU:** residentes en Utah, con ancestría del norte y occidente de Europa. **HapMap-Mex:** mexicanos por ancestría, residentes en los Ángeles, California. **HapMap-JPT:** japoneses en Tokyo. **HS:** Homocigoto silvestre; **HT:** Heterocigoto; **HM:** Homocigoto mutante (para la variante en estudio).

Además se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de cada una de las variantes génicas de interés, en cada grupo de individuos en estudios, es decir: controles, casos, madres y padres (tabla 8).

Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas para las variantes génicas en estudio en los diferentes grupos analizados en la muestra

Variante	Grupo n= / (%)							
	Controles		Casos		Madres		Padres	
ALDH1L1 A237G								
AA	214	(85.60)	203	(81.20)	217	(86.90)	205	(82.00)
AG	31	(12.40)	44	(17.60)	31	(12.40)	44	(17.60)
GG	5	(2.00)	3	(1.20)	2	(0.80)	1	(0.40)
Frecuencia A	459	0.92	450	0.90	454	0.93	454	0.91
Frecuencia G	41	0.08	50	0.10	46	0.07	46	0.09
ATIC C347G								
CC	115	(46.00)	103	(41.20)	98	(39.20)	105	(42.00)
CG	112	(44.80)	114	(45.60)	119	(47.60)	115	(46.00)
GG	23	(9.20)	33	(13.20)	33	(13.20)	30	(12.00)
Frecuencia C	342	0.68	320	0.64	315	0.63	325	0.65
Frecuencia G	158	0.32	180	0.36	185	0.37	175	0.35
BHMT G716A								
GG	95	(38.00)	101	(40.40)	104	(41.60)	95	(38.00)
GA	115	(46.00)	114	(45.60)	113	(45.20)	122	(48.80)
AA	40	(16.00)	35	(14.00)	33	(13.20)	33	(13.20)
Frecuencia G	305	0.61	316	0.63	321	0.64	312	0.62
Frecuencia A	195	0.39	184	0.37	179	0.36	188	0.38
GART G1261A								
GG	1	(0.40)	2	(0.80)	2	(0.80)	1	(0.40)
GA	40	(16.00)	35	(14.00)	32	(12.80)	36	(14.40)
AA	209	(83.60)	213	(85.20)	216	(86.40)	213	(85.20)
Frecuencia G	42	0.08	39	0.08	36	0.07	38	0.08
Frecuencia A	458	0.92	461	0.92	464	0.93	462	0.92
NCAM1 A>G								
AA	42	(16.80)	47	(18.80)	49	(19.60)	43	(17.20)
AG	107	(42.80)	113	(45.20)	104	(41.60)	125	(50.00)
GG	101	(40.40)	90	(36.00)	97	(38.80)	82	(32.80)
Frecuencia A	191	0.38	207	0.41	202	0.40	211	0.42
Frecuencia G	309	0.62	293	0.59	298	0.60	289	0.58

Al comparar frecuencias genotípicas entre casos y controles, asumiendo un modelo dominante para la variante de interés, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, así como tampoco para las frecuencias alélicas. Se comprobó que las variantes

estudiadas estuvieran en equilibrio de Hardy-Weinberg, para cada una de los grupos (padres, madres, casos y controles), encontrando en desequilibrio únicamente a la variante *ALDH1L1* en el grupo de los controles y *NCAM1* en el grupo de las madres (ver anexo I). Posteriormente se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas entre casos y controles, considerando solo los genotipos homocigotos y excluyendo los heterocigotos (tabla 9), con el fin de evitar inferir algún modelo dominante o recesivo de la variantes en estudio.

Tabla 9. Comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas entre casos y controles, incluyendo solo los genotipos homocigotos.

Variante	Casos		Controles		X ²	P	OR	IC 95%
	n	(1.00)	n	(1.00)				
ATIC C347G								
CC	103	0.757	115	0.833	2.43	0.1189	0.624	0.327-1.177
GG	33	0.243	23	0.167				
Alelo C	206	0.757	230	0.833	4.86	0.0274	0.624	0.399-0.970
Alelo G	66	0.243	46	0.167				
BHMT G716A								
GG	101	0.743	95	0.704	0.51	0.4737	1.215	0.688-2.147
AA	35	0.257	40	0.296				
Alelo G	202	0.743	190	0.704	1.03	0.3109	1.215	0.819-1.804
Alelo A	70	0.257	80	0.296				
NCAM1 A>G								
AA	47	0.343	42	0.294	0.79	0.3753	1.256	0.735-2.146
GG	90	0.657	101	0.706				
Alelo A	94	0.343	84	0.294	1.57	0.2099	1.255	0.866-1.822
Alelo G	180	0.657	202	0.706				

Para las variantes *ALDH1L1* y *GART*, por la baja frecuencia de alguno de los valores observados, se utilizó la prueba exacta de Fisher (a dos colas) para estimar el OR:

Variante	Casos		Controles		Valor P prueba exacta Fisher	OR	IC 95%
	n	(1.00)	n	(1.00)			
ALDH1L1 A237G							
AA	203	0.985	214	0.977	0.725	0.632	0.097-3.301
GG	3	0.015	5	0.023			
Alelo A	406	0.985	428	0.977	0.454	0.632	0.187-1.942
Alelo G	6	0.015	10	0.023			
GART G1261A							
GG	2	0.009	1	0.005	1.000	0.509	0.008-9.872
AA	213	0.991	209	0.995			
Alelo G	4	0.009	2	0.005	0.686	0.509	0.046-3.579
Alelo A	426	0.991	418	0.995			

Con este análisis no se obtuvieron diferencias significativas. Únicamente para la variante G del gen *ATIC* se observó una diferencia estadísticamente significativa al comparar las frecuencias alélicas entre casos y controles, mostrando un OR de 0.62 (p=0.02; IC 95% 0.39-

0.97). Para investigar la posible relación genotipo-fenotipo en los casos con MMC y las variantes en estudio, los individuos afectados fueron clasificados de acuerdo al nivel de localización del MMC. Las frecuencias obtenidas para cada variante en los diferentes estratos se muestran a continuación (Tabla 10).

Tabla 10. Frecuencias alélicas y genotípicas, de las variantes en estudio de acuerdo al nivel de localización del MMC.

Variante génica	Torácico 48 (%)	Toracolumbar 37 (%)	Lumbar 68 (%)	Lumbosacro 70 (%)	Sacro 27 (%)
ALDH1L1 A237G					
AA	32 (66.67)	33 (89.19)	59 (86.76)	59 (84.29)	20 (74.07)
AG	15 (31.25)	4 (10.81)	8 (11.76)	11 (15.71)	6 (22.22)
GG	1 (2.08)	0	1 (1.47)	0	1 (3.70)
Alelo A	0.82	0.95	0.93	0.92	0.85
Alelo G	0.18	0.05	0.07	0.08	0.15
ATIC C347G					
CC	20 (41.67)	13 (35.14)	32 (47.06)	27 (38.57)	11 (40.74)
CG	24 (50.00)	20 (54.05)	27 (39.71)	31 (44.29)	12 (44.44)
GG	4 (8.33)	4 (10.81)	9 (13.24)	12 (17.14)	4 (14.81)
Alelo C	0.67	0.62	0.67	0.61	0.63
Alelo G	0.33	0.38	0.33	0.39	0.37
BHMT G716A					
GG	20 (41.67)	16 (43.24)	29 (42.65)	27 (38.57)	9 (33.33)
GA	22 (45.83)	18 (48.65)	32 (47.06)	30 (42.86)	12 (44.44)
AA	6 (12.50)	3 (8.11)	7 (10.29)	13 (18.57)	6 (22.22)
Alelo G	0.65	0.68	0.66	0.60	0.56
Alelo A	0.35	0.32	0.34	0.40	0.44
GART G1261A					
GG	1 (2.08)	1 (2.70)	0	0	0
GA	7 (14.58)	6 (16.22)	6 (8.82)	14 (20.00)	2 (7.41)
AA	40 (83.33)	30 (81.08)	62 (91.18)	56 (80.00)	25 (92.59)
Alelo G	0.09	0.11	0.04	0.10	0.04
Alelo A	0.91	0.89	0.96	0.90	0.96
NCAM1 A>G					
AA	14 (29.17)	6 (16.22)	15 (22.06)	9 (12.86)	3 (11.11)
AG	23 (47.92)	21 (56.76)	30 (44.12)	30 (42.86)	9 (33.33)
GG	11 (22.92)	10 (27.03)	23 (33.82)	31 (44.29)	15 (55.56)
Alelo A	0.53	0.45	0.44	0.34	0.28
Alelo G	0.47	0.55	0.56	0.66	0.72

Se realizó una sub-estratificación de la muestra de casos en un grupo de “Localización alta” y uno de “Localización baja”, al incluir en el primero a los niveles torácico y toracolumbar, y en el segundo a los niveles lumbar, lumbosacro y sacro. Se compararon las frecuencias genotípicas y alélicas entre estos sub-estratos incluyendo solos los genotipos homocigotos para el alelo silvestre y los homocigotos para la variante mutante (tabla 11). Posteriormente se

comparan las frecuencias genotípicas y alélicas entre el grupo de “Localización alta” y los controles (tabla 12) y entre el grupo de “Localización baja” y los controles (tabla 13).

Tabla 11. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas entre los grupos de localización alta y los de localización baja, considerando sólo los genotipos homocigotos silvestres y homocigotos mutantes.

Variante génica	Localización alta [n (1.00)]	Localización baja [n (1.00)]	X ²	P	OR	IC 95%
ATIC C347G						
CC	33 (0.805)	70 (0.737)	0.72	0.3957	0.679	0.239-1.770
GG	8 (0.195)	25 (0.263)				
<i>Total</i>	<i>41</i>	<i>95</i>				
Alelo C	66 (0.805)	140 (0.737)	1.44	0.2297	0.679	0.335-1.323
Alelo G	16 (0.195)	50 (0.263)				
BHMT G716A						
GG	36 (0.800)	65 (0.714)	1.16	0.2820	0.625	0.232-1.569
AA	9 (0.200)	26 (0.286)				
<i>Total</i>	<i>45</i>	<i>91</i>				
Alelo G	72 (0.800)	130 (0.714)	2.31	0.1281	0.625	0.320-1.186
Alelo A	18 (0.200)	52 (0.286)				
NCAM1 A>G						
AA	20 (0.488)	27 (0.281)	5.44	0.0197	0.411	0.180-0.941
GG	21 (0.512)	69 (0.719)				
<i>Total</i>	<i>41</i>	<i>96</i>				
Alelo A	40 (0.488)	54 (0.281)	10.88	0.0010	0.411	0.233-0.728
Alelo G	42 (0.512)	138 (0.719)				

Para las variantes *ALDH1L1* y *GART*, por la baja frecuencia de alguno de los valores observados, se utilizó la prueba exacta de Fisher (a dos colas) para estimar el OR:

Variante génica	Localización alta [n (1.00)]	Localización baja [n (1.00)]	Valor P prueba exacta Fisher	OR	IC 95%
ALDH1L1 A237G					
AA	65 (0.985)	138 (0.986)	1.00	1.062	0.018-20.729
GG	1 (0.015)	2 (0.014)			
<i>Total</i>	<i>66</i>	<i>140</i>			
Alelo A	130 (0.985)	276 (0.986)	1.00	1.062	0.095-7.514
Alelo G	2 (0.015)	4 (0.014)			
GART G1261A					
GG	2 (0.028)	0	0.111	0	(Cornfield) 0-0.957
AA	70 (0.972)	143 (1.00)			
<i>Total</i>	<i>72</i>	<i>143</i>			
Alelo G	4 (0.028)	0	0.012	0	(Cornfield) 0-0.475
Alelo A	140 (0.972)	286 (1.00)			

Tabla 12. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas entre el grupo de MMC de localización alta y los controles

Variante génica	Localización alta [n (1.00)]	Controles [n (1.00)]	X ²	P	OR	IC 95%
ATIC C347G						
CC	33 (0.805)	115 (0.833)	0.18	0.6725	1.212	0.428-3.137
GG	8 (0.195)	23 (0.167)				
<i>Total</i>	<i>41</i>	<i>138</i>				
Alelo C	66 (0.805)	230 (0.833)	0.36	0.5499	1.212	0.600-2.351
Alelo G	16 (0.195)	46 (0.167)				
BHMT G716A						
GG	36 (0.800)	95 (0.704)	1.58	0.2088	0.594	0.230-1.410
AA	9 (0.200)	40 (0.296)				
<i>Total</i>	<i>45</i>	<i>135</i>				
Alelo G	72 (0.800)	190 (0.704)	3.16	0.0755	0.594	0.313-1.086
Alelo A	18 (0.200)	80 (0.296)				
NCAM1 A>G						
AA	20 (0.488)	42 (0.294)	5.37	0.0204	0.436	0.202-0.949
GG	21 (0.512)	101 (0.706)				
<i>Total</i>	<i>41</i>	<i>143</i>				
Alelo A	40 (0.488)	84 (0.294)	10.75	0.0010	0.436	0.256-0.746
Alelo G	42 (0.512)	202 (0.706)				

Para las variantes *ALDH1L1* y *GART*, por la baja frecuencia de alguno de los valores observados, se utilizó la prueba exacta de Fisher (a dos colas) para estimar el OR:

Variante génica	Localización alta [n (1.00)]	Controles [n (1.00)]	Valor P prueba exacta Fisher	OR	IC 95%
ALDH1L1 A237G					
AA	65 (0.985)	214 (0.977)	1.00	0.658	0.014-6.044
GG	1 (0.015)	5 (0.023)			
<i>Total</i>	<i>66</i>	<i>219</i>			
Alelo A	130 (0.985)	428 (0.977)	0.74	0.658	0.069-3.149
Alelo G	2 (0.015)	10 (0.023)			
GART G1261A					
GG	2 (0.028)	1 (0.005)	0.16	0.167	0.003-3.288
AA	70 (0.972)	209 (0.995)			
<i>Total</i>	<i>72</i>	<i>210</i>			
Alelo G	4 (0.028)	2 (0.005)	0.04	0.167	0.015-1.187
Alelo A	140 (0.972)	418 (0.995)			

Tabla 13. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas entre el grupo de MMC de localización baja y los controles.

Variante génica	Localización baja [n (1.00)]	Controles [n (1.00)]	X ²	P	OR	IC 95%
ATIC C347G						
CC	70 (0.737)	115 (0.833)	3.20	0.0735	1.786	0.895-3.561
GG	25 (0.263)	23 (0.167)				
<i>Total</i>	95	138				
Alelo C	140 (0.737)	230 (0.833)	6.41	0.0114	1.786	1.107-2.880
Alelo G	50 (0.263)	46 (0.167)				
BHMT G716A						
GG	65 (0.714)	95 (0.704)	0.03	0.8638	0.95	0.505-1.773
AA	26 (0.286)	40 (0.296)				
<i>Total</i>	91	135				
Alelo G	130 (0.714)	190 (0.704)	0.06	0.8083	0.95	0.613-1.466
Alelo A	52 (0.286)	80 (0.296)				
NCAM1 A>G						
AA	27 (0.281)	42 (0.294)	0.04	0.8350	1.063	0.578-1.969
GG	69 (0.719)	101 (0.706)				
<i>Total</i>	96	168				
Alelo A	54 (0.281)	84 (0.294)	0.09	0.7683	1.063	0.696-1.629
Alelo G	138 (0.719)	202 (0.706)				

Para las variantes *ALDH1L1* y *GART*, por la baja frecuencia de alguno de los valores observados, se utilizó la prueba exacta de Fisher (a dos colas) para estimar el OR:

Variante génica	Localización baja [n (1.00)]	Controles [n (1.00)]	Valor P prueba exacta Fisher	OR	IC 95%
ALDH1L1 A237G					
AA	138 (0.986)	214 (0.977)	0.71	0.620	0.058-3.858
GG	2 (0.014)	5 (0.023)			
<i>Total</i>	140	219			
Alelo A	276 (0.986)	428 (0.977)	0.58	0.620	0.141-2.177
Alelo G	4 (0.014)	10 (0.023)			
GART G1261A					
GG	0	1 (0.005)	1.00	NP	NP
AA	143 (1.00)	209 (0.995)			
<i>Total</i>	143	210			
Alelo G	0	2 (0.005)	0.517	NP	NP
Alelo A	286 (1.00)	418 (0.995)			

Además se realizaron comparaciones sistemáticas entre las frecuencias alélicas a partir de los genotipos homocigotos silvestres y homocigotos mutantes para cada grupo de acuerdo al

nivel de localización (sin estratificarlos en grupos) (ver Anexo II). Destacando que la variante alélica G de del gen NCAM1 mostraba un OR de 0.33 (IC 95%= 0.17-0.66); $X^2= 12.8$; $p= 0.004$) al comparar el grupo de localización torácica con el resto, y un OR de 2.22 (IC 95% 1.18-4.30; $X^2=6.99$; $p=0.008$) al comparar el grupo de localización lumbosacro con el resto. Dado el reducido número de casos que representa el grupo de localización sacra, esta misma variante mostró un OR de 2.93 con un valor de $p=0.017$, pero con intervalos de confianza al 95% más amplios (1.14-8.93; $X^2= 5.72$).

Al realizar el análisis de desequilibrio de transmisión por medio de la prueba TDT (tabla 14) se encontró que para la variante *ALDH1L1* existe transmisión preferencial del alelo G.

Tabla 14. Resultados de la prueba TDT para los tríos y las variantes en estudio.

Variante	Transmisiones informativas / N	Alelo	Observado	Esperado	X^2	Valor P
<i>ALDH1L1</i>	75 / 250	A	28	37.5	4.813	0.2824
<i>A2378G</i>		G	47	37.5		
<i>ATIC</i>	234 / 250	C	117	117	0	1.0000
<i>C347G</i>		G	117	117		
<i>BHMT</i>	235 / 250	G	117	117.5	0.004	0.9479
<i>G716A</i>		A	118	117.5		
<i>GART</i>	68 / 250	G	36	34	0.235	0.6276
<i>G1261A</i>		A	32	34		
<i>NCAM1</i>	229 / 250	A	115	114.5	0.004	0.9473
<i>A>G</i>		G	114	114.5		

Para el análisis de interacción génica se utilizó el programa MDR v.2.0 beta 8.4, sin encontrar alguna interacción con resultado significativo cuyo valor TBA fuera mayor a 0.55 ya sea para el modo exhaustivo como para el modo forzado considerando cada una de las posibles combinaciones. Al realizar el análisis de interacción génica utilizando los tríos tampoco se encontraron resultados significativos en ninguno de los modos (es decir, ni en el exhaustivo ni en el forzado). En el anexo III se incluyen detalles de este análisis.

10. DISCUSIÓN.

Este estudio representa uno de los primeros esfuerzos en evaluar la contribución genética para riesgo de MMC en población mexicana mestiza. Los mexicanos son una mezcla poblacional de ancestrías europea, nativo americana y africana, está última en una pequeña proporción (1-3%)⁽⁸⁴⁾. Existen diferencias entre poblacionales significativas en la prevalencia de DTN, siendo la población mexicana de las que han mostrado mayores prevalencias al nacimiento: 1 caso de DTN por cada 364 nacimientos^(3, 68), y en particular para MMC de 1 por 1000 nacimientos⁽³⁾.

Estas diferencias en la prevalencia, así como la diversidad de los resultados reportados en estudios de asociación, refleja la compleja etiología y heterogeneidad del MMC. También refleja la necesidad de realizar estudios en las diferentes poblaciones para caracterizar asociaciones etiológicas y de riesgo propios de cada una de ellas, y así dirigir las mejores estrategias de prevención a nivel poblacional. A pesar de la alta prevalencia de esta MC en nuestra población, a la fecha no se han realizado estudios genómicos de asociación para MMC en un tamaño de muestra y con el número de genes y variantes de la magnitud del presente.

Se analizaron variantes génicas frecuentes de 5 genes con una expresión biológica como para ser considerados genes candidato de riesgo para esta malformación congénita. La muestra estudiada fue de 250 familias nucleares (tríos) reclutados en 15 CRIT de diferentes estados del país así como en 250 controles correspondientes a recién nacidos vivos no malformados provenientes de las mismas regiones.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas (DES) en las frecuencias alélicas de las 5 variantes genéticas estudiadas en nuestra población en comparación con las reportadas en otras poblaciones (Tabla 15) de diferente origen étnico que figuran en la base de datos del proyecto HapMap⁽⁶⁵⁾.

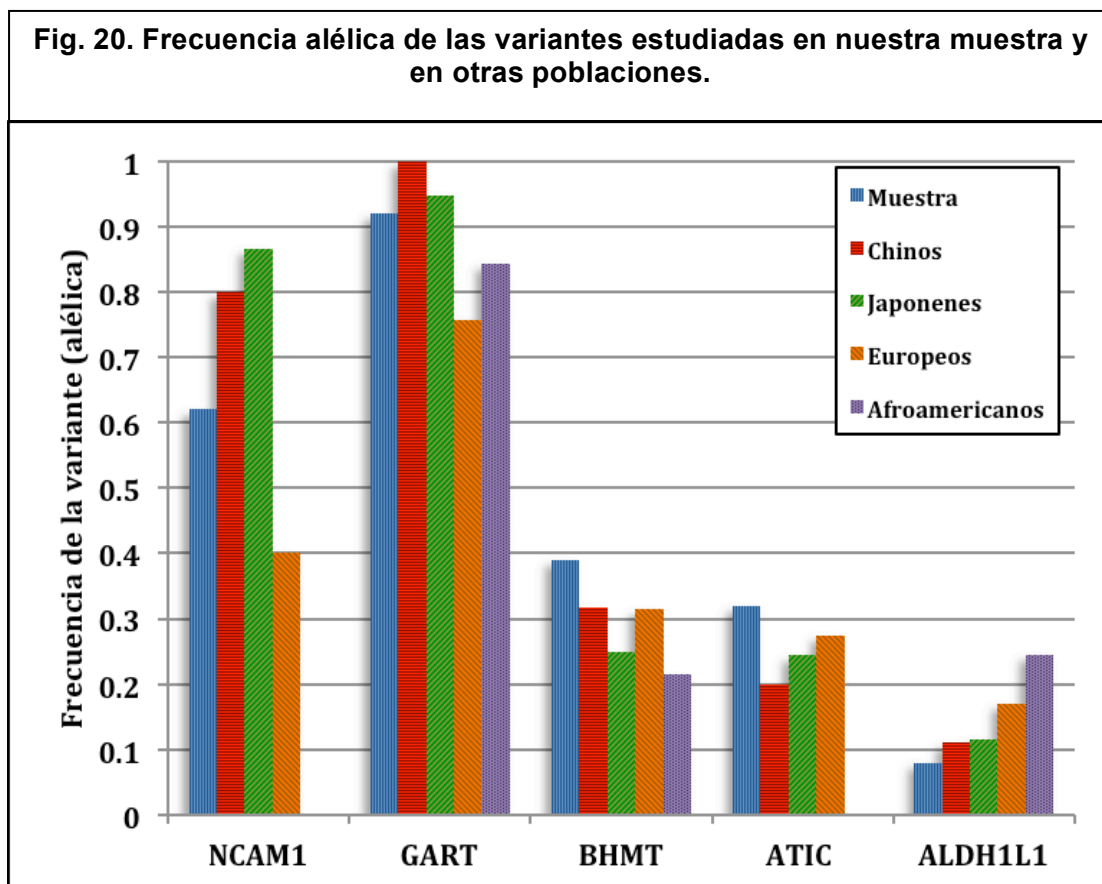
Si bien esto podría ser un resultado esperado dada la diversidad étnica con las otras poblaciones, la magnitud de las diferencias podría ser un indicador de las características propias de nuestra población y de la necesidad de realizar estudios de este tipo en cada población específica, para así definir el componente genético de enfermedades complejas como el MMC.

Tabla 15. Resultados que muestran diferencias estadísticamente significativas de las frecuencias de las variantes genéticas observadas en la muestra estudiada en comparación con otras poblaciones de diferente origen étnico.

Variante en estudio	Población de referencia	X ²	Valor P
ALDH1L1 A2378G	Europea	13.02	0.0003
	Afroamericana	22.44	0.0005
ATIC C347G	China	4.90	0.0268
BHMT G716A	Europea	3.86	0.0496
	Japonesa	10.97	0.0009
	Afroamericana	10.96	0.0009
GART G1261A	Europea	34.15	0.0005
	China	(*) 0.0013	
	Afroamericana	4.86	0.0275
NCAM1 A>G	Europea	18.83	0.0005
	Japonesa	20.90	0.0005
	China	11.04	0.0009

(*) Valor P con prueba exacta de Fisher a dos colas.

Los resultados de las frecuencias de las variantes estudiadas en los genes *ALDH1L1*, *ATIC*, *BHMT*, *GART* y *NCAM1* sugieren que nuestra población es más parecida a la población china y a la japonesa que a las poblaciones de origen europeo y africano (Figura 20).



Se observó también que la variante rs1127717 del gen *ALDH1L1* (A2378G) muestra transmisión preferencial ($X^2=4.813$; $p=0.028$) al realizar el análisis de segregación con la prueba TDT. El gen *ALDH1L1* se localiza en el loci 3q21.3 y codifica para la enzima citosólica miembro L1 de la familia 1 de aldehído deshidrogenasa. La enzima ALDH1L1 cataliza la oxidación dependiente de NADP del 10-formiltetrahydrofolato (10f-THF) hacia tetrahydrofolato (THF) y CO₂, así como la escisión hidrolítica del 10f-THF hacia THF y ácido fórmico. La enzima también oxida algunos aldehídos (NADPH) (Fig. 12).

Pangilinan *et al*⁽⁶⁶⁾ realizó un estudio de asociación genética para DTN (principalmente EB) en población irlandesa, incluyendo entre las variantes de otros genes, 35 SNPs del gen *ALDH1L1*, sin encontrar transmisión preferencial para alguno de estos SNPs en 320 familias.

Por otro lado Franke *et al*⁽⁶¹⁾ en su estudio de casos y controles en población danesa que incluyó a 180 casos con EB y a 190 controles, encontró una asociación significativa para la variante rs1127717 del gen *ALDH1L1*, reportando para el genotipo GG un OR de 4.48 (IC 95% de 1.24 a 16.15). En el estudio de Marini *et al*⁽⁵⁹⁾ de casos (241 recién nacidos con EB) y controles (239 recién nacidos no malformados) en población hispana y no hispana, se encontró que esta misma variante mostraba tendencia como factor riesgo para DTN en población hispana pero sin alcanzar significancia estadística, e infieren que esta enzima citoplasmática sería deletérea para la síntesis de purinas porque compite con GART y ATIC por el 10f-THF y que, aunque niveles elevados de ALDH1L1 no parece disminuir el 10f-THF, existe una depleción en general de los folatos celulares (especialmente el 5-metil-THF) lo que indica que influye al perturbar el flujo en la dirección reductora de la vía metabólica.

Anthony *et al*⁽⁶⁰⁾ demostró que la enzima ALDH1L1 se expresa específicamente en células de la glía radial que son negativas para la expresión de PAX3, en la línea media del tubo neural durante la embriogénesis murina temprana. No es común observar esta restricción de la expresión en la línea media para los componentes del metabolismo de folatos, ya que por ejemplo MTFHD1 muestra una expresión amplia y aparentemente ubicua en el tubo neural. Trabajos previos habían mostrado que *in vitro*, la enzima ALDH1L1 tiene efectos antiproliferativos. Anthony *et al*, demostró que la regulación a la alta de *ALDH1L1* durante el desarrollo del SNC correlaciona con una proliferación reducida y que la mayoría de las células ALDH1L1 (+) en la línea media son quiescentes. Con estos experimentos se proveyó evidencia sobre la existencia de diferencias localizadas en la regulación del metabolismo del folato dentro del desarrollo temprano del tubo neural, sugiriendo que el folato podría modular la proliferación

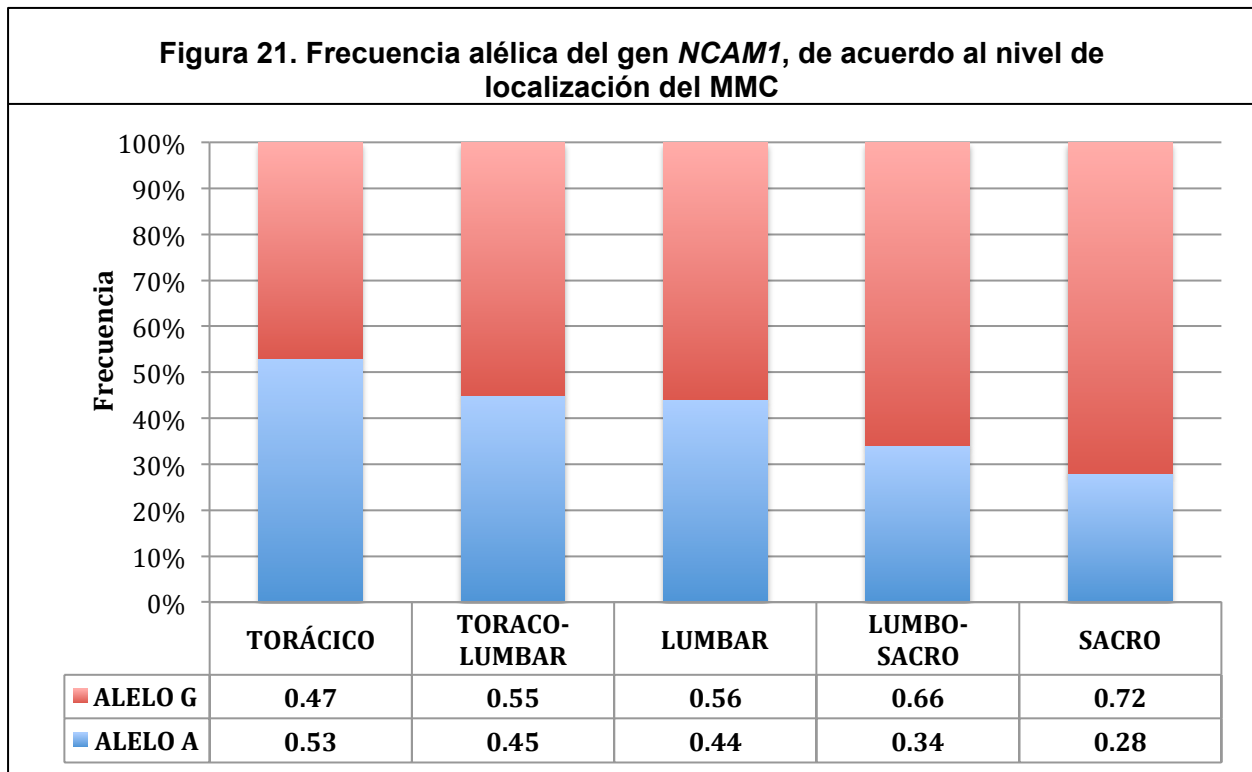
por medio de efectos sobre las células ALDH1L1 (+) de la línea media. Para analizar el papel que podría tener *ALDH1L1* en la neurulación, analizaron una cepa de ratón con microdeleición de *Aldh1l1* y no observaron ni incremento en la falla del cierre del TN ni defectos detectables en la proliferación. Aunque esto indicaría que mutaciones en *Aldh1l1* con pérdida de función no alteran estos procesos en el ratón. El hecho de mostrar expresión específica en la línea media y su estabilidad para suprimir predominantemente la proliferación en una forma sensible a folatos puede sugerir que las mutaciones en *ALDH1L1* que contribuyen a enfermedad son más bien del tipo de ganancia de función.

Sería de interés analizar en nuestra población el conjunto de variaciones no sinónimas en los componentes de la vía que interaccionan con ALDH1L1 tanto río arriba como abajo en la cascada de reacciones enzimáticas de estas vías, y en una muestra de mayor tamaño para detectar efectos menores que en conjunto confieren un mayor riesgo para el desarrollo de DTN.

Consideramos que la estratificación por sub-fenotipos, en la medida de lo posible al realizar estudios de asociación genética para enfermedades complejas, es de vital importancia para la identificación de correlaciones genotipo-fenotipo. Este tipo de estrategia se ha reportado con escasa frecuencia en los estudios de asociación genética para los DTN.

Relton *et al* ⁽⁸³⁾ analizó polimorfismos en los genes *MTHFR* (C677T), *GCPII* (C1561T) y *RFC-1* (G80A) en una población de 211 madres de un grupo heterogéneo de DTN (EBA 59%; EBO 17%; anencefalia 17%; otros 3.7%) originarias del Reino Unido. En este estudio se estratificaron las frecuencias alélicas y genotípicas de acuerdo al fenotipo de la descendencia afectada, encontrándose que la variación en el nivel de riesgo para DTN se asociaba con diferentes fenotipos. Los hallazgos de este estudio sugieren que la heterogeneidad fenotípica de los DTN puede explicar los diversos resultados entre los estudios de asociación y que diferentes polimorfismos pueden conferir diferentes grados de significancia para cada fenotipo de DTN. Sin embargo, en este estudio no se sub-estratificó cada fenotipo en sub-fenotipos, entendiendo que si bien podrían existir diferencias en la varianza genética de riesgo de acuerdo al fenotipo en base a sus diferencias etiopatogénicas (y en el momento en que ocurren durante el desarrollo embriológico) es posible que también existan diferencias en la variación genética de riesgo de acuerdo a los sub-fenotipos. Siendo que los tipos más frecuentes de DTN son la anencefalia y el mielomeningocele y que cada uno de estos corresponde a un fenotipo, la clasificación por subfenotipos en el caso de este último correspondería a la estratificación de acuerdo al nivel de localización del defecto.

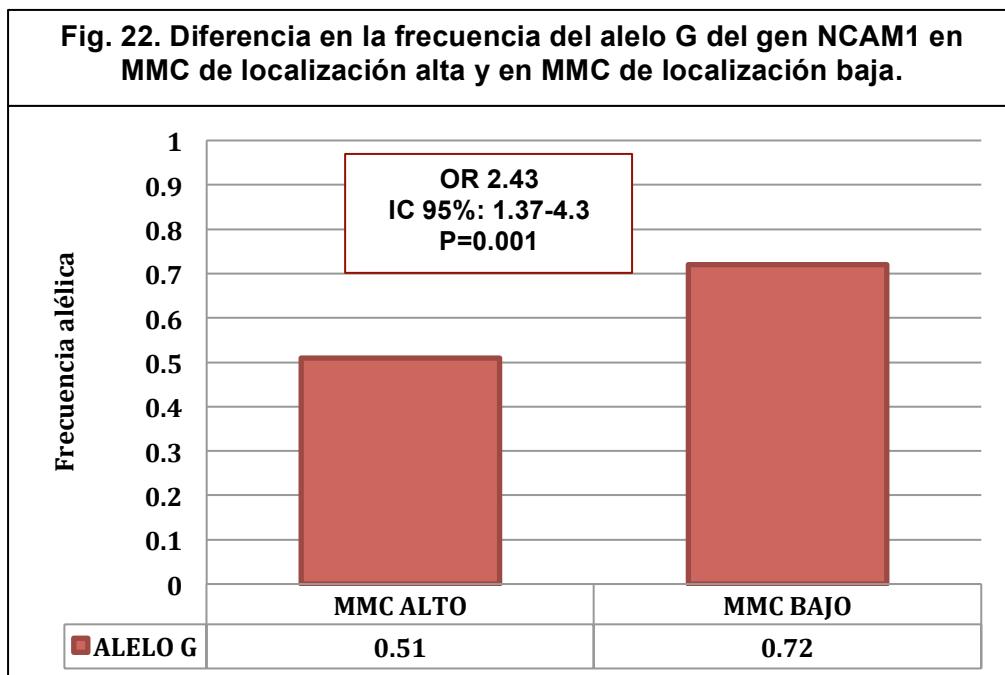
Hemos encontrado que al estratificar la muestra por sub-fenotipos de localización (Figura 21) existe una asociación de riesgo entre la variante rs2298526 del gen *NCAM1* (A>G) y MMC de localización más inferior. Esto se evidenció mediante una correlación inversa entre la frecuencia del alelo G y la gravedad del fenotipo al observar un gradiente de mayor frecuencia conforme la expresión del fenotipo es de localización más inferior en la columna (desde el nivel torácico hacia el sacro).



En base a esta distribución, la variante rs2298526 del gen *NCAM1* (A>G) representa un factor de riesgo para las localizaciones más bajas del MMC como la lumbosacra ($\chi^2=6.99$; $p=0.008$; OR= 2.22; IC 95% 1.18-4.30). Es de considerar que, aunque el MMC sacro es poco frecuente y que los individuos incluidos en este grupo son relativamente pocos ($n=27$; 11% del total), se observa que este riesgo se incrementa al demostrar que para el MMC sacro es ligeramente mayor al del MMC lumbosacro, con resultados estadísticamente significativos ($\chi^2=5.72$; $p=0.017$; OR 2.93; IC 95%= 1.14-8.93).

Para valorar el efecto de esta asociación sin sacrificar la cantidad de individuos incluidos en cada nivel de localización del MMC estratificamos a los sub-fenotipos torácico y toracolumbar en el grupo de “localización alta” y a los lumbares, lumbosacros y sacros en el grupo de “localización baja” y determinamos las frecuencias alélicas considerando solo los genotipos homocigotos silvestres y homocigotos mutantes para la variante rs2298526 del gen *NCAM1*. De

esta manera se muestra que esta variante confiere riesgo para el MMC de localización baja (lumbar, lumbosacra y sacro) al compararse con el grupo de MMC de localización alta (OR 2.43; $p=0.001$) (Figura 22).



En el estudio de Deak *et al* ⁽⁶²⁾ en el que evaluaron familias americanas caucásicas con MMC lumbosacro ($n=132$) se encontró una asociación de riesgo entre esta misma variante del gen *NCAM1* (FBAT: $p=0.0018$ para el alelo G; PDT $p=0.0025$), que no logró replicarse en 72 familias adicionales concluyendo podría tratarse de una asociación inicial espuria ó, deberse a la complejidad genética implícita en los mismos DTN. Para poder investigar más a fondo esta posible asociación, el grupo de investigación de Deak *et al* analizó el patrón de expresión de la proteína *NCAM1* en embriones humanos no afectados. Los embriones fueron obtenidos de terminaciones legales de embarazos; incluyeron embriones en estadios de Carnegie 9 a 19, así como cordones espinales de fetos de 22 a 27 somitas (controles positivos). Mediante inmunohistoquímica usando anticuerpos primarios diferentes que reconocen en conjunto todas las isoformas *NCAM1*. Encontraron que *NCAM1* no se expresa dentro del tubo neural al momento del cierre, sino que lo hace en las neuronas de alrededor y más tarde en las neuronas diferenciadas del SNC.

El gen *NCAM1* localizado en el loci 11q23.1 codifica para la molécula de adhesión celular neural 1, una proteína integral de membrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, participa en eventos morfogénicos dependientes de adhesión celular,

incluyendo la migración de varios tipos celulares a los sitios apropiados en los tejidos neurales. La molécula NCAM1 es un importante participante en la adhesión célula-célula y célula-matriz y esta involucrado en muchas actividades, incluyendo la migración celular, el crecimiento de neuritas, la guía axonal, y la plasticidad sináptica.

En el ratón, la expresión de *Ncam* coincide con la formación del tubo neural alrededor del día 8 de gestación, y con la elevación completa y cierre alrededor del día 10. La expresión no es uniforme a lo largo del eje rostrocaudal, mostrando una mayor expresión en la región caudal del tubo neural y de la placa neural. La expresión de *Ncam* continúa hasta el día 12.5, pero se restringe a las neuronas posmitóticas en estadios posteriores. *Ncam* también se expresa en embriones de *Xenopus* en un patrón radial dentro del tubo neural durante y por varias horas tras el cierre del tubo neural. En el pez cebra *zNcam* se expresa a lo largo del tubo neural en proceso de cierre, desde la 11 hora post-fecundación a la 30 hora post-fecundación, durante la somitogénesis. En embriones de codorniz ⁽⁸⁵⁾ con DTN espontáneos se ha observado que para los defectos abiertos la epidermis adyacente que expresa E-cadherina es continua con el tejido neural marcado con N-cadherina. Para los defectos cerrados existe una capa epidermis superficial que no se separa del tejido neural subyacente, y esta capa expresa E-cadherina (como en embriones normales) pero también co-expresa N-cadherina y NCAM, que normalmente no se encuentran en estas regiones. Estas observaciones muestran que las moléculas de matriz y de adhesión celular están distribuidas en los DTN no inducidos al momento de la neurulación y que podrían estar implicadas en la generación de estos defectos al alterar los eventos morfogénicos dependientes de adhesión celular.

A nuestro conocimiento este es el primer estudio en analizar la posible correlación genotipo-subfenotipo y en encontrar tal correlación con la variante rs2298526 del gen *NCAM1* (A>G). Es posible que Deak *et al* haya encontrado asociación cuando comparó casos y controles para esta variante del gen *NCAM1* en su muestra constituida sólo por MMC lumbosacro, pero no como se mencionó previamente cuando intentó replicar su observación al analizar otra muestra integrada por DTN de distinta localización. Se requieren estudios que caractericen mejor el patrón de expresión de la proteína en embriones humanos evaluando no solo el proceso de neurulación primaria si no también la neurulación secundaria y la etapa de diferenciación retrogresiva. Probablemente, a diferencia del análisis realizado en el presente estudio, Deak *et al* no intentó un análisis comparativo no solo con controles sino también entre los diferentes sub-fenotipos o localización del MMC.

En humanos se ha establecido que durante el neurodesarrollo el cierre del neuroporo posterior ocurre aproximadamente a nivel de la segunda vértebra lumbar, y que a partir de ese punto y en sentido caudal, el proceso se denomina neurulación secundaria. Clásicamente se acepta que defectos en la neurulación primaria causan DTN abiertos y que defectos en la neurulación secundaria causan DTN cerrado u ocultos. Siendo ambos procesos de neurulación parte de un continuo de eventos sobre puestos en tiempo y espacio: Es probable que defectos que afecten la parte final de la neurulación primaria y la inicial de la neurulación secundaria constituyan un grupo con una varianza etiopatogénica común. Por lo anterior sería conveniente evaluar en estudios posteriores el papel de este gen candidato en el riesgo no solo del mielomeningocele y de otras variedades de espina bífida abierta, si no también de la espina bífida oculta.

Si bien no se ha encontrado una explicación al desequilibrio de Hardy-Weinberg en las variantes génicas de *NCAM1* y *ALDH1L1*, tal desequilibrio solo se observó en el grupo de madres para *NCAM1* y en el grupo de controles para *ALDH1L1*. Probablemente se deba en parte al tamaño de la muestra, lo cual podría verificarse en futuros estudios.

No se encontraron interacciones gen-gen significativas, lo cual pudiera explicarse por el tamaño de la muestra requerido para su identificación, pero sobre todo porque la selección de las variantes incluidas en este estudio no se basaron precisamente en genes participantes en una misma vía funcional. Planeamos realizar en breve un estudio duplicando el tamaño de la muestra y con un mayor número de genes implicados directa o indirectamente con la vía del metabolismo de folatos y otras vías distintas, con el propósito de aumentar la probabilidad de identificar posibles interacciones gen-gen y gen-ambiente.

No se observaron resultados significativos para las variantes de los genes *ATIC*, *BHMT* y *GART*. En el estudio de casos y controles de Marini *et al*⁽⁵⁹⁾ se encontró que la variante del gen *ATIC* rs2372536 mostraba una mayor frecuencia en controles que en los casos aunque sin alcanzar significancia estadística significativa (OR 0.70, IC 95% 0.47-1.02). Estos resultados difieren respecto a los nuestros pues en casi todos los análisis esta variante mostró tendencia al riesgo más que un efecto protector, sin embargo tampoco se logró alcanzar significancia estadística. Es probable que se defina su asociación como variante de riesgo cuando amplíemos el tamaño de la muestra de nuestro estudio como se mencionó previamente.

Respecto a la variante del gen *BHMT*, reportado previamente como de riesgo para EB⁽⁶³⁾, y a la variante del gen *GART* reportado previamente como protector del riesgo de EB. Es posible que en nuestra muestra no se haya evidenciado dicho efecto, probablemente debido a las características genética de nuestra población (ver tabla 6 y 7).

El que no hayamos logrado replicar algunas asociaciones significativas reportadas en estudios previos puede ser el resultado de la complejidad genética del MMC en humanos, una probable asociación espuria en algunos de esos estudios, sin descartar como un factor importante la estructura genética de nuestra población. Este estudio representa un importante aporte a la investigación de factores de riesgo genético, siendo uno de los primeros en realizarse en nuestra población con una muestra magnitud considerable integrando un diseño de familias nucleares, de casos y controles y de sub-fenotipos de riesgo dependiendo de la localización del MMC.

Nuestros resultados apoyan el papel que desempeñan los genes *NCAM1* y *ALDH1L1* en el riesgo de desarrollar MMC en nuestra población. Estos hallazgos permiten apoyar la hipótesis de que mecanismos genéticos diversos pueden participar en el desarrollo de esta malformación congénita. Los mismos muestran una correlación genotipo-fenotipo para el primero y de desequilibrio de transmisión para el segundo, siendo recomendable realizar este tipo de estudios de asociación tomando en consideración la estratificación de la muestra por sub-fenotipos de gravedad o localización del defecto en el estudio de otras malformaciones congénitas. En estudios futuros será importante la validación de nuestros hallazgos en una o más muestras de MMC de la población mestiza-mexicana y de las diversas etnias de nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA.

- (1) Padmanabhan R., 2006. *Etiology, pathogenesis and prevention of neural tube defects*. *Congenital Anomalies*, (46) 55-67
- (2) Greene N.D, Coop A.J. 2005. *Mouse Models of Neural Tube Defects: Investigating Preventive Mechanisms*. *Am J Med Gen. Part C*: (135) 31-41.
- (3) ICBDSR. 2009. *México, RYVEMCE*. Annual Report: 163-8.
- (4) Mutchinick O. 1996. *Los defectos del tubo neural: genética, ambiente y algo más*. *Revista de la UNAM*, (151) 18-21.
- (5) Mutchinick O, Lisker R, Babinski V. 1988. *Programa Mexicano de "Registro y Vigilancia Epidemiológica de Malformaciones Congénitas Externas"*. *Salud Publica Mex.* (30) 88- 100.
- (6) Moore CA, Li S, Li Z, et al. 1997. *Elevated rates of severe neural tube defects in a high prevalence area in northern China*. *Am J Med Genet* (73) 113-118.
- (7) Holmes LB, et al. 1994. *Spina bifida: anticonvulsants and other maternal influences*. In *neural tube defects*. Wiley, Chichester (Ciba Found Symp 181) 232-244.
- (8) Blomberg MI, Kallen B. 2010. *Maternal obesity and morbid obesity: the risk for birth defects in the offspring*. *Birth Defects Res Part A* 88: 35-40.
- (9) Gilboa S.M., et al. 2011. *Influencing clinical practice regarding the use of antiepileptic medications during pregnancy*. *Am J Med Genet, Part C* (157) 234-246.
- (10) Kit Sing Au, et al. 2010. *Epidemiologic and Genetic Aspects of Spina Bifida and Other Neural Tube Defects*. *Dev Disab Res Rev* (16) 6-15.
- (11) Czeizel AE, Dudás J. 1992. *Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation*. *N Engl J Med.* (327) 1832-1835.
- (12) Wald N, et al. 1991. *Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study*. *Lancet* (338) 131-137.
- (13) Berry RJ, et al. 1999. *Prevention of neural tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention*. *N Engl J Med* (341) 1485-1490
- (14) Grosse SD, Coollins JS. 2007. *Folic acid supplementation and neural tube defect recurrence prevention*. *Birth Def Res A Clin Mol Teratol* (79) 737-742.
- (15) Centers for Disease Control. 1992. *Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 41 (RR-14).
- (16) Centers for Disease Control. 1991. *Use of folic acid for prevention of spina bifida and other neural tube defects – 1983-1991*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 40: 513-516.

- (17) Guéant JL, Chabi NW, Guéant RM, Mutchinick OM, et al. 2007. *Environmental influence on the worldwide prevalence of a 776C→G variant in the transcobalamin gene (TCN2)*. J Med Genet (44) 363-367.
- (18) Mersereau P., et al. 2004. *Spina bifida and anencephaly before and after folic acid mandate, United States, 1995-1996 and 1999-2000*. MMWR. 53(17): 362-365.
- (19) Wilcken B, Bamforth, Mutchinick OM., et al. 2003. *Geographical and ethnic variation of the 677T of MTHFR: finding from over 7000 newborns from 16 areas worldwide*. J Med Genet (40) 619-625.
- (20) Guéant RM, Guéant JL, Mutchinick OM, et al. 2006. *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; (83) 701-7.
- (21) Mutchinick OM, López MA, et al. 1999. *High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in México: a country with a very high prevalence of neural tube defects*. Mol Genet and Metab (68) 461-467.
- (22) Días MS, McLone DG, Partington M. 2003. *Normal and abnormal embryology of the spinal cord and spine*. Youmans Neurological Surgery, ed 5; Winn HR, WB Saunders. Vol 4, pp 4239-88
- (23) Gilbert SF. 2003. *Developmental Biology*. Sunderland, MA. Ed 7. Sinauer Associates.
- (24) Müller F, O’Rahilly R. 1987. *The development of the human brain, the closure of the caudal neuropore, and the beginning of secondary neurulation at stage 12*. Anat Embryol (176) 413-430.
- (25) Mc Lone DG., Knepper PA. 1989. *The cause of Chiari II malformation: a unified theory*. Pediatr Neurosurg (15) 1-12.
- (26) KZ X. 1989. *The epidemiology of neural tube defects in China*. China J Med (69) 189-191.
- (27) Gu X, Lin L, Zheng T, Song X, et al. 2007. *High prevalence of NTDs in Shanxi Province: a combined epidemiological approach*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol (79) 702-707.
- (28) Coop AJ, Greene ND. 2010. *Genetics and development of neural tube defects*. J Pathol (220) 217-230.
- (29) Harris MJ, Juriloff DM. 2007. *Mouse mutants with neural tube closure defects and their role in understanding human neural tube defects*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol (79) 187-210.
- (30) Robinson A, Escuin S, Doudney K, Vekemans M, Stevenson RE, et al. 2012. *Mutations in the planar cell polarity genes CELSR1 and SCRIB are associated with the severe neural tube defect craniorachischisis*. Hum Mutat (33) 440-447.

- (31) Coop AJ, Brook FA, Estibeiro P, et al. 1990. *The embryonic development of mammalian neural tube defects*. Prog Neurobiol (35) 363-403.
- (32) World Health Organization. October 2012. Media Centre; *Congenital Anomalies*. Fact sheet N°370.
- (33) World Health Organization. 2012. *Born too soon; The global action report on preterm birth*. Geneva.
- (34) Curtis, 7a Ed. Cap. 42. *Desarrollo embrionario*. Curtis-Biología. Ed. Panamericana.
- (35) Moore KL, Persaud TVN. 2004. *Embriología clínica*. 7a Ed. Elsevier España.
- (36) O’Rahilly R, Muller F. 1994. *Neurulation in the normal human embryo*. Ciba Found Symp. (181) 70-82; discussion 82-9.
- (37) Mattsson S, Gladh G. 2005. *Children with meningomyelocele become adults*. Lakartidningen. Sep 12-18-2005; 102(37): 2566-70.
- (38) Drolet B. 1998. Birthmarks to worry about. *Cutaneous marks of dysraphism*. Dermatol Clin. Jul; 16(3): 447-53.
- (39) George TM, Fagan LH. 2005. *Adult tethered cord syndrome in patients with postrepair myelomeningocele: an evidence-based outcome study*. J Neurosurg. 102(2 Suppl): 150-6.
- (40) McLone DG. 1998. *Care of the neonate with a myelomeningocele*. Neurosurg Clin N Am. Jan 1998; 9(1): 111-120.
- (41) Tubbs RS, Wellons JC, Blount JP, et al. *Transient ventriculoperitoneal shunt dysfunction in children with myelodysplasia and urinary bladder infection*. Report of three cases. J Neurosurg. Mar 2005; 102(2 Suppl): 221-3.
- (42) Harris LW, Oakes WJ. 1996. *Open neural tube defects*. In: Tindall GT, Cooper PR, Barrow DL, eds. *The Practice of Neurosurgery*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996: 2754-77.
- (43) McComb JG, Chen TC. 1996. *Closed spinal neural tube defects*. In: Tindall GT, Cooper PR, Barrow DL, eds. *The Practice of Neurosurgery*. Baltimore: Williams & Wilkins; 2754-77.
- (44) McComb JG. 1997. *Spinal and cranial neural tube defects*. Semin Pediatr Neurol. Sept 1997; 4(3): 156-66.
- (45) Gordon R., 1985. *A review of the theories of vertebrate neurulation and their relationship to the mechanics of neural tube defects*. J Embryol. Exp. Morph. 89, Supplement, 229-255.
- (46) Van der Put NMJ, et al. 1997. *Altered folate and vitamin B12 metabolism in families with spina bifida offspring*. QJ Med (90) 505-510.
- (47) Greene ND, Coop AJ. 2009. *Genetics of human neural tube defects*. Hum Mol Genet, 18 (2) R113-R129

- (48) Steggers-Theunissen RPM, et al. 1994. *Maternal hyperhomocysteinemia: A risk factor for neural tube defects*. Metabolism (43) 1475-1480.
- (49) Groenen PM., et al. 2003. *Maternal myo-inositol, glucose, and zinc status is associated with the risk of offspring with spina bifida*. Am J Obstet Gynecol (189) 1713-1719.
- (50) Hunt GM. 1997. *The median survival time in open spina bifida*. Dev Med Child Neurol 39(2) 108-118.
- (51) Stevenson K.L., et al. 2004. *Chiari type II malformation: past, present, and future*. Neurosurg Focus: 16(2) E5
- (52) Thompson D.N., 2009. *Postnatal management and outcome for neural tube defects including spina bifida and encephaloceles*. Prenat Diagn (29) 412-419.
- (53) McLone DG, Dias MS. 2003. *The Chiari II malformation: cause and impact*. Childs Nerv Syst. 19(7-8): 540-550.
- (54) Steizberg A., et al. 2008. *Ambulation in adults with myelomeningocele. Is it possible to predict the level of ambulation in early life?* Childs Nerv Syst. 24(2): 231-237.
- (55) Cogram P., et al. 2002. *D-chiro-inositol is more effective than myo-inositol in preventing folate-resistan mouse neural tube defects*. Hum Reprod (17) 2451-2458.
- (56) Lee JE, JG G. 2011. *Cilia in the nervous system: linking cilia function and neurodevelopmental disorders*. Curr Opin Neurol (24) 98-105
- (57) Tortori-Donati, et al 2000. *Spinal dysraphism: a review of neuroradiological features with embryological correlations and proporsal for a new classification*. Neuroradiology (42) 471-491.
- (58) Naidich TP, et al. 1996. *Congenital anomalies of the spine and spinal cord*. In: Atlas SW(ed). Magnetic resonance imaging of the brain and spine, 2nd edn. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 1265-1337.
- (59) Marini N.J., et al. 2011. *A genetic signature of spina bifida risk from pathway informed comprehensive gene-variant analysis*. PLOS one. Vol6 (11).
- (60) Anthony T. and Heintz N. 2007. *The folate metabolic enzyme ALDH1L1 is restricted to the midline of the early CNS, suggesting a role in human neural tube defects*. J. Comp. Neurol. 2005: 368-383.
- (61) Franke B., et al. 2009. *An association study of 45 folate related genes in spina bifida: Involvement of cubilin (CUBN) and tRNA aspartic acid methyltransferase 1 (TRDMT1)*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol (85) 216-226.

- (62) Deak KL, et al. 2005. *SNPs in the neural cell adhesion molecular gene may be associated with human neural tube defects*. Hum Genet (117) 133-142
- (63) Shaw GM, et al. 2009. *118 SNPs of folate-related genes and risks of spina bifida and conotruncal heart defects*. BMC Med Genet (10) 49
- (64) Morin I, et al. 2003. *Common variant in betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) and risk for spina bifida*. Am J Med Gen, 119A: 172-176.
- (65) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
- (66) Pangilinan F, et al. 2012. *Evaluation of common genetic variants in 82 candidate genes as risk factors for neural tube defects*. BMB Medical Genetics, 13: 62.
- (67) Au KS, Tran PX, Tsai CC, et al. 2008. *Characteristics of a spina bifida population including North American Caucasian and Hispanic individuals*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, Oct; 82(10): 692-700.
- (68) Annual Report 2012, International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research, *ICBDSR*.
- (69) Juriloff DM, Harris MJ. 2012. *Hypothesis: The female excess in cranial neural tube defects reflects an epigenetic drag of the inactivating X chromosome on the molecular mechanisms of neural fold elevation*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. Epub ahead of print. Jul 2.
- (70) Brown AS, Susser ES. 1997. *Sex differences in prevalence of congenital neural defects after periconceptional famine exposure*. Epidemiology 8:55-58.
- (71) Agopian A.J., Tinker S.C, Lupo PJ, et al. 2013. *Proportion of neural tube defects attributable to known risk factors*. Birth Def Res Part A (97): 42-46.
- (72) Chen X, Shen Y, et al. 2013. *Detection of CNVs reveals association of cilia genes with neural tube defects*. PLOS one. (8)1; e54492
- (73) International HapMap Project: <http://www.hapmap.org/>
- (74) Spielman, R.S. and W. Ewens. 1996. *The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association*. Am J Hum Genet. 59(5): p. 983-9.
- (75) Lazzeronia L.C. and Lange K. 1998. *A conditional inference framework for extending the transmission/disequilibrium test*. Hum Hered. 48(2): p67-81.
- (76) Martin E.R., et al. 2006. *A novel method to identify gene-gene effects in nuclear families: the MDR-PDT*. Genet Epidemiol, 30(2): p. 559-75.
- (77) Moore J.H., et al. 2006. *A flexible computational framework for detecting, characterizing and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility*. J Theor Biol, 241 (2): p.252-61.

- (78) Donkelaar HJ, Lammens M, Hori A. 2006. *Clinical Neuroembryology: developmental disorders of the human central nervous system*. Springer Ed.
- (79) Nakatsu T., Uwabe C., Shiota K. 2000. *Neural tube closure in humans initiates at multiple sites: Evidence from human embryos and implications for the pathogenesis of neural tube defects*. *Anat Embryol (Berl)* 201:455-466.
- (80) Van Allen MI, et al. 1993. *Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans*. *Am J Med Genet* 47: 723-743.
- (81) Newgreen DF., et al. 1997. *Changes in cell adhesion and extracellular matrix molecules in spontaneous spinal neural tube defects in avian embryos*. *Teratology*. Mar; 55(3): 195-207.
- (82) Boyles A.L., et al. 2006. *Neural Tube Defects and Folate Pathway Genes: Family-Based Association Tests of Gene-Gene and Gene-Environment Interaction*. *Environ Health Perspect*.114(19): 1547-1552.
- (83) Relton CL., et al. 2003. *Genetic susceptibility to neural tube defect pregnancy varies with offspring phenotype*. *Clin Genet*. 64: 424-428.
- (84) Price AL, et al. 2007. *A genomewide admixture map for Latino populations*. *Am J Hum Genet*; 80: 1024-36.
- (85) Newgreen DF., et al. 1997. *Changes in cell adhesion and extracellular matrix molecules in spontaneous spinal neural tube defects in avian embryos*. *Teratology*. Mar; 55(3): 195-207.

ANEXOS

Anexo I

Tabla 16. Equilibrio Hardy-Weinberg para las variantes génicas por grupo de estudio.

Genotipo	Padres	Madres	Casos	Controles
ALDH1L1 A237G				
$\chi^2 =$	0.714	0.567	0.123	7.776
P =	0.3982	0.4515	0.725	0.0053
ATIC C347G				
$\chi^2 =$	0.030	0.110	0.027	0.330
P =	0.862	0.739	0.869	0.565
BHMT G716A				
$\chi^2 =$	0.399	0.070	0.097	0.276
P =	0.527	0.792	0.756	0.599
GART G1261A				
$\chi^2 =$	0.160	0.444	0.177	0.394
P =	0.689	0.505	0.674	0.530
NCAM1 A>G				
$\chi^2 =$	0.156	4.635	1.171	2.186
P =	0.693	0.031	0.279	0.139

En base a los resultados anteriores se realizó la verificación manual del equilibrio de Hardy Weinberg para las variantes que mostraron disequilibrio, comprobando el mismo resultado (Tablas 17-21).

Tabla 17. Frecuencias de p y de q para ALDH1L1 y NCAM1 en los distintos grupos en estudio.

Genotipo	Padres	Madres	Casos	Controles
ALDH1L1 A237G				
AA	205	217	203	214
AG	44	31	44	31
GG	1	2	3	5
p	0.91	0.93	0.90	0.92
q	0.09	0.07	0.10	0.08
NCAM1 A>G				
AA	43	49	47	42
AG	125	104	113	107
GG	82	97	90	101
p	0.42	0.40	0.41	0.38
q	0.58	0.60	0.59	0.62

Tabla 18. Frecuencias de p^2 , $2pq$ y q^2 para *ALDH1L1* y *NCAM1* en los distintos grupos en estudio.

Genotipo	Padres	Madres	Casos	Controles
ALDH1L1 A237G				
p^2	0.828	0.865	0.810	0.846
$2pq$	0.164	0.130	0.180	0.148
q^2	0.008	0.005	0.010	0.006
NCAM1 A>G				
p^2	0.176	0.160	0.168	0.144
$2pq$	0.487	0.480	0.484	0.471
q^2	0.336	0.360	0.348	0.384

Tabla 19. Frecuencias esperadas para *ALDH1L1* y *NCAM1* en los distintos grupos en estudio

Genotipo	Padres	Madres	Casos	Controles
ALDH1L1 A237G				
$(p^2)(N)$	207	216	203	211
$(2pq)(N)$	41	33	45	37
$(q^2)(N)$	2	1	2	2
NCAM1 A>G				
$(p^2)(N)$	44	40	42	36
$(2pq)(N)$	122	120	121	118
$(q^2)(N)$	84	90	87	96

Tabla 20. Tabla comparativa de las frecuencias observadas y esperadas para *ALDH1L1* y *NCAM1* en los distintos grupos en estudio

Genotipo	Padres		Madres		Casos		Controles	
	O	E	O	E	O	E	O	E
ALDH1L1 A237G								
AA	205	207	217	216	203	203	214	211
AG	44	41	31	33	44	45	31	37
GG	1	2	2	1	3	2	5	2
NCAM1 A>G								
AA	43	44	49	40	47	42	42	36
AG	125	122	104	120	113	121	107	118
GG	82	84	97	90	90	87	101	96

Tabla 21. Tabla del cálculo de χ^2 para *ALDH1L1* y *NCAM1* en los distintos grupos en estudio obtenidas a partir de la fórmula:

$$\chi^2 = \frac{(\text{frec. obs.} - \text{frec. esp.})^2}{\text{frec. esp.}}$$

Genotipo	Padres	Madres	Casos	Controles
ALDH1L1 A237G				
$[\text{Obs} - (p^2)(N)]^2 / (p^2)(N)$	0.019	0.005	0	0.043
$[\text{Obs} - (2pq)(N)]^2 / (2pq)(N)$	0.219	0.121	0.022	0.973
$[\text{Obs} - (q^2)(N)]^2 / (q^2)(N)$	0.5	1	0.5	4.5
$\chi^2 =$	0.738	1.126	0.522	5.516
NCAM1 A>G				
$[\text{Obs} - (p^2)(N)]^2 / (p^2)(N)$	0.023	2.025	0.595	1
$[\text{Obs} - (2pq)(N)]^2 / (2pq)(N)$	0.074	2.133	0.529	1.025
$[\text{Obs} - (q^2)(N)]^2 / (q^2)(N)$	0.048	0.544	0.103	0.260
$\chi^2 =$	0.145	4.702	1.227	2.285

Anexo II

Tabla 22. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas, de los casos, de solo los genotipos homocigotos, entre los fenotipos de Torácico y el resto (Toracolumbar-Lumbar-Lumbosacro-Sacro).

Variante génica	Torácico n (1.00)	Resto n (1.00)	χ^2	P	OR	IC 95%
ATIC C347G						
CC	20 (0.833)	83 (0.741)	0.92	0.3387	0.572	0.132-1.920
GG	4 (0.167)	29 (0.259)				
<i>Total</i>	<i>24</i>	<i>112</i>				
Alelo C	40 (0.833)	166 (0.741)	1.83	0.1760	0.572	0.219-1.337
Alelo G	8 (0.167)	58 (0.259)				
BHMT G716A						
GG	20 (0.769)	81 (0.401)	0.12	0.7303	0.838	0.251-2.339
AA	6 (0.231)	29 (0.144)				
<i>Total</i>	<i>26</i>	<i>110</i>				
Alelo G	40 (0.769)	162 (0.736)	0.24	0.6259	0.838	0.374-1.770
Alelo A	12 (0.231)	58 (0.264)				
NCAM1 A>G						
AA	14 (0.560)	33 (0.163)	6.39	0.0115	0.328	0.122-0.877
GG	11 (0.440)	79 (0.391)				
<i>Total</i>	<i>25</i>	<i>112</i>				
Alelo A	28 (0.560)	66 (0.295)	12.77	0.0004	0.328	0.167-0.665
Alelo G	22 (0.440)	158 (0.705)				

Para las variantes en los genes *ALDH1L1* y *GART*, dado que el valor esperado para las variantes mutante y silvestre, respectivamente, son menores a 5, se utilizó la prueba exacta de Fisher para estimar el OR:

Variante génica	Torácico n (1.00)	Resto n (1.00)	Valor P prueba exacta Fisher *	OR	IC 95%
ALDH1L1 A237G					
AA	32 (0.970)	171 (0.998)	0.409	2.672	0.044-52.417
GG	1 (0.030)	2 (0.012)			
<i>Total</i>	<i>33</i>	<i>173</i>			
Alelo A	64 (0.970)	342 (0.988)	0.247	2.672	0.236-19.031
Alelo G	2 (0.030)	4 (0.012)			
GART G1261A					
GG	1 (0.024)	1 (0.006)	0.346	0.231	0.003-18.599
AA	40 (0.976)	173 (0.994)			
<i>Total</i>	<i>41</i>	<i>174</i>			
Alelo G	2 (0.024)	2 (0.006)	0.166	0.231	0.016-3.250
Alelo A	80 (0.976)	346 (0.994)			

* Prueba exacta de Fisher a dos colas.

Tabla 23. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas, de los casos, de solo los genotipos homocigotos, entre los fenotipos de Toracolumbar y el resto (Torácico-Lumbar-Lumbosacro-Sacro).

Variante génica	Toracolumbar n (1.00)	Resto n (1.00)	X ²	P	OR	IC 95%
ATIC C347G						
CC	13 (0.765)	90 (0.756)	0.02	0.9397	0.955	0.210-3.421
GG	4 (0.235)	29 (0.244)				
<i>Total</i>	17	119				
Alelo C	26 (0.765)	180 (0.756)	0.01	0.9149	0.955	0.354-2.324
Alelo G	8 (0.235)	58 (0.244)				
BHMT G716A						
GG	16 (0.842)	85 (0.726)	1.14	0.2850	0.498	0.088-1.921
AA	3 (0.158)	32 (0.274)				
<i>Total</i>	19	117				
Alelo G	32 (0.842)	170 (0.726)	2.29	0.1305	0.498	0.163-1.287
Alelo A	6 (0.158)	64 (0.274)				
NCAM1 A>G						
AA	6 (0.375)	41 (0.339)	0.08	0.7746	0.854	0.260-3.073
GG	10 (0.625)	80 (0.661)				
<i>Total</i>	16	121				
Alelo A	12 (0.375)	82 (0.339)	0.16	0.6855	0.854	0.376-2.018
Alelo G	20 (0.625)	160 (0.661)				

Para las variantes *ALDH1L1* y *GART*, dado que el valor esperado para las variantes mutante y silvestre, respectivamente, son menores a 5, se utilizó la prueba exacta de Fisher para estimar el OR:

Variante génica	Toracolumbar n (1.00)	Resto n (1.00)	Valor P prueba exacta Fisher *	OR	IC 95%
ALDH1L1 A237G					
AA	33 (1.00)	170 (0.983)	1.00	0	0-6.824
GG	0	3 (0.017)			
<i>Total</i>	33	173			
Alelo A	66 (1.00)	340 (0.983)	0.595	0	0-3.352
Alelo G	0	6 (0.017)			
GART G1261A					
GG	1 (0.032)	1 (0.005)	0.268	0.164	0.002-13.293
AA	30 (0.968)	183 (0.995)			
<i>Total</i>	31	184			
Alelo G	2 (0.032)	2 (0.005)	0.101	0.164	0.012-2.317
Alelo A	60 (0.968)	366 (0.995)			

* Prueba exacta de Fisher a dos colas.

Tabla 24. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas, de los casos, de solo los genotipos homocigotos, entre los fenotipos de Lumbar y el resto (Torácico-Toracolumbar-Lumbosacro-Sacro).

Variante génica	Lumbar n (1.00)	Resto n (1.00)	X ²	P	OR	IC 95%
ATIC C347G						
CC	32 (0.780)	71 (0.747)	0.17	0.6793	0.832	0.305-2.120
GG	9 (0.220)	24 (0.253)				
<i>Total</i>	41	95				
Alelo C	64 (0.780)	142 (0.747)	0.34	0.5587	0.832	0.421-1.594
Alelo G	18 (0.220)	48 (0.253)				
BHMT G716A						
GG	29 (0.806)	72 (0.720)	1.01	0.3140	0.621	0.206-1.675
AA	7 (0.194)	28 (0.280)				
<i>Total</i>	36	100				
Alelo G	58 (0.806)	144 (0.720)	2.03	0.1545	0.621	0.296-1.240
Alelo A	14 (0.194)	56 (0.280)				
NCAM1 A>G						
AA	15 (0.395)	32 (0.323)	0.62	0.4299	0.732	0.316-1.730
GG	23 (0.605)	67 (0.677)				
<i>Total</i>	38	99				
Alelo A	30 (0.395)	64 (0.323)	1.25	0.2643	0.732	0.410-1.320
Alelo G	46 (0.605)	134 (0.677)				

Para las variantes *ALDH1L1* y *GART*, dado que el valor esperado para las variantes mutante y silvestre, respectivamente, son menores a 5, se utilizó la prueba exacta de Fisher para estimar el OR:

Variante génica	Lumbar n (1.00)	Resto n (1.00)	Valor P prueba exacta Fisher *	OR	IC 95%
ALDH1L1 A237G					
AA	59 (0.983)	144 (0.986)	1.000	1.220	0.020-23.835
GG	1 (0.017)	2 (0.014)			
<i>Total</i>	60	146			
Alelo A	118 (0.983)	288 (0.986)	1.000	1.220	0.109-8.642
Alelo G	2 (0.017)	4 (0.014)			
GART G1261A					
GG	0	2 (0.013)	1.000	NP	NP
AA	62 (1.00)	151 (0.987)			
<i>Total</i>	62	153			
Alelo G	0	4 (0.013)	0.583	NP	NP
Alelo A	124 (1.00)	302 (0.987)			

* Prueba exacta de Fisher a dos colas.

Tabla 25. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas, de los casos, de solo los genotipos homocigotos, entre los niveles Lumbosacro y el resto (Torácico-Toracolumbar-Lumbar -Sacro).

Variante génica	Lumbosacro n (1.00)	Resto n (1.00)	χ^2	P	OR	IC 95%
ATIC C347G						
CC	27 (0.692)	76 (0.784)	1.26	0.2619	1.608	0.630-3.969
GG	12 (0.308)	21 (0.216)				
<i>Total</i>	39	97				
Alelo C	54 (0.692)	152 (0.784)	2.52	0.1126	1.608	0.847-3.009
Alelo G	24 (0.308)	42 (0.216)				
BHMT G716A						
GG	27 (0.675)	74 (0.771)	1.36	0.2441	1.620	0.651-3.914
AA	13 (0.325)	22 (0.229)				
<i>Total</i>	40	96				
Alelo G	54 (0.675)	148 (0.771)	2.71	0.0995	1.620	0.867-2.986
Alelo A	26 (0.325)	44 (0.229)				
NCAM1 A>G						
AA	9 (0.225)	38 (0.392)	3.49	0.0616	2.218	0.899-5.873
GG	31 (0.775)	59 (0.608)				
<i>Total</i>	40	97				
Alelo A	18 (0.225)	76 (0.392)	6.99	0.0082	2.218	1.183-4.292
Alelo G	62 (0.775)	118 (0.608)				

Para las variantes *ALDH1L1* y *GART*, dado que el valor esperado para las variantes mutante y silvestre, respectivamente, son menores a 5, se utilizó la prueba exacta de Fisher para estimar el OR:

Variante génica	Lumbosacro n (1.00)	Resto n (1.00)	Valor P prueba exacta Fisher *	OR	IC 95%
ALDH1L1 A237G					
AA	59 (1.00)	144 (0.980)	0.559	NP	NP
GG	0	3 (0.020)			
<i>Total</i>	59	147			
Alelo A	118 (1.00)	288 (0.980)	0.189	NP	NP
Alelo G	0	6 (0.020)			
GART G1261A					
GG	0	2 (0.013)	1.00	NP	NP
AA	56 (1.00)	157 (0.987)			
<i>Total</i>	56	159			
Alelo G	0	4 (0.013)	0.577	NP	NP
Alelo A	112 (1.00)	314 (0.987)			

* Prueba exacta de Fisher a dos colas.

Tabla 26. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas, de los casos, de solo los genotipos homocigotos, entre los fenotipos de Sacro y el resto (Torácico-Toracolumbar-Lumbar-Lumbosacro).

Variante génica	Sacro n (1.00)	Resto n (1.00)	χ^2	P	OR	IC 95%
ATIC C347G						
CC	11 (0.733)	92 (0.760)	0.05	0.8180	1.154	0.249-4.280
GG	4 (0.267)	29 (0.240)				
<i>Total</i>	<i>15</i>	<i>121</i>				
Alelo C	22 (0.733)	184 (0.760)	0.11	0.7449	1.154	0.421-2.870
Alelo G	8 (0.267)	58 (0.240)				
BHMT G716A						
GG	9 (0.600)	92 (0.760)	1.79	0.1803	2.115	0.565-7.273
AA	6 (0.400)	29 (0.240)				
<i>Total</i>	<i>15</i>	<i>121</i>				
Alelo G	18 (0.600)	184 (0.760)	3.59	0.0581	2.115	0.872-4.950
Alelo A	12 (0.400)	58 (0.240)				
NCAM1 A>G						
AA	3 (0.167)	44 (0.370)	2.86	0.0907	2.933	0.763-16.568
GG	15 (0.833)	75 (0.630)				
<i>Total</i>	<i>18</i>	<i>119</i>				
Alelo A	6 (0.167)	88 (0.370)	5.72	0.0168	2.933	1.138-8.935
Alelo G	30 (0.833)	150 (0.630)				

Para las variantes *ALDH1L1* y *GART*, dado que el valor esperado para las variantes mutante y silvestre, respectivamente, son menores a 5, se utilizó la prueba exacta de Fisher para estimar el OR:

Variante génica	Sacro n (1.00)	Resto n (1.00)	Valor P prueba exacta Fisher *	OR	IC 95%
ALDH1L1 A237G					
AA	20 (0.952)	183 (0.989)	0.277	4.575	0.074-90.422
GG	1 (0.048)	2 (0.011)			
<i>Total</i>	<i>21</i>	<i>185</i>			
Alelo A	40 (0.952)	366 (0.989)	0.117	4.575	0.399-32.864
Alelo G	2 (0.048)	4 (0.011)			
GART G1261A					
GG	0	2 (0.011)	1.00	NP	NP
AA	25 (1.00)	188 (0.989)			
<i>Total</i>	<i>25</i>	<i>190</i>			
Alelo G	0	4 (0.011)	1.00	NP	NP
Alelo A	50 (1.00)	376 (0.989)			

* Prueba exacta de Fisher a dos colas.

ANEXO III

A continuación se muestran los resultados obtenidos mediante el programa MDR para el análisis de interacción génica en distintas modalidades.

Tabla 27. Resultados TBA para casos pareados con controles en modo exhaustivo.

Modelo (*)	TBA	CV Consistency
ALDH1L1	0.4920	6/10
BHMT NCAM1	0.5240	8/10
ATIC BHMT NCAM1	0.4660	5/10
ATIC BHMT GART NCAM1	0.5240	10/10
(*) Mejores modelos indicados en el resultado del programa.		

Tabla 28. Resultados TBA para análisis con tríos en modo exhaustivo.

Modelo	TBA	CV Consistency
ALDH1L1	0.4820	8/10
ATIC NCAM1	0.4670	6/10
ATIC BHMT NCAM1	0.4890	9/10
ALDH1L1 ATIC BHMT NCAM1	0.4810	10/10
(*) Mejores modelos indicados en el resultado del programa.		

Tabla 29. Resultados TBA tanto para casos pareados con controles como para el análisis con tríos, en modo forzado para cada una de las posibles combinaciones génicas.

Modelo	TBA	TBA Análisis con tríos
ALDH1L1	0.5260	0.5160
ATIC	0.4980	0.4870
BHMT	0.4980	0.4540
GART	0.5100	0.4790
NCAM1	0.5220	0.4330
ALDH1L1 - ATIC	0.5200	0.5110
ALDH1L1 - BHMT	0.4860	0.4860
ALDH1L1 - GART	0.5000	0.4940
ALDH1L1 - NCAM1	0.4980	0.4900
ATIC - BHMT	0.5240	0.4740
ATIC - GART	0.5280	0.5010
ATIC - NCAM1	0.4940	0.5030
BHMT - GART	0.4920	0.4290
BHMT - NCAM1	0.5440	0.4430
GART - NCAM1	0.5240	0.4320

.....continuación tabla 29.

Modelo	TBA	TBA Análisis con tríos
ALDH1L1 – ATIC - BHMT	0.5100	0.4880
ALDH1L1 – ATIC - GART	0.4880	0.4740
ALDH1L1 – ATIC – NCAM1	0.4960	0.4910
ALDH1L1 – BHMT - GART	0.5120	0.4760
ALDH1L1 – BHMT – NCAM1	0.5260	0.4380
ALDH1L1 – GART – NCAM1	0.5040	0.4920
ATIC – BHMT – GART	0.5080	0.4670
ATIC – BHMT – NCAM1	0.4880	0.4940
ATIC – GART – NCAM1	0.4980	0.4730
BHMT – GART – NCAM1	0.5120	0.4330
ALDH1L1 – ATIC – BHMT - GART	0.5240	0.4790
ALDH1L1 – ATIC – BHMT – NCAM1	0.4600	0.4810
ALDH1L1 – ATIC – GART – NCAM1	0.5280	0.4930
ALDH1L1 – BHMT – GART – NCAM1	0.5100	0.4630
ATIC – BHMT – GART – NCAM1	0.5240	0.4680
ALDH1L1 – ATIC – BHMT – GART – NCAM1	0.5100	0.4750

