



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**ANÁLISIS DE VARIANTES GENÉTICAS DE LAS ENZIMAS METABOLIZADORAS
DE FOLATOS COMO FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL
MIELOMENINGOCELE**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MIGUEL RAMÍREZ ARAGÓN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. OSVALDO MAXIMO MUTCHINICK BARINGOLTZ

FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. NIMBE TORRES Y TORRES

FACULTAD DE MEDICINA

DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE 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.

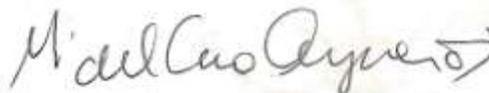
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 14 de octubre de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **RAMÍREZ ARAGÓN MIGUEL** con número de cuenta **512015147**, con la tesis titulada "**ANÁLISIS DE VARIANTES GENÉTICAS DE LAS ENZIMAS METABOLIZADORAS DE FOLATOS COMO FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL MIELOMENINGOCELE**", realizada bajo la dirección del **DR. OSVALDO MÁXIMO MUTCHINICK BARINGOLTZ**:

Presidente: DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUIZ
Vocal: MED. ESP. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI
Secretario: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Suplente: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO
Suplente: DRA. NIMBE TORRES Y TORRES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de noviembre de 2013



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM

Al apoyo recibido por parte de CONACYT beca No. 262580

Al Comité tutorial conformado por el Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz, la Dra. Nimbe Torres y Torres y la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, además de brindarme sus observaciones, correcciones y apoyo con el fin de mejorar cada vez más el proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Al personal del departamento de Genética del INCMNSZ por permitirme trabajar en sus instalaciones y mostrarme su apoyo en cada momento.

A mi cotutora Beatriz Sánchez Hernández por apoyarme y brindarme su amistad durante mi estancia en el instituto.

A mis amigos Luis Ángel Muñoz Téllez y Yevgeniya Svyryd por brindarme su ayuda y ánimo incluso en los momentos más difíciles del proceso.

A mi amiga Tania Ángeles por hacer más amena la estancia en el laboratorio.

A Ana Isabel Gómez Montalvo por aguantarme, tolerarme, ayudarme, apoyarme y enseñarme lo perfecta que puede ser la vida.

A mi familia, que a pesar de la distancia siempre me mostro su apoyo y confianza.

DEDICATORIA

A mi padre Miguel Ramírez Rodríguez por enseñarme el valor y la importancia del trabajo, por siempre tener las palabras adecuadas que me llevan a seguir adelante en los momentos más difíciles, por brindarme su total confianza y apoyo. Eres y siempre serás mi modelo a seguir. Te amo.

A mi madre Mercedes Josefina Aragón Morales, por estar diariamente pendiente de cada una de las actividades que realizaba y animarme día con día a continuar esforzándome y preparándome. Sin tu apoyo y tus palabras de aliento diarias jamás lo habría logrado. Te amo.

A mi hermana Georgina Ramírez Aragón por transmitirme su energía y su alegría cada momento. Me has enseñado a nunca rendirme y siempre sonreír. Te admiro y te amo mucho.

A mi sobrino Emiliano Hernández Ramírez por ser una de las más grandes alegrías de mi vida.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formación del tubo neural	1
1.2 Defectos del Tubo Neural	5
1.2.1 Factores causales	7
2. JUSTIFICACIÓN	11
3. HIPÓTESIS	11
4. OBJETIVOS	12
4.1 Objetivo General	12
4.2 Objetivos específicos	12
5. ANTECEDENTES	13
5.1 Metabolismo de los folatos	13
5.1.1 Ciclo de metilación	17
5.1.2 Síntesis de nucleótidos	18
5.2 Variantes genéticas en el metabolismo de los folatos	19
5.2.1 <i>MTHFR</i>	19
5.2.2 <i>MTR</i>	25
5.2.3 <i>MTRR</i>	28
5.2.4 <i>MTHFD1</i>	31
5.2.5 <i>TCN2</i>	33
5.2.6 <i>TYMS</i>	36
5.2.7 <i>DHFR</i>	40
6. METODOLOGÍA	43
6.1 Población en estudio	43
6.1.1 Criterios de selección	43
6.2 Controles	44

6.2.1 Criterios de selección _____	44
6.3 Descripción del procedimiento _____	45
6.4 Variantes a analizar _____	46
6.5 Métodos de laboratorio _____	46
6.5.1 Extracción de ADN en sangre periférica por método de sales _____	46
6.5.2 Cuantificación de ADN _____	47
6.5.3 Genotipificación de las variantes alélicas por medio de PCR en tiempo real _____	48
6.5.4 PCR y Electroforesis _____	50
6.5.5 Identificación de la variante 3G>C TYMS _____	53
6.6 Análisis estadístico _____	55
6.6.1 Comparación de frecuencias genotípicas _____	55
6.6.2 Prueba de desequilibrio de transmisión (TDT) _____	56
6.6.3 Correlación fenotipo-genotipo _____	56
6.6.4 Interacción génica _____	57
7. RESULTADOS _____	58
7.1 Análisis de frecuencias genotípicas _____	58
7.2 Correlación fenotipo-genotipo _____	63
7.3 Interacción génica _____	72
7.4 Análisis de desequilibrio de transmisión _____	74
8. DISCUSIÓN _____	76
9. CONCLUSIONES _____	92
10. BIBLIOGRAFÍA _____	94
ANEXO I _____	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustración del modelo de plegamiento a través de puntos bisagra..	3
Figura 2. Esquemas e imágenes de microscopia electrónica que muestran los cuatro eventos principales de la formación del pliegue neural y la morfogénesis a nivel del futuro cerebro.	4
Figura 3. Representación de las diferentes formas de espina bífida que pueden presentarse en relación a la gravedad de la lesión.	6
Figura 4. Composición de la molécula de ácido fólico..	14
Figura 5. Metabolismo simplificado de los folatos.....	16
Figura 6. Compartimentalización del metabolismo de los folatos en la mitocondria.....	16
Figura 7. Compartimentalización del metabolismo de los folatos en citoplasma y núcleo.	17
Figura 8. Localización y composición del gen <i>MTHFR</i> .	20
Figura 9. Localización cromosómica y composición del gen <i>MTR</i>	26
Figura 10. Localización del y composición del gen <i>MTRR</i> .	29
Figura 11. Localización y composición del gen <i>MTHFD1</i>	33
Figura 12. Localización y composición del gen <i>TCNII</i>	35
Figura 13. Localización y composición del gen <i>TYMS</i>	38
Figura 14. Localización y estructura del gen <i>DHFR</i> .	42
Figura 15. Interpretación de los resultados esperados para la genotipificación de la variante <i>DHFR</i> del 19pb	53
Figura 16. Interpretación de genotipos para la variante <i>TYMS</i> rep28pb.....	54
Figura 17. Interpretación de genotipos para la variante <i>TYMS</i> 3G>C.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Modelo y secuencia de sondas utilizadas para la genotipificación de las variantes <i>MTHFR C667T, A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G, MTHFD1 G1958A, TCNII C776G</i>	48
Tabla 2. Reactivos y concentraciones utilizadas para la preparación de la mezcla de reacción, según el protocolo de PCR en tiempo real.	49
Tabla 3. Descripción del programa de amplificación utilizado para el protocolo de genotipificación por PCR en tiempo real.	50
Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados como cebadores para las variantes TYMS Rep28pb y DHFR Del19pb.	50
Tabla 5. Reactivos, concentraciones y cantidades utilizadas para la preparación de la mezcla de reacción, según el protocolo de PCR de punto final.	51
Tabla 6. Descripción de los programas de amplificación usados en el protocolo de genotipificación por PCR de punto final, para las variantes de <i>TYMS rep28pb</i> y <i>DHFR del19pb</i>	52
Tabla 7. Reactivos, concentraciones y cantidades utilizadas para la preparación de la mezcla de digestión, en el protocolo de identificación de la variante G>C del gen TYMS.	54
Tabla 8. Frecuencias alélicas y genotípicas, para cada una de las variantes analizadas, de los individuos que conforman los tríos familiares en estudio.	58
Tabla 9. Frecuencias genotípicas, valor del equilibrio de Hardy-Weinberg y resultado de la comparación de frecuencias entre casos y controles.	61
Tabla 10. Frecuencia del alelo compuesto <i>MTHFR C667T - A1298C</i> en los tríos familiares, así como en el grupo control.	62
Tabla 11. Frecuencia del alelo compuesto <i>MTR A2756C -MTRR A66G</i> en los tríos familiares, así como en el grupo control.	63
Tabla 12. Resultados de la comparación de frecuencias por χ^2 entre el grupo de casos y controles para los genotipos compuestos por las variantes <i>MTHFR C667T-A1298C</i> y <i>MTR A2756G-MTRR A66G</i>	63

Tabla 13. Frecuencias alélicas y genotípicas de los diferentes fenotipos que presentan los afectados por MMC.....	65
Tabla 14. Comparación de frecuencias genotípicas entre los diferentes fenotipos de MMC y el grupo control, para cada una de las variantes.	67
Tabla 15. Comparación de las frecuencias genotípicas entre los diferentes grupos de fenotipos.	69
Tabla 16. Comparación de frecuencias genotípicas entre fenotipos de riesgo y el grupo control.....	70
Tabla 17. Comparación de frecuencias genotípicas y de los alelos de los genotipos homocigotos entre los fenotipos de riesgo y el grupo control.	71
Tabla 18. Resultados del análisis MDR exhaustivo en casos y controles.	72
Tabla 19. Combinaciones de genotipos que mostraron interacciones cercanas a la significancia del análisis MDR forzado.	73
Tabla 20. Resultados del análisis de desequilibrio de transmisión para cada una de las variantes en estudio.	74
Tabla 21. Resultados del análisis de desequilibrio de transmisión de las variantes del metabolismo de los folatos para los fenotipos en estudio.	75

RESUMEN

Las malformaciones congénitas son una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad infantil en países desarrollados. De las malformaciones congénitas, los defectos del tubo neural (DTN) son los que se presentan de forma más habitual. Estas patologías son el resultado de un cierre incompleto del tubo neural, siendo anencefalia y espina bífida las más frecuentes. En nuestra población los DTN tienen una frecuencia alta, aproximadamente 1 de cada 400 nacimientos, nacidos vivos y nacidos muertos, presentan una de estas anomalías congénitas. La frecuencia de espina bífida es de 13.11 por cada 10,000 nacimientos, nacidos vivos y nacidos muertos, mientras que un tipo de espina bífida, el Mielomeningocele (MMC) se presenta en 1 de cada 1000 nacimientos, nacidos vivos y nacidos muertos.

La identificación de factores causales es complicada por el hecho de que la gran mayoría de estas malformaciones congénitas son el resultado de una combinación de una predisposición genética debida a un sistema poligénico en interacción con factores nutricionales y ambientales diversos, pudiendo esta interacción tener un efecto aditivo y/o multiplicativo, predisponiendo a la ocurrencia de los DTN.

La presencia de mutaciones, en los genes de las enzimas que participan en el metabolismo de los folatos, se considera un importante factor de riesgo para la ocurrencia de los DTN, ya que de este ciclo se derivan productos importantes para el mantenimiento de la integridad del genoma, así como precursores de la síntesis de DNA, los cuales son necesarios en las etapas embrionarias, para la proliferación y diferenciación celular temprana, lo cual deriva en la posterior formación y cierre del tubo neural.

Se ha reportado que la población mexicana presenta una alta frecuencia de variantes en los genes que están involucrados en el metabolismo de los folatos. Aunado a la alta frecuencia de nacimientos con MMC, se cree que existe una asociación entre la presencia de variantes en los genes de las enzimas metabolizadoras de folatos y el MMC.

Tras la realización de este estudio se encontró que la presencia de las variantes *MTHFR C667T*, *A1298C*, *MTR A2756G*, *MTRR A66G*, *MTHFD1 G1958A*, *TCN2 C776G*, *DHFR dal19pb* y *TYMS Rep28pb G>C*, en el producto, no representa un factor de riesgo individual para MMC.

Por otra parte se encontró evidencia estadística que sugiere que la interacción de las variantes *MTHFR C667T*, *MTHFR A1298C*, *MTRR A66G*, *MTR A2756G*, *MTHFD1 G1958A* y *TCNII C776G* podría estar relacionada con el MMC, esto se asume tomando como base la importante función que desempeñan las enzimas, que son codificadas por estos genes, en el metabolismo de los folatos, por lo que se cree que es posible que la presencia de estas variantes en conjunto, ocasioné deficiencias en procesos fundamentales, tales como la síntesis y metilación del ADN, así como los procesos de diferenciación y proliferación celular, en etapas tempranas del desarrollo, lo que podría dar origen a malformaciones congénitas, como es el MMC.

ABSTRACT

Congenital malformations are one of the most common causes of childhood morbidity and mortality in developed countries. Neural Tube Defects (NTDs) are more common congenital malformations. These conditions are the result of incomplete closure of the neural tube. Being anencephaly and spina bifida the most frequent. In Mexican population NTDs have a high frequency. It's about 1 in 400 births, live births and stillbirths. The frequency of spina bifida is 13.11 per 10,000 births, live births and stillbirths, while myelomeningocele (MMC) occurs in 1 in 1000 births, live births and stillbirths.

Identification of causative factors is complicated by the fact that the great majority of these birth defects are the result of a combination of a genetic predisposition due to a polygenic system in interaction with nutritional and environmental factors. This interaction may have an additive and/or multiplicative effect, predisposing to the occurrence of NTDs.

The presence of mutations in genes of the enzymes involved in folate metabolism, is considered a major risk factor for the occurrence of neural tube defects. It is because principal products of this cycle, like precursors of DNA synthesis, are responsible of maintain the integrity of the genome, as well as necessary for the early embryonic stages, cell proliferation and differentiation, which leads to the subsequent formation and closure of neural tube.

It has been reported that the Mexican population has a high frequency of variants in genes involved in folate metabolism, in addition to the high frequency of births with MMC. It is believed that an association between the presence of variants in genes of folate -metabolizing enzymes and MMC exist.

Results of this study indicate that the presence of the polymorphisms *MTHFR C667T*, *A1298C*, *MTR A2756G*, *MTRR A66G*, *MTHFD1 G1958A*, *TCN2 C776G*, *DHFR dal19pb* and *TYMS Rep28pb G>C*, in product does not represent a individually risk factor for MMC.

Moreover statistical evidence suggests that the interaction of polymorphisms *MTHFR C667T*, *MTHFR A1298C*, *MTRR A66G*, *MTR A2756G*, *MTHFD1 G1958A* and *TCNII C776G* could be related with MMC. This is assumed based on the important role of enzymes in folate metabolism. So it is believed that it is possible that the presence of such polymorphisms together cause impairments in key processes, such as the DNA synthesis, DNA methylation, cell differentiation and cell proliferation in early stages of development, which could lead to birth defects, such as MMC.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Formación del tubo neural

La formación del tubo neural ocurre a través de un proceso denominado neurulación, el cual comienza en una etapa temprana de la embriogénesis, aproximadamente en el día 17 después de la fertilización, este proceso se resume en el plegamiento y fusión de capas embrionarias externas, resultando en la formación del tubo neural.

La neurulación comienza terminado el proceso de gastrulación, a nivel tejido este proceso se desarrolla en 4 fases: formación de la placa neural, conformación de la placa neural, flexión de la placa neural y cierre de la abertura neural.

La formación de la placa neural es la primera fase de la neurulación, esta comienza con la inducción neural, la cual se debe a una inhibición de la formación de epidermis a través de señales que emanan del nodo primitivo (Sadler, 2005). Además del proceso de inducción neural, la formación de la placa neural involucra un engrosamiento apico-basal del ectodermo, lo cual resulta en la formación de una estructura plana, pero engrosada, que recibe el nombre de placoda (Schoenwolf, 1988).

Durante la conformación de la placa neural, esta continua engrosándose en la zona apico-basal, de manera adicional se estrecha en la zona medio lateral mientras simultáneamente se alarga rostro-caudalmente.

La flexión de la placa neural consiste en la formación, elevación y convergencia en la línea media dorsal de los pliegues neurales. La elevación de los pliegues neurales establece un conducto denominado abertura neural, la cual se convertirá en el lumen del tubo neural primitivo después de su cierre. El proceso de flexión ocurre a través de dos etapas: surcado y plegado. La etapa de surcado ocurre a través de tres regiones denominadas puntos bisagra, un punto medio que se encuentra encima de la placa precordial y la notocorda, que se extiende a través de la región rostrocaudal del neuroeje; y dos puntos dorsolaterales localizados en los pliegues neurales, principalmente a nivel del futuro cerebro (Schoenwolf y Franks, 1984) (Figura 1). El plegamiento involucra la rotación de la placa neural alrededor de los puntos bisagra, denominándose elevación al plegamiento alrededor del punto medio y convergencia al que involucra los puntos dorso-laterales. Los pliegues neurales tienen un papel importante durante la flexión de la placa neural. Cada pliegue neural es bilaminar, están compuestos por una capa de neuroepitelio cubierta por una capa de ectodermo epidérmico. Al nivel del futuro cerebro, donde los pliegues neurales se desarrollan de manera más extensa, la formación y morfogénesis de los pliegues neurales involucra cuatro eventos claves: crestas epiteliales, dobleces, delaminación y aposición (Figura 2). La estructura de los pliegues neurales parece ser la adecuada para transducir las fuerzas generadas por la expansión del ectodermo epidérmico lateral, ayudando en el proceso de flexión de la placa neural.

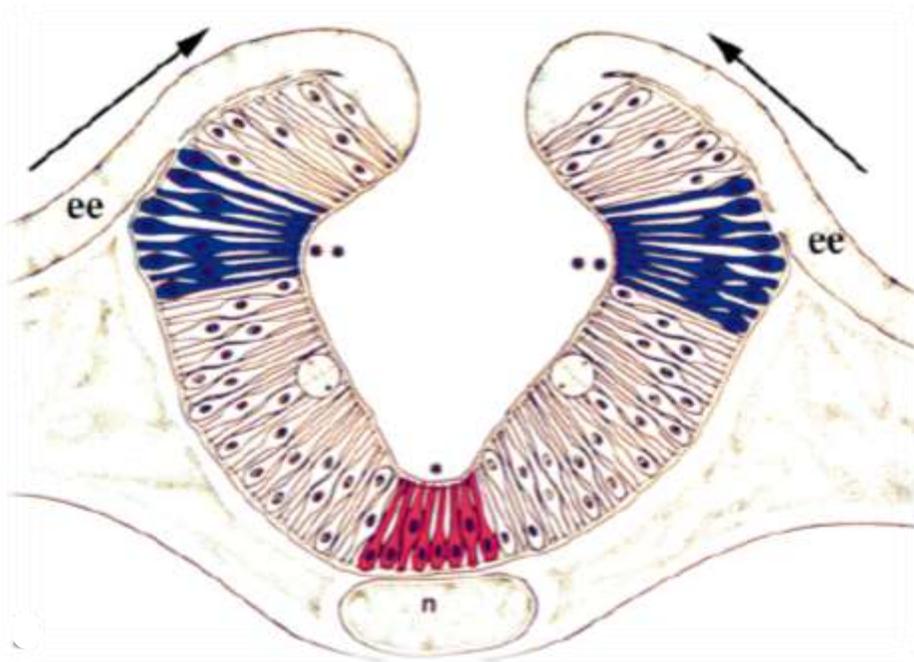


Figura 1. Ilustración del modelo de plegamiento a través de puntos bisagra. Los puntos bisagra están señalados de color rojo (punto medio) y azul (puntos dorsolaterales). Las flechas indican la expansión del ectodermo epidérmico; el asterisco indica el surcado asociado con el punto medio. El doble asterisco indica el surcado que involucra los puntos dorsolaterales. ee: ectodermo epidérmico; n; notocorda. (Modificado de Colas y Schoenwolf 2001).

La flexión de la paca neural lleva en última instancia a los pliegues neurales a la línea media dorsal, donde estarán en contacto, se adherirán y fusionarán, lo que establecerá el techo del tubo neural, ocasionando la separación del tubo del ectodermo epidérmico suprayacente, lo cual contribuirá a la formación de piel de la espalda del embrión (Colas y Schoenwolf 2001).

Después de iniciado el cierre del tubo neural, regiones específicas permanecen abiertas, las cuales reciben el nombre de neuroporos anterior (craneal) y posterior (caudal). En la región caudal el proceso de cierre es continuo hasta que se dé el cierre completo del neuroporo posterior. Por otra parte, en la región craneal, el cierre ocurre a través de dos sitios, uno de ellos localizado en el proencéfalo. El

cierre a partir de este sitio avanza de manera bidireccional hasta encontrarse con el sitio de cierre de la región rostral, completando así el cierre del neuroporo anterior. Ya iniciado el cierre en cada uno de los sitios, las células del neuroectodermo sufren una reorganización para formar la cubierta del tubo neural, mientras se sobreponen las células epidérmicas del ectodermo (Sadler 2005).

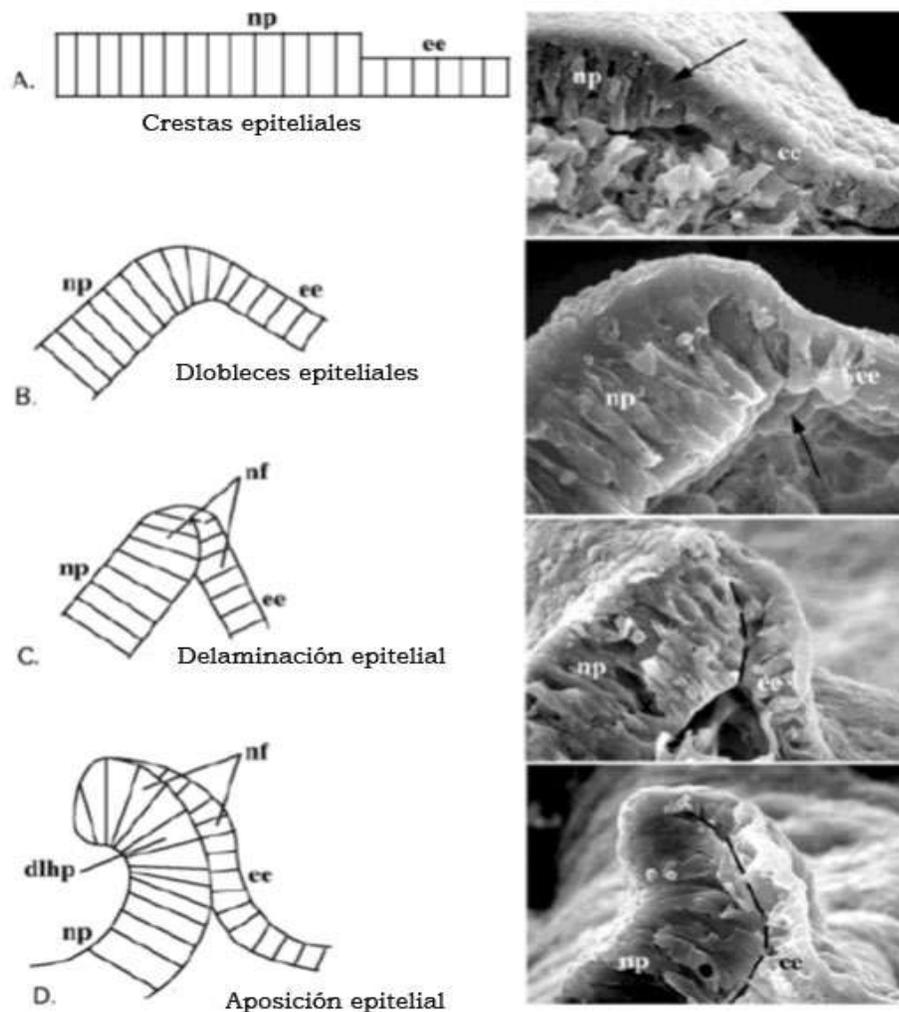


Figura 2. Esquemas e imágenes de microscopía electrónica que muestran los cuatro eventos principales de la formación del pliegue neural y la morfogénesis a nivel del futuro cerebro. Crestas epiteliales (A), dobleces epiteliales (B), delaminación epitelial (C), aposición epitelial (D). dlhp, punto bizagra dorsolateral; ee, ectodermo epidérmico; nf, pliegue neural; np, placaneural. Las flechas en la micrografía indican la cresta neural (A) y el punto de doblado (B). Las líneas punteadas en la micrografía (C,D) indican la interfase del pliegue neural. (Modificado de Colas y Schoenwolf, 2001)

La neurulación secundaria ocurre terminado el proceso primario y es el encargado de cerrar el resto de las regiones sacras. Este proceso se lleva a cabo por medio de células del mesodermo, las cuales sufren un fenómeno de reorganización formando la región caudal más baja del tubo neural, para posteriormente formar una estructura continua uniéndose con el producto de la neurulación primaria.

1.2 Defectos del Tubo Neural

Defecto de tubo neural (DTN) es un término usado para nombrar malformaciones congénitas del sistema nervioso central, debido a deficiencias en el cierre del tubo neural durante el proceso de neurulación.

Si el defecto de fusión de cierre ocurre en la región craneal, se obtiene como resultado malformaciones como anencefalia o encefalocele (Botto et al. 1999). Cuando el defecto involucra la médula espinal se le denomina espina bífida, y se clasifica según la extensión de la malformación medular en espina bífida oculta y espina bífida manifiesta (quística) (Botto et al. 1999). Las formas ocultas consisten en un simple defecto de cierre de los arcos vertebrales, el cual solo es apreciable por radiología (Botto et al. 1999). Las formas manifiestas se caracterizan por presentar una protuberancia en la región del defecto de cierre, si esta protuberancia está formada solo por los elementos meningeales que recubren la médula espinal, la malformación es denominada meningocele, por otra parte si la protuberancia incluye tanto los elementos meningeales como los elementos neurales se le denomina mielomeningocele (MMC) (Botto et al. 1999) (Figura 3).

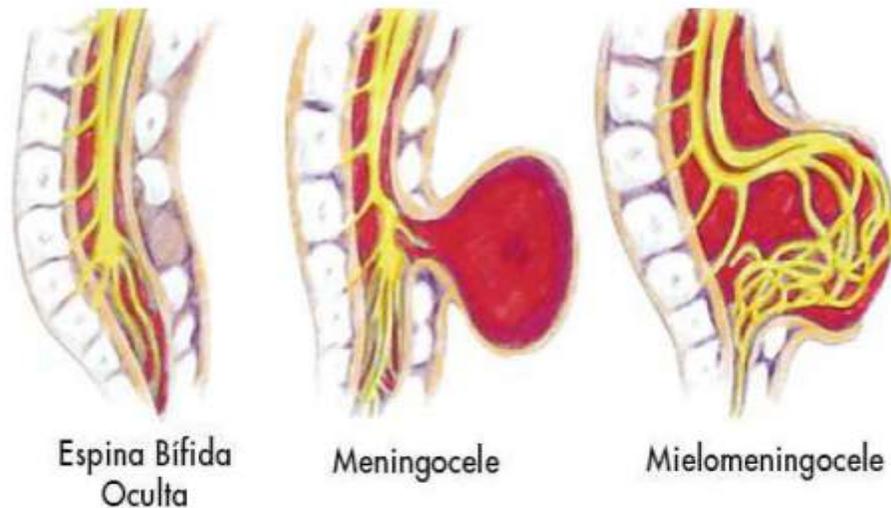


Figura 3. Representación de las diferentes formas de espina bífida que pueden presentarse en relación a la gravedad de la lesión (Modificada de Botto et al. 1999).

La prevalencia de DTN a nivel mundial se estima entre 1 a 10 por cada 1000 nacimientos, con una frecuencia similar para las dos categorías principales: anencefalia y espina bífida (Au et al. 2010), esta cifra varía considerablemente entre países. En Estados Unidos la prevalencia de DTN es de 0.8 por cada 1000 nacimientos (Honein 2001), mientras que en la región centro-norte de China se reporta una prevalencia de 13.8 por cada 1000 nacimientos (Li 2006), en el caso de México se ha reportado una prevalencia de 2.5 por cada 1000 nacimientos, correspondiendo el 40% y 50% de los casos a anencefalia y espina bífida respectivamente. La espina bífida se presenta en la población mexicana en 1.31 de cada 1000 nacimientos (nacidos vivos y nacidos muertos), mientras que el MMC lo hace en 1 de cada 1000 nacimientos (RYVEMCE).

1.2.1 Factores causales

La identificación de factores causales es complicada por el hecho de que la gran mayoría de estas malformaciones congénitas son el resultado de una combinación de una predisposición genética debida a un sistema poligénico en interacción con factores nutricionales y ambientales diversos, pudiendo esta interacción tener un efecto aditivo y/o multiplicativo, predisponiendo a la ocurrencia de los DTN.

1.2.1.1 Factores genéticos

Entre los posibles factores causales, se ha señalado que existe una contribución genética, debido a que la incidencia de DTN varía entre poblaciones y grupos étnicos, observándose, que dentro de los Estados Unidos, la población afroamericana tienen menores rangos de DTN en comparación a la población blanca, mientras que la población Hispánica presenta un mayor riesgo para DTN que el resto de los grupos étnicos de los Estados Unidos (Northrup, 2000).

Otro factor que indica la existencia de una contribución genética dentro de la etiología de los DTN es la agregación familiar que muestra este tipo de malformaciones, aunque no siguen un patrón de herencia mendeliana. Diversos estudios han reportado que el riesgo de ocurrencia de DTN se incrementa, si existen antecedentes familiares previos para este tipo de malformaciones, siendo el riesgo general para DTN de 0.1-0.2%, pero con un hijo afectado, este aumenta a 2-5%, mientras que el riesgo para un tercer hijo con esta afección se incrementa 10-15% (Milunsky, 1980, Thunem, 1988,). Cabe mencionar que este aumento de riesgo también afecta a los familiares de primer y segundo grado de los afectados (Northrup, 2000).

Se ha señalado también que la presencia de arreglos cromosómicos específicos, como trisomía de los cromosomas 13 y 18, así como síndromes genéticos, tales como síndrome acrocalosal, síndrome del cerebro costomandibular, síndrome de CHILD, síndrome de Fraser, síndrome de Jarcho-Levin, síndrome de Meckel-Gruber y síndrome de Waardenburg están asociados con los DTN (Jones et al. 1997, Northrup et al. 2000).

1.2.1.2 Factores ambientales

Además del factor genético, es importante considerar las influencias ambientales como elementos de importancia para el estudio de los DTN. El término de factor ambiental es utilizado para describir todos aquellos factores no genéticos de la etiología de los DTN, como edad de los padres, clase social, educación, ocupación, condición metabólica y estatus nutricional materno (Sever et al. 1995). Estudios epidemiológicos y experimentales han señalado el riesgo que pueden conferir los diferentes factores ambientales, llegando a resultados que resultan controversiales.

Mediante el estudio de la edad de los progenitores, como factor de riesgo, se han obtenidos datos que no muestran una asociación clara, mientras algunos datos vinculan un aumento en el riesgo de DTN a una avanzada edad materna y paterna (Strassburg et al. 1983McIntosh et al. 1995), otros no han encontrado dicha asociación (Brender et al. 1989a b, Canfield et al. 1996).

Otro de los elementos que ha sido asociado como factor de riesgo para DTN es un bajo nivel socioeconómico, ligado a un bajo nivel de estudios (Northrup et al.

2000), se ha reportado una asociación entre el incremento de riesgo para DTN a medida que el nivel de estudios de la madre disminuye (Canfield et al 1996, Grewal et al. 2008).

En lo que respecta a la ocupación de los padres, se ha reportado que las profesiones que involucran exposición a solventes, pesticidas y radiaciones ionizantes representan un incremento de riesgo a DTN, así como también empleos maternos relacionados con la enfermería, industria, transporte, construcción y comunicación pueden representar un riesgo para DTN (Blatter et al. 1994, Northrup et al. 2000, Sever, 1995).

Referente a la condición metabólica de la madre, se ha sugerido que las mujeres obesas y/o con diabetes presentan un mayor riesgo de que su embarazo se vea afectado por DTN (Northrup et al. 2000). Mediante estudios se ha observado que las mujeres que presentan obesidad antes del embarazo incrementan el riesgo para DTN, en especial espina bífida, en comparación con mujeres en su peso normal. (Waller et al. 1994, Shaw et al. 1996). Por su parte se ha reportado que la diabetes en madres incrementa el riesgo para DTN en un 2% para la población estadounidense (Milunsky et al. 1982) y un 8% para la población inglesa (Soler et al. 1976).

1.2.1.3 Factores nutricionales

En relación a factores nutricionales, se ha reportado la importancia que tiene la nutrición materna, así como el genotipo del embrión, los cuales desempeñan un papel decisivo en el correcto desarrollo y crecimiento embrionario.

Uno de los nutrientes estudiados como factor de riesgo para DTN es el Zinc, debido a que este elemento es esencial en el crecimiento y desarrollo embrionario, ya que facilita la transcripción de genes, además de ser necesario en los procesos de división, proliferación y diferenciación celular (Vallee et al. 1993, Tamura et al. 1996). Se ha observado que tanto el consumo periconcepcional de Zinc, como de alimentos de origen animal, está asociado a una reducción en el riesgo de DTN (Vallee et al. 1993).

Por otra parte, existe evidencia sobre una asociación entre DTNs y la deficiencia de folatos en la dieta. Esta relación fue reportada por primera vez en 1981, mediante un estudio que sugirió una fuerte asociación entre la fortificación periconcepcional con ácido fólico y la disminución del riesgo para DTN (Smithells et al. 1981). Este hallazgo derivó en un gran número de estudios relacionados con el tema, mediante los cuales se confirmó que una adecuada ingesta de folatos, antes y durante el embarazo, por parte de la madre, reduce significativamente el riesgo para DTN (Bower et al. 1989, Czeizel et al. 1992, De-Regil et al. 2010).

Sumado a esto, se han realizado estudios que permiten ampliar el panorama con respecto a la asociación que existe entre los folatos y DTN. Un ejemplo de esto, es que a través de investigaciones inmunológicas se ha obtenido evidencia de la presencia de anticuerpos para el receptor de folato en el 75% de las madres con

hijos afectados con DTN (Rothenberg et al.2004), este hallazgo está relacionado con un incremento en el riesgo para DTN de 25 veces. Se ha observado también que el uso periconcepcional de medicamentos antagonistas a folatos como es el caso de la carbamazepina o el trimetoprim pueden incrementar el riesgo para DTN (Hernandez-Diaz et al.2000).

Por otra parte, los resultados obtenidos en el análisis del suero postparto, indican que las madres de individuos afectados con DTN presentan niveles plasmáticos de folatos y glóbulos rojos bajos (Yates et al. 1987, Kirke et al. 1993, Van der Put et al. 1997), lo cual respalda la teoría de que una alteración en el metabolismo de los folatos contribuye a la formación anormal del tubo neural.

2. JUSTIFICACIÓN

Se ha descrito un incremento en el riesgo de MMC, relacionado con la presencia de una serie de polimorfismos en la vía metabólica de los folatos. Diversos reportes señalan que la población mexicana presenta una prevalencia alta de nacimientos con MMC, así como una frecuencia alta de estas variantes genéticas. Por lo tanto es importante la realización de este estudio con el fin de determinar una posible asociación entre estos dos hallazgos.

3. HIPÓTESIS

Ciertas variantes en genes del metabolismo de los folatos en forma aislada o por efecto de la interacción génica, constituyen factores de riesgo para MMC.

El presente estudio se deriva del proyecto “Estudio multicéntrico de factores de riesgo genético, nutricional y ambiental, asociados al mielomeningocele” que se

realiza en el departamento de Genética de Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran. Teniendo los siguientes objetivos:

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Realizar un estudio multicéntrico en 250 tríos familiares de pacientes con MMC y sus progenitores, con el propósito de identificar, variantes en genes del metabolismo de los folatos, como factores de riesgo genéticos que permitan entender mejor las causas que predisponen a la ocurrencia del MMC.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar en 250 tríos familiares, las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes *MTHFR C667T*, *A1298C*, *MTR A2756G*, *MTRR A66G*, *MTHFD1 G1958A*, *TCN2 C776G*, *DHFR dal19pb*, *TYMS Rep28pb G>C*.
2. Determinar si la frecuencia de alguno de estos genes representan factores de riesgo individual para el MMC.
3. Determinar por medio del análisis de la prueba de desequilibrio de transmisión conocida como TDT (Transmission Disequilibrium Test), si existe transmisión preferencial de alguna de las formas alélicas.
4. Determinar la posible interacción entre los genes mencionados como factor de riesgo para MMC.
5. Determinar la posible existencia de una correlación entre la altura de la lesión de la columna vertebral y el genotipo de los individuos.

5. ANTECEDENTES

5.1 Metabolismo de los folatos

El folato es una vitamina soluble que se encuentra en una gran variedad de alimentos, principalmente en los vegetales, mientras que el ácido fólico es el término utilizado para nombrar la forma sintética de esta vitamina (Figura 4A). El ácido fólico es el más estable entre ambas vitaminas, debido a esto es más adecuado para el uso de tabletas y fortificación en alimentos.

Para que el ácido fólico pueda participar en el metabolismo de los folatos, es necesario que sea convertido a su forma natural bioactiva, el tetrahidrofolato (THF), esto ocurre a través de dos reacciones catalizadas por la enzima Dihidrofolato reductasa (DHFR).

El THF, en su forma activada, desarrolla una función de acarreador de moléculas de un solo carbono para propósitos biosintéticos. Puede acarrear formato activado en forma de 5-Formil-THF, 10-Formil-THF o 5,10-Metenil-THF. Por otra parte el transporte de formaldehído se realiza en forma de 5,10-Metilen-THF, mientras que el metanol activado será acarreado por 5-Metil-THF (Figura 4B), este último compuesto es la forma principal de folato circulante en el torrente sanguíneo, de donde es transportado al interior de la célula (Stover 2004 van der Put et al. 2001). Una vez dentro de la célula el 5-Metil-THF es modificado por la unión de residuos de glutamato a través de un enlace peptídico γ , este proceso es conocido como poliglutamación (Blom et al. 2006). Este proceso es necesario para la formación de coenzimas funcionales, aumentando la afinidad de estos compuestos por las

enzimas metabolizadoras de folatos, así como también permitiendo su acumulación dentro de la célula.

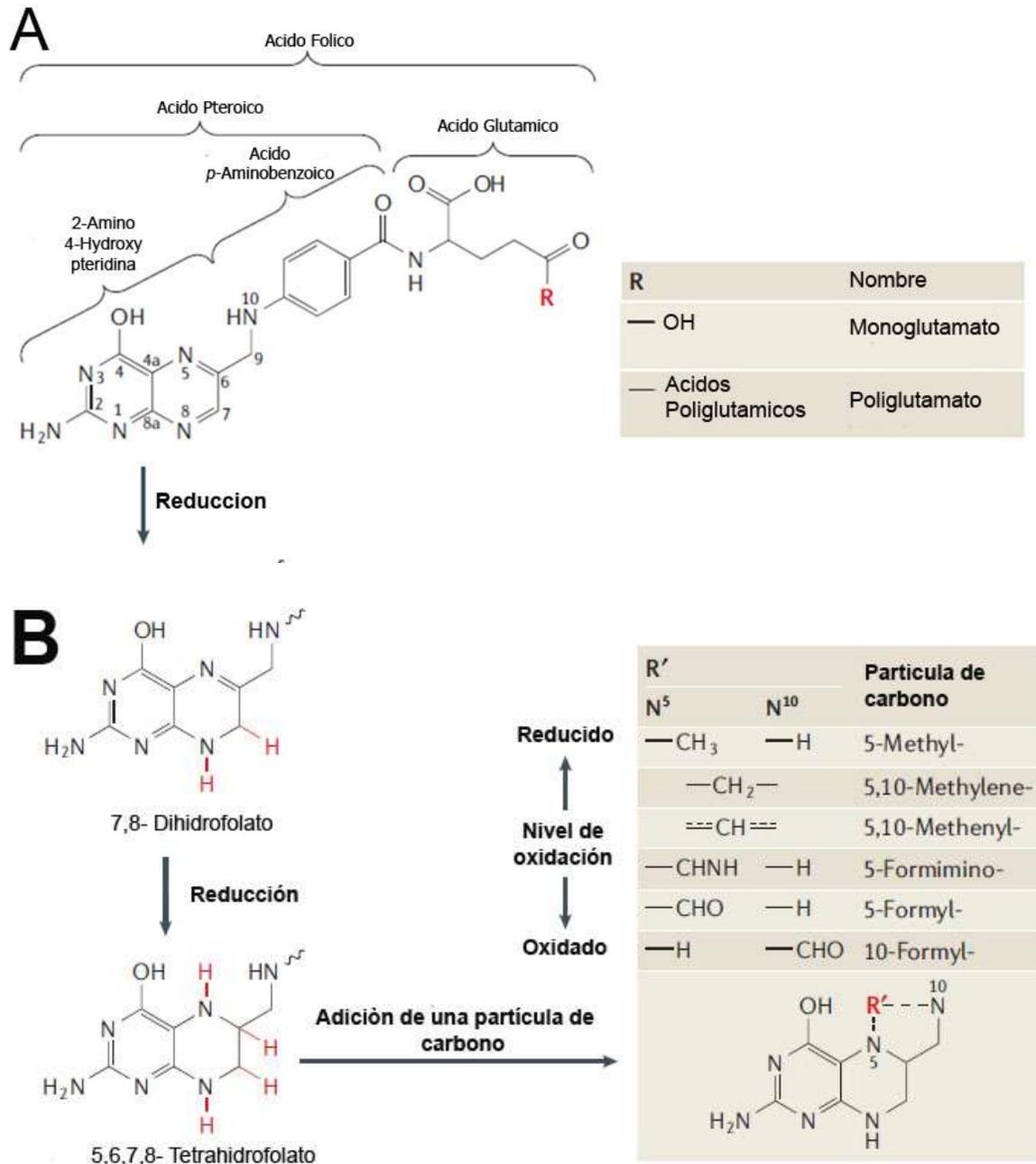


Figura 4.A) Composición de la molécula de ácido fólico.B) Formación del Tetrahydrofolato y sus diferentes formas dependiendo del grupo radical al que este unido. (Modificado de Blom et al. 2006).

El THF poliglutamado funciona como aceptor y donador de unidades de carbono, las cuales están unidas de manera covalente al folato. Estas unidades de carbono son donadas al THF por los aminoácidos histidina, serina, glicina, así como sus derivados dimetilglicina, metilglicina y compuestos como el formato. Mediante este mecanismo de intercambio de unidades de carbono, el folato participa en una cadena de reacciones biosintéticas y catabólicas conocida como metabolismo de los folatos (Figura 5). Este metabolismo se desarrolla en tres compartimentos celulares: citoplasma, mitocondria y núcleo, realizándose en cada uno de ellos funciones metabólicas especializadas. En la mitocondria se realiza la síntesis de formato a través del catabolismo de glicina, serina y colina (Figura 6). Por su parte en el citoplasma se utiliza el formato sintetizado en el ciclo mitocondrial para los procesos de síntesis de nucleótidos y la remetilación de homocisteina, mientras que en el núcleo se lleva a cabo la síntesis de timidilato durante la replicación y reparación de ADN (Figura 7).

Por lo tanto el metabolismo de los folatos puede ser dividido en dos procesos de importancia: el primero relacionado con el ciclo de metilación y el segundo con la síntesis de nucleótidos.

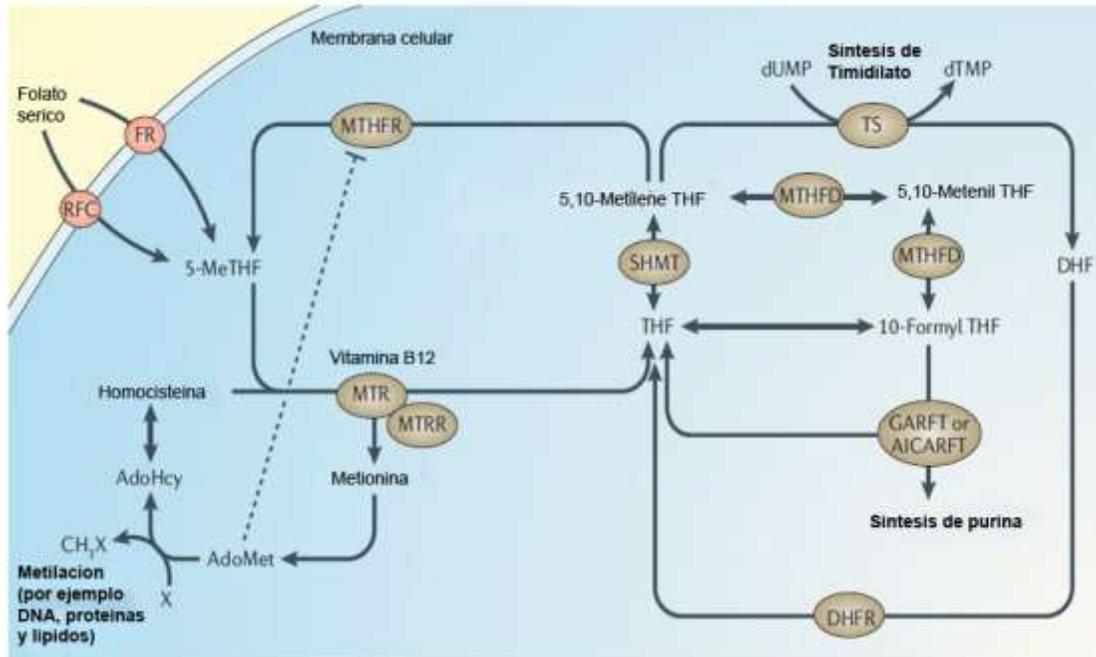


Figura 5. Metabolismo de los folatos simplificado. En la circulación, el folato se presenta principalmente como 5-metiltetrahydrofolato (5-MeTHF), el cual es tomado por la célula a través de receptores y acarreadores específicos. Ya en la célula el folato dona unidades de carbono para que sean usadas en reacciones de metilación y en la síntesis de purina y timidilato (Modificada de Blom et al. 2006).

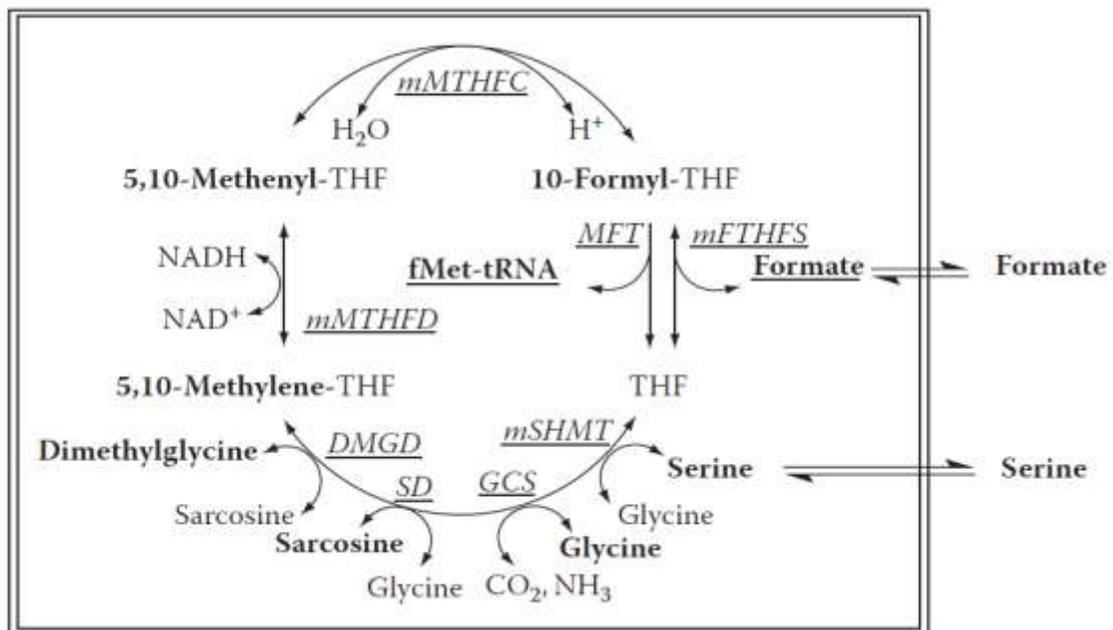


Figura6. Compartimentalización del metabolismo de los folatos en la mitocondria. De esta parte del metabolismo se genera formato, el cual es esencial para el metabolismo del citoplasma, además se genera el aminoácido glicina y se sintetiza formilmetionil-tRNA para la síntesis de proteína en mitocondria (Tomado de Beaudin y Stover. 2009).

5.1.1 Ciclo de metilación

Para este ciclo participa la enzima Metilen Tetrahydrofolato Reductasa (MTHFR), la cual cataliza la reducción de 5,10 Metilen-THF a 5 Metil-THF, permitiendo la participación de este último como donador de metilo en la remetilación de homocisteína (Hcy). La remetilación de Hcy se lleva a cabo por la enzima Metionina sintetasa (MTR), que a su vez es activada por la enzima Metionina sintetasa reductasa (MTRR). Una vez metilada, la Hcy es convertida en metionina, para posteriormente participar en el proceso de transmetilación, en el cual, por medio de la enzima Metionina adenosiltransferasa, se sintetiza S-adenosilmetionina (SAM) a partir de metionina y ATP (Figura 5).

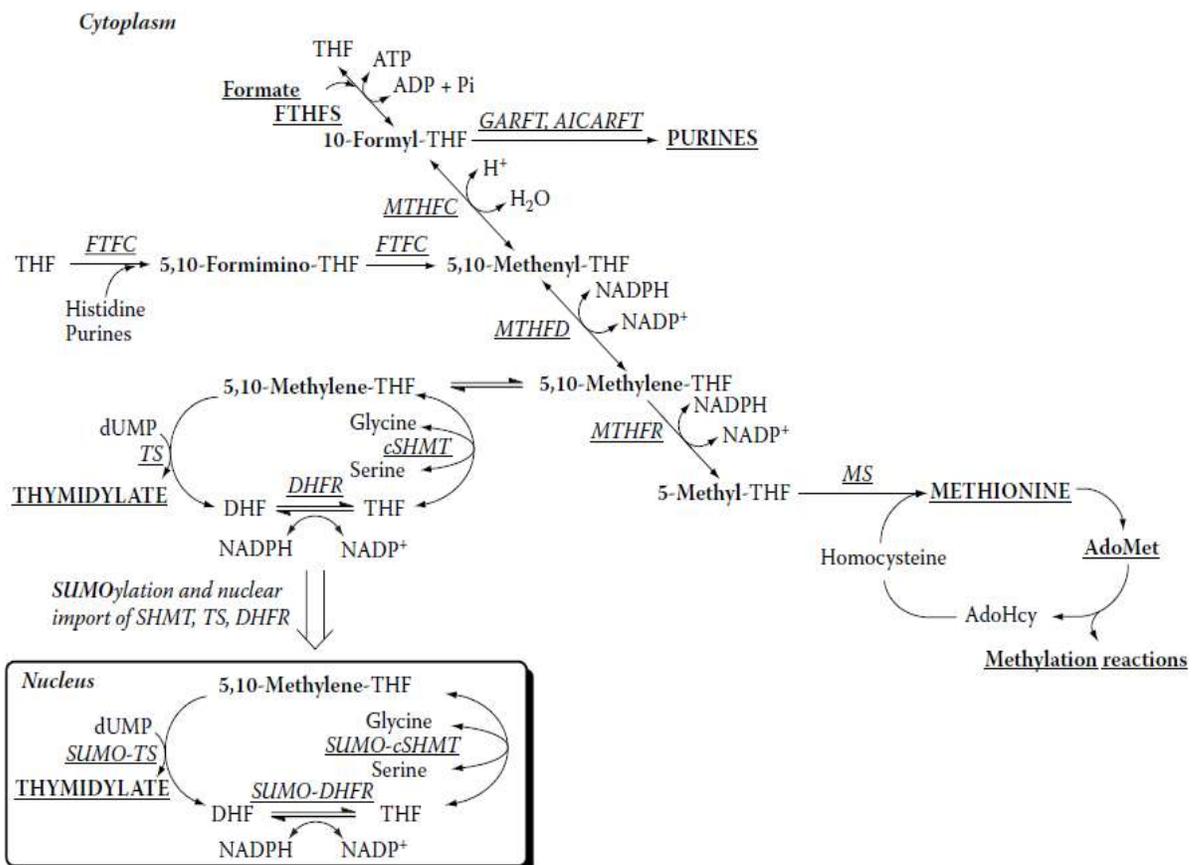


Figura 7. Compartimentalización del metabolismo de los folatos en citoplasma y núcleo. El metabolismo de los folatos en el citoplasma es necesario para la síntesis de novo de purinas y timidilato, además de la remetilación de homocisteína a metionina. El metabolismo de los folatos en el núcleo se encarga de la síntesis de dTMP a partir de dUMP y serina (Tomado de Beaudin y Stover. 2009)

5.1.2 Síntesis de nucleótidos

En el citoplasma, la enzima trifuncional Metilen-THF-deshidrogenasa/ Metenil-THF-ciclohidrolasa/ Formil-THF-sintetasa (C_1 -THF), la cual es transcrita por el gen *MTHFD1*, es la encargada de catalizar la formación de 10-formil-THF, a partir de formato y THF. Este compuesto sirve como donador de carbono para la síntesis de novo de purinas, supliendo los carbonos 2 y 8 del anillo de estos nucleótidos.

Para la síntesis de timidilato (dTMP), es necesario el compuesto 5-10 Metilen-THF, el cual es reducido a partir de 10-formil-THF, por medio del dominio Metilen-THF-deshidrogenasa de la enzima C_1 -THF, o bien a través de una ruta alterna catalizada por la enzima Serina hidroximetil-transferasa (SHMT), a partir de serina y THF. 5-10 Metilen-THF cumple la función de cofactor para la enzima Timidilato sintetasa (TYMS), en la conversión de uridilato (dUMP) a timidilato. Como producto de esta reacción, el THF es transformado a dihidrofolato (DHF), el cual será reducido nuevamente a THF por medio de la enzima Dihidrofolato Reductasa (DHFR) (Figura 5).

Debido a que el metabolismo de los folatos regula una cadena compleja de rutas metabólicas y procesos biológicos básicos para el crecimiento, diferenciación y proliferación celular (Beaudin and Stover, 2007, 2009), una disminución en la actividad de las enzimas codificadas por los genes participantes en este ciclo podría afectar el correcto cierre del tubo neural. La investigación de mutaciones de algunos de estos genes candidatos, que participan en el metabolismo de los folatos, metilación y síntesis de ADN, en periodos tan tempranos del desarrollo embrionario, en particular del tubo neural, podría explicar gran parte de la etiología de los DTNs.

5.2 Variantes genéticas en el metabolismo de los folatos

5.2.1 MTHFR

MTHFR cataliza la reducción irreversible de 5,10 Metilen-THF a Metil-THF, utilizando como cofactores el dinucleótido de flavina y adenina (FAD) y el fosfodinucleótido de nicotinamida-adenina, en su forma reducida (NADPH), llevando unidades de un solo carbono al ciclo de metilación. El gen encargado de codificar esta proteína es el gen *MTHFR*, cuya localización cromosómica es 1p36.3 y está conformado por 12 exones (Figura 8). Diversas investigaciones sobre las mutaciones que pueden presentarse en el gen *MTHFR* han permitido la identificación de una variante termolábil de la enzima MTHFR (Leclerc et al. 2005).

El polimorfismo denominado *MTHFR* C677T, ha sido asociado con la presencia de niveles elevados de homocisteína (Hcy) en plasma. Desde su descubrimiento *MTHFR* C677T, se ha convertido en la variante del ciclo de los folatos más estudiada.

5.2.1.1 MTHFR C677T

La variante *MTHFR* C677T (rs1801133) está localizada en el exón 4, y origina una sustitución de alanina por valina (A222V) en el dominio catalítico (Frosst et al. 1995) (Figura 8B).

La prevalencia del genotipo 677TT varía entre diferentes regiones y grupos étnicos. Para la población mexicana este genotipo es sumamente común, siendo reportada una frecuencia del 34.8% (Mutchinick et al. 1999). La frecuencia que se

reporta para la población caucásica en Norte América va del 8% al 14%, mientras que las poblaciones europeas se observa un incremento de frecuencia de Norte a Sur del continente, mostrando rangos que van del 6% al 14% y del 15% al 24% respectivamente. Por otra parte en la población afroamericana se observa una frecuencia mínima del 2% para este genotipo (Botto, 2000, Ogino 2003, Sharp, 2004, Lecrerc, 2005, Gueant-Rodriguez, 2006, Amarin, 2007, Yang, 2008,).

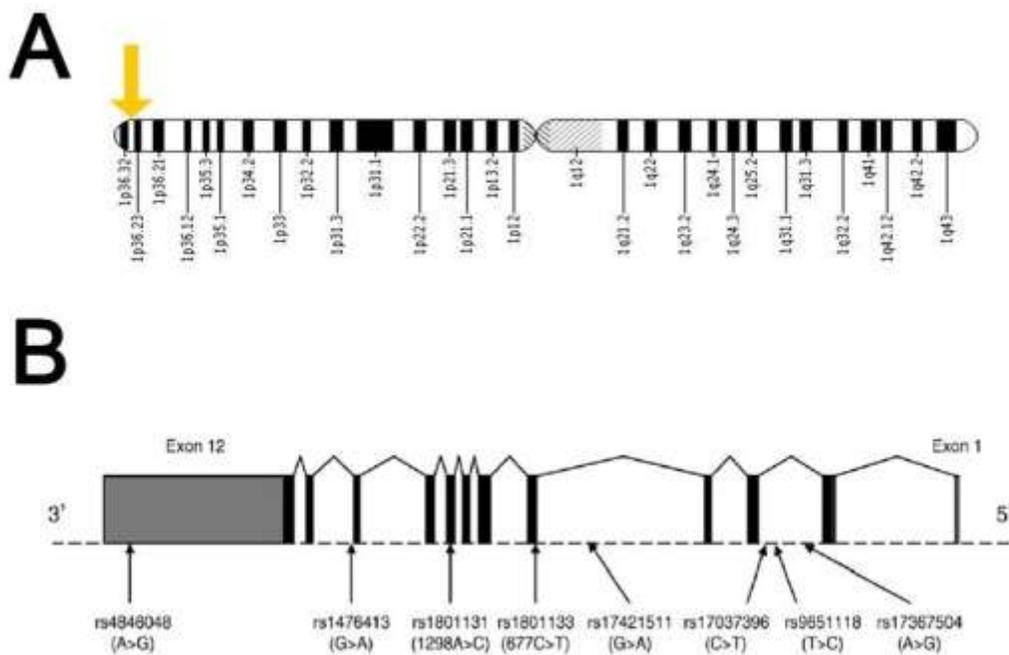


Figura 8. Localización y composición del gen *MTHFR*. A) Señalamiento de la localización cromosómica del gen *MTHFR*. B) Numero de exones del que está compuesto el gen *MTHFR*, además de la localización de las variantes descritas en este gen (Modificado de Yoshimi, 2010).

El genotipo TT, de la variante *MTHFR* C677T, resulta en una enzima termolábil con una reducida actividad (Frosst et al. 1995, Yamada et al. 2001, van der Put et al. 1996). La variante termolábil de MTHFR conserva solo el 30% de su actividad después de ser sometida a una temperatura de 46°C (Frosst et al. 1995, Yamada

et al. 2001). Se ha observado que individuos con el genotipo 677TT, tienen solo el 30% de actividad en extractos de linfocitos, comparados con individuos que presentan el genotipo 677CC (Frosst et al. 1995, Weisberg et al. 1998, van der Put et al. 1998). La función catalítica de la proteína A222V purificada no difiere de la proteína sin mutar in vitro, pero es más propensa a perder su cofactor FAD, lo cual explicaría la reducción de su actividad in vivo (Yamada et al. 2001).

La variante C677T puede ocasionar efectos nocivos en el ciclo de metilación, ya que MTHFR es el único productor de 5 Metil-THF. La reducción en la actividad de MTHFR incrementa las concentraciones de Hcy por la reducción de los niveles de 5 Metil-THF disponibles para la metilación de Hcy. Diversas investigaciones han reportado un aumento en los niveles de Hcy de hasta en un 70%, en individuos con el genotipo 677TT en comparación con aquellos que presentan el genotipo 677CC (Frosst et al. 1995, Jacques et al. 1996, van der Put et al. 1998, Davis et al. 2005, Devlin et al. 2006, Gueant-Rodriguez et al. 2006, Fredriksen et al. 2007, Hustad et al. 2007, Yang et al. 2008).

La reducción de la actividad de MTHFR puede alterar la distribución de los derivados de folato, con un descenso en los niveles de metil-THF y un incremento de 5, 10 Metilen-THF. El 5,10 Metilen-THF puede ser usado para la síntesis de dTMP, o convertido en otras formas de folato, como el formil-THF para la síntesis de purinas u otros procesos. El incremento en la síntesis de dTMP ha sido observado en individuos con genotipo TT (Friso et al. 2002). Al ser 5-metil-THF la mayor forma de transporte de folato, se observa que una reducción de la actividad en MTHFR disminuye la cantidad de folato circulante.

El proceso de metilación se ve disminuido cuando se reduce la actividad de MTHFR, ya que descienden los niveles de SAM, incrementándose los niveles de S-adenosilhomocisteína (SAH), un conocido inhibidor de metiltransferasas (James et al. 2005). Existen reportes de que en los individuos con el genotipo TT existe un incremento en la inestabilidad genética además de reducción en la metilación (Friso et al. 2002).

Por lo tanto, la variante *MTHFRC677T* es un factor de riesgo asociado a enfermedades debido a sus efectos en la reducción de la actividad enzimática. El incremento de Hcy, la disminución de folato circulante, una anormal síntesis de nucleótidos y un descenso en la capacidad de llevar a cabo reacciones de metilación son consecuencias clínicas de esta variante.

5.2.1.2 *MTHFRC677T* y DTN

La variante fue considerada como un factor de riesgo a DTN en 1995 (van der Put et al. 1995). Desde entonces una gran cantidad de análisis han confirmado que los genotipos TT y CT, ya sea en la madre o en el producto, incrementan el riesgo de desarrollar DTN, en rangos de 1.6-2.0 y 1.4-1.9 respectivamente (Botto et al. 2000, Vollset et al. 2005, Amorim et al. 2007). Sin embargo esta asociación entre la variante y los DTN puede ser modificada por diversos factores. El grupo étnico (Amorim et al. 2007), el tipo de DTN (Wenstrom et al. 2000, Volcik et al. 2003), las interacciones con otras variantes que se presentan en el metabolismo de los folatos (Botto et al. 2000, Relton et al. 2004) y las concentraciones de folato (Shaw et al. 1998, Christensen et al. 1999, Volcik et al. 2003), son modificadores

que alteran el riesgo de DTN asociado a la variante. Cuando el genotipo TT está presente tanto en la madre como en el hijo el riesgo de DTN se incrementa hasta 6 veces (van der Put et al. 1996, Christensen et al. 1999).

En lo que respecta a la población mexicana, se ha reportado que la presencia del genotipo 677TT representa un factor de riesgo materno para anencefalia (Blanco-Muñoz et al. 2007). Otro estudio reporta que las mujeres con genotipo 677TT, cuyo embarazo ha sido afectado por anencefalia, presentan mayores niveles de Hcy y bajos niveles de folato en comparación con los genotipos 677CC y 677CT tanto de mujeres en la misma condición, así como de madres con hijos sanos (Lascaña et al. 2012). En este mismo análisis se reporta que el riesgo para las mujeres con genotipo 677TT, se ve reducido con el incremento de los niveles de folato sérico, viéndose reducido el riesgo hasta en un 95% en mujeres que presentan niveles de folatos mayores a 14.1 ng/ml (Lascaña et al. 2012).

Por otra parte, un estudio realizado en una población mixta de los Estados Unidos, describió que el genotipo 667TT incrementa hasta dos veces el riesgo de espina bífida en población hispana (Shawn et al. 2009).

En un estudio más reciente, se ha descrito la presencia de la variante C677T como un factor de riesgo materno para defectos de tubo neural. Mediante un metanálisis que incluyó 25 estudios realizados en diferentes poblaciones, se observó que el genotipo 677TT materno incrementa el riesgo para DTN en un rango de 1.33-2.03 (Yan et al. 2012).

5.2.1.3 *MTHFRA1298C*

La variante *MTHFRA1298C* (rs1801131) está localizada en el exón 7 (Figura 8B), la cual ocasiona una sustitución de glutamato por alanina (E429A) (Weisberg et al. 1998, van der Put et al. 1998). La prevalencia de esta variante varía según la localización geográfica y el grupo étnico de la población (Ogino et al. 2003, Gueant-Rodriguez et al. 2006, Yang et al. 2008). La población mexicana e hispanoamericana reporta una frecuencia de 2-4%, mientras que la población caucásica de Europa y Norte América presenta una frecuencia de 6-11% (Ogino et al. 2003).

Los efectos en la actividad enzimática, provocados por esta variante son de menores consecuencias en comparación con los provocados por la variante C677T. Los individuos con el genotipo 1298CC presentan una actividad del 60-70% en MTHFR (Weisberg et al. 1998, van der Put et al. 1998). A diferencia de la variante C677T, la sustitución ocurrida en la variante A1298C no da como resultado una enzima termolábil (van der Put et al. 1998, Yamada et al. 2001, Weisberg et al. 2001). Diversos estudios han comprobado que en la proteína E429A, en solitario y en combinación con A222V, la función catalítica, la inhibición por SAM y el rango de liberación de FAD no se ve afectada (Yamada et al. 2001). Además los niveles plasmáticos de Hcy y folato no reportan ninguna variación en presencia de este polimorfismo (Weisberg et al. 1998, van der Put et al. 1998, Yang et al. 2008).

Se han reportado incremento en los niveles de Hcy en heterocigotos compuestos por las mutaciones *MTHFRC677T* y *MTHFRA1298C* (van der Put et al. 1998, Weisberg et al. 2001), sin embargo en estos casos se encontró que la presencia

de la variante C677T causaba un mayor impacto en las concentraciones de Hcy y folato que A1298C.

5.2.1.4 *MTHFRA1298C* y DTN

La mayoría de los estudios han concluido que esta variante no representa un factor de riesgo independiente para DTN (Weisberg et al. 1998, van der Put et al. 1998, Parle-McDermott et al. 2003, Relton et al. 2004, Relton & Wilding 2004). Sin embargo algunos estudios sugieren que la presencia de un heterocigoto compuesto por A1298C y C667T puede incrementar el riesgo de DTN en un rango de 2.04-6.56 (van der Put et al. 1998, Botto et al. 2003, Relton & Wilding. 2004).

En lo que respecta a la población mexicana, González-Herrera et al. (2007), en un estudio de casos y controles realizado en tríos familiares del estado de Yucatán, reportaron que la presencia de la variante A1298C en el genotipo materno está asociada con la posibilidad de tener un embarazo afectado con espina bífida.

Por otra parte, se realizó un metáanálisis en el 2012 (Wang et al.), el cual incluyó 23 estudios de casos y controles para la variante A1298C, reportando que este polimorfismo no representa un factor de riesgo para DTN.

5.2.2 *MTR*

MTR es la enzima encargada de catalizar la remetilación de Hcy usando 5 Metil-THF como un donador de carbono y cobalamina I como cofactor. MTR es la vía principal para la remetilación de Hcy (Chen et al. 1997). Esta proteína es codificada por el gen *MTR* (Figura 9A), localizado en el cromosoma 1q43 (Chen et

al. 1997), está compuesta por 1265 aminoácidos y tiene un peso de 140.5 kDa (Goulding et al. 1997).

MTR es necesaria para la acumulación y el mantenimiento de los depósitos intracelulares de folato, ya que convierte el metilTHF en otras formas de folato, que en comparación con el metilTHF, son buenos sustratos para la poliglutamación (Deng et al, 2008).

Si la actividad de MTR es reducida, los niveles de Hcy se incrementan (Olteanu et al. 2002), y los niveles de 5 Metil-THF aumentan debido a que MTR es la única enzima capaz de remover el grupo metil, liberando el THF, permitiéndole formar parte de otra reacción del metabolismo de los folatos.

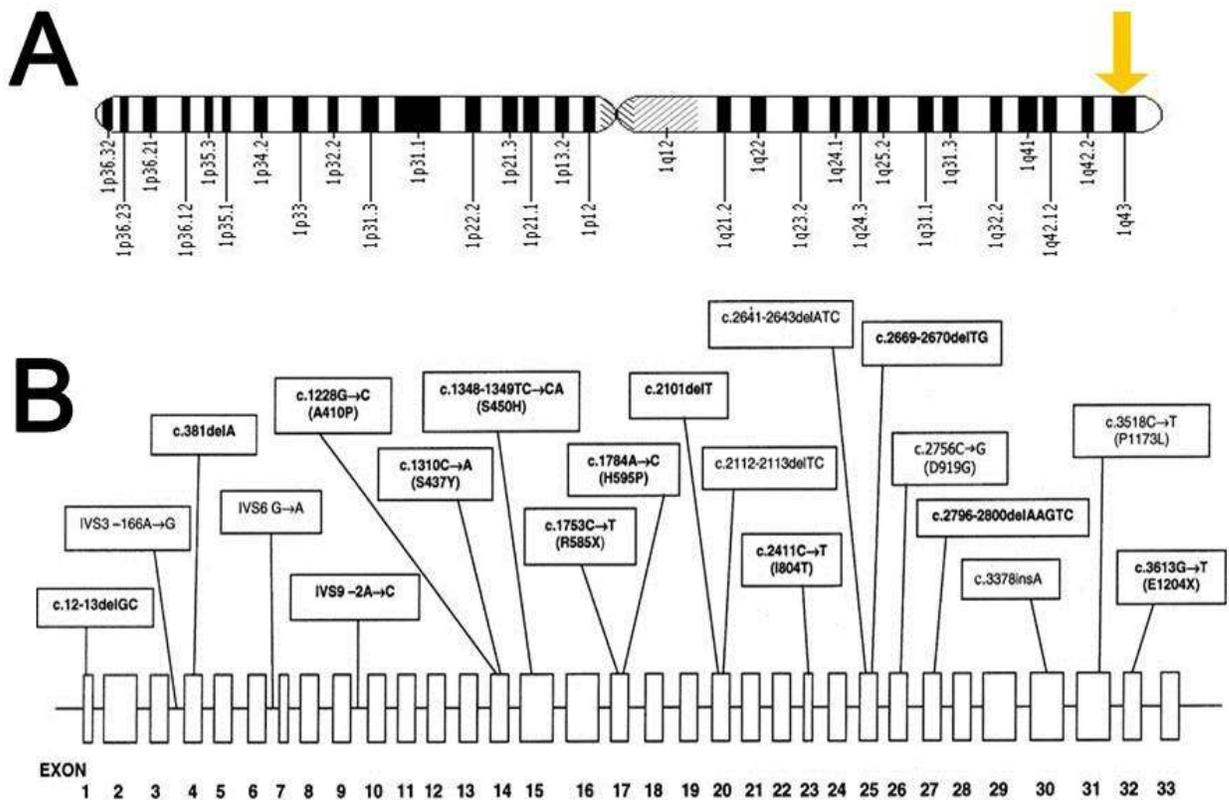


Figura 9. Localización cromosómica y composición del gen *MTR*. A) Se observa la localización del gen *MTR* en el cromosoma 1. B) Esquema donde se observa la estructura genómica del gen *MTR*, así como la localización de algunas variantes alélicas descritas (Modificado de Watkins 2002).

5.2.2.1 MTRA2756G

El polimorfismo *MTRA2756G* (rs1805087) es una variante localizada en el exón 26 (Figura 9B), que da como resultado una sustitución de ácido aspártico por glicina (D919G) (Chen et al. 1997, van der Put et al. 1997). El rango de frecuencia que presenta el genotipo GG es consistente a nivel mundial, oscilando entre el 1 al 5% en las poblaciones asiáticas, europeas, australianas y norte americanas (van der Put et al. 1997, Sharp et al. 2004, Fredriksen et al. 2007, Theodoratou et al. 2008). La sustitución D919G puede alterar la estructura de la proteína, sin embargo el efecto de esta variante en la actividad de MTR aún no ha sido evaluada (Koushik et al. 2006). Estudios han mostrado una asociación entre la variante y la presencia de bajos niveles de Hcy (Sharp et al. 2004, Fredriksen et al. 2007, Chen et al. 2001), por otra parte se ha observado que no tiene influencia en los niveles de folato o vitamina B12 (Fredriksen et al. 2007, Ma et al. 1999).

5.2.2.2 MTR A2756G y DTN

En relación a DTN, la evidencia existente no permite tener claro una conclusión sobre cómo actúa la presencia de esta variante con respecto al riesgo de DTN. Diversos estudios han observado que la presencia de la variante *MTRA2756G*, en la madre o en el hijo, incrementa el riesgo para estas malformaciones congénitas en un rango de 1.90-2.60 (Doolin et al. 2002, Zhu et al. 2003, Guéant-Rodriguez et al. 2003), mientras que otros han reportado que la presencia del alelo G no representa ningún riesgo de DTN (Al Farra 2010, Candito et al. 2008, O Leary et

al. 2005). Recientemente en un metanálisis que involucró once publicaciones sobre la variante *MTR* A2756G, no se observó ningún tipo de asociación con respecto a DTN (Ouyang et al. 2013). Por otra parte se ha reportado que esta variante puede incrementar el riesgo de DTN, en un rango de 2.1-3.0, cuando se encuentra en asociación con la variante *MTRRA*66G (Zhu et al. 2003, van der Linden et al. 2006).

5.2.3 *MTRR*

MTRR es una proteína soluble, con un peso molecular de 78kDa, su función principal es reactivar el cofactor cobalamina de *MTR* cuando este ha sido oxidado a cobalto (Olteanu et al. 2002). *MTRR* requiere de NADPH, FAD y riboflavin 5'-fosfato, además de usar SAM como un donador de grupos metilo (Olteanu et al. 2002). Si el cobalto no es reducido a cobalamina por *MTRR*, la actividad de *MTR* se ve bloqueada, lo que conduce a la presencia de elevados niveles de Hcy (Olteanu et al. 2002).

El gen codificador de esta proteína recibe el nombre de *MTRR*, se encuentra localizado en el cromosoma 5p15.3-p15.2 y está compuesto por 15 exones (Figura 10).

5.2.3.1 *MTRRA*66G

La variante *MTRRA*66G (rs1801394), localizada en el exón 2 (Figura 10B), produce una sustitución de isoleucina por metionina (I22M) (Wilson et al. 1999). La frecuencia del genotipo 66GG en caucásicos es de 20-38%, mientras que en las

poblaciones asiáticas, africanas y mexicanas se presentan rangos de 7-8%, 6-8% y 6-7% respectivamente (Shi et al. 2003, Sharp et al. 2004, Yang et al. 2008, Fredriksen et al. 2007, Theodoratou et al. 2008).

Los genotipos homocigotos silvestres, así como la proteína I22M tienen características cinéticas similares, sin embargo se requiere cuatro veces más proteína I22M para alcanzar el nivel de actividad máxima (Olteanu et al. 2002).

La mutación *MTRRA*66G parece no tener efecto sobre la homocisteína (Botto et al. 2003, Brilakis et al. 2003, van der Linden et al. 2006, Fredriksen et al. 2007, Yang et al. 2008), y tampoco parece afectar los niveles de SAM (Barbosa et al. 2008), folato y vitamina B12 (Brown et al. 2000, Gueant-Rodriguez et al. 2005, Fredriksen et al. 2007, Yang et al. 2008, Barbosa et al. 2008).

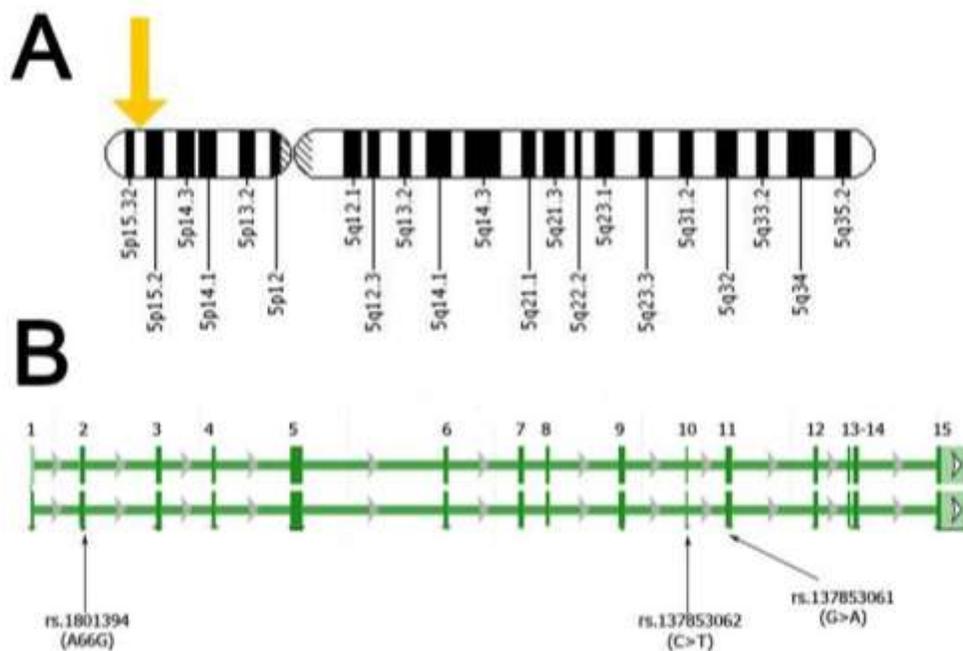


Figura 10. A) Localización del gen *MTRR* en la región p15.32 del cromosoma 5. B) Imagen de la composición del gen *MTRR*, donde se señala la localización de variantes alélicas de importancia clínica.

5.2.3.2 *MTRR* A66G y DTN

Existe evidencia sobre una potencial asociación entre la variante y el riesgo de DTN. Diversos estudios han reportado que el genotipo 66GG en la madre muestra un incremento de 1.90-2.15 en el riesgo de DTN (Zhu et al. 2003, van der Linden et al. 2006, Candito et al. 2008). Sin embargo, este efecto puede ser influenciado por la presencia de niveles bajos de metabolitos importantes para el ciclo de los folatos, como el caso de la vitamina B12 (Wilson et al. 1999, van der Linden et al. 2006). De manera contrastante, se ha reportado que no existe una asociación entre el genotipo *MTRR* 66GG y un incremento en el riesgo materno para DTN (Relton et al 2004, O Leary et al. 2005, Naushad y Devi 2010). Un metáanálisis realizado en el 2013, que incluyó 10 estudios sobre *MTRR* A66G y el riesgo para DTN, concluyó que esta variante incrementa en 1.31 el riesgo materno para DTN (Ouyang et al. 2013).

Por otra parte la evaluación de esta variante en el producto muestra resultados controversiales. Un estudio ha reportado que la presencia del genotipo 66GG incrementa en 2.6 el riesgo para DTN (Zhu et al. 2003), mientras otros no han encontrado tal asociación (O Leary et al. 2005, van der Linden et al. 2006, Shaw et al. 2009).

Otra asociación entre la variante *MTRR* A66G y DTN se ha encontrado en combinación con otras variantes del metabolismo de los folatos. Existen indicadores de que la combinación de las variantes *MTRR*A66G y *MTHFR* C677T provoca un incremento de 3 a 4 veces el riesgo de DTN (Wilson et al. 1999, Relton et al. 2004, Guéant-Rodriguez et al. 2003, van der Linden et al. 2006,), así como también se ha observado que la combinación del alelo *MTR* A2756G y el

aleloA66G incrementa de 2 a 3 veces el riesgo de DTN (Zhu et al. 2003, van der Linden et al. 2006).

5.2.4 MTHFD1

La Metilen-THF Deshidrogenasa - Metenil-THF Ciclohidolasa - Formil-THF Sintetasa (C₁-THF sintasa) es una enzima citoplasmática trifuncional dependiente del Dinucleótido de Nicotinamida-Adenina Fosfato (NADP), de 100 kDa, codificada por el gen *MTHFD1*, la cual cataliza la conversión de THF a los derivados 10-formil, 5-10 metenil y 5-10 metilen.

Esta enzima está compuesta por dos dominios funcionales (Figura 11): un dominio amino terminal de 33 kDa, que posee las actividades deshidrogenasa y ciclohidrolasa, y un dominio en la región carboxilo terminal, de 67 kDa, que presenta la actividad sintetasa (Carroll et al. 2009).

La actividad de esta enzima es esencial para la síntesis de ADN, ya que provee los metabolitos 10-formilTHF y 5,10-metilenTHF para la síntesis de purinas y timidilato. Por lo tanto, el funcionamiento de esta enzima es vital en células de rápida división, como lo son las células embrionarias, donde las purinas y pirimidinas están en constante demanda para la síntesis de ADN (Carroll et al. 2009).

El gen *MTHFD1* está conformado por 28 exones, y se encuentra localizado en el cromosoma 14q23.3 (Figura 11).

5.2.4.1 MTHFD1 G1958A

La variante *MTHFD1* G1958A (rs2236225) está situada en el exón 20 (Figura 11B), originando una sustitución de Arginina por Glutamina (R653Q) (Hol et al. 1998). La frecuencia de esta variante va de 15 a 21% para la población caucásica europea y americana (Hol et al. 1998, Brody et al. 2002, Shi et al. 2003, Chen et al. 2004, Parle-McDermott et al. 2005, De Marco et al. 2006, Fredriksen et al. 2007, van der Linden et al. 2007).

La proteína resultante de la mutación *MTHFD1* G1958A ha sido purificada y caracterizada *in vitro*, encontrando que tiene menor termoestabilidad que la proteína común (Christensen et al. 2009). La diferencia de estabildades es reprimida en grandes concentraciones de folato, lo que sugiere la posibilidad de interacción entre genes y nutrientes. No se han observado efectos producidos por esta mutación sobre la Hcy o el folato circulante (Hol et al. 1998, Brody et al. 2002, Chen et al. 2004, Kohlmeier et al. 2005, Fredriksen et al. 2007).

5.2.4.2 MTHFD1 G1958A y DTN

Los resultados obtenidos en torno al posible incremento de riesgo para DTN que puede conferir la variante G1958A han sido controversiales.

Diversos estudios han indicado que la presencia del genotipo 1958AA representa un factor que incrementa el riesgo materno para DTN en 1.51-1.96 (Brody et al. 2002, Parle-McDermott et al. 2006, De Marco et al. 2006, Pangilinan et al. 2012), mientras que esta misma asociación ha sido descartada para poblaciones como la holandesa (van der Linden et al. 2007).

En lo que respecta a la variante *MTHFD1* G1958A como factor de riesgo para DTN en el producto, se ha reportado que la presencia del alelo A, en estado homocigoto incrementa el riesgo para DTN en un rango de 1.6-1.9 (De Marco et al. 2006, Shaw et al. 2009, Pangilinan et al. 2012), pero también un gran número de estudios no ha encontrado dicha asociación (Hol et al. 1998, van der Linden et al. 2007, Franke et al. 2008, Doudney et al. 2009).

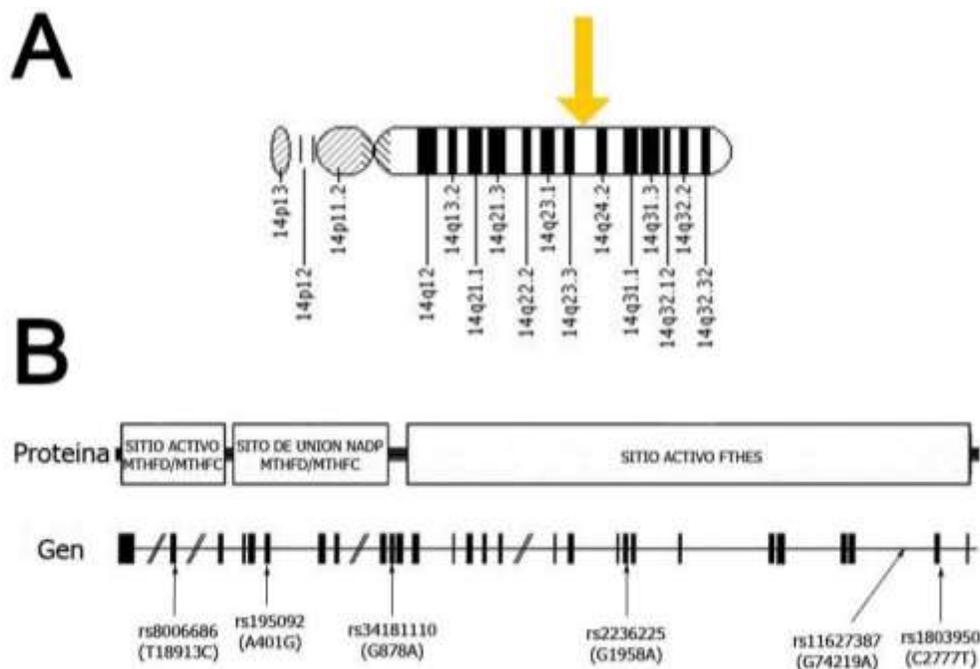


Figura 11. A) Localización del gen *MTHFD1* en la region q23.3 del cromosoma 14. B) Esquema de la proteína C1-THF sintasa, que señala los sitios activos y de unión por los que esta compuesta, así como también se muestra un esquema de la composición del gen *MTHFD1*, donde se señalan algunas de las variantes alelicas reportadas para este gen (Modificado de MacFarlane, 2009).

5.2.5 *TCN2*

El gen *TCN2* (Figura 12), localizado en 22q12.2, está conformado por 9 exones y tiene como producto a la proteína sérica no glicosilada Transcobalamina II,

conformada por 409 residuos de aminoácidos, con un peso de 45.5 kDa (Quadros et al. 2010).

Esta proteína es la encargada de unirse y transportar a la cobalamina absorbida en el íleon hacia el tejido celular a través del cuerpo (Quadros et al. 2010), la cual funciona como cofactor para el metabolismo del ácido metilmalónico y la homocisteína (Sunder-Plassmann et al. 2003).

La importancia de la cobalamina en el metabolismo de la homocisteína, radica en ser el cofactor de la enzima MTR, en la transferencia del grupo metil del compuesto 5-MetilTHF a la homocisteína, generando metionina y THF. Por lo tanto una deficiencia de cobalamina generaría niveles altos de homocisteína en el plasma del individuo (Afman et al. 2001).

Generalmente los niveles bajos de cobalamina son debidos a una baja ingesta de vitamina B₁₂, sin embargo esto también puede ser atribuido a deficiencias en su absorción y transporte, debido a variaciones genéticas en el gen *TCN2* (Lievers et al. 2002).

5.2.5.1 *TCN2* C776G

La variante *TCN2* C776G (rs1801198) consiste de una sustitución de citosina por guanina en la posición 776 del exón 6 (Figura 12B). Esta transición resulta en una sustitución de arginina por prolina en el codón 259 (P259R) (Miller et al. 2002, Zetterberg 2003).

Se ha observado que esta variante afecta los niveles plasmáticos de transcobalamina II, interviniendo con la disponibilidad celular de la vitamina B₁₂ para el metabolismo de homocisteína (Sunder-Plassmann et al. 2003).

La frecuencia con que se reporta esta variante es de 34.6% para homocigotos CC, 47.8% para heterocigotos y 17.6% para homocigotos GG en la población caucásica (Namour et al. 2001), mientras que de manera similar, se reporta una frecuencia de 17.6% de individuos con el genotipo 766GG para la población mexicana (Guéant et al. 2007).

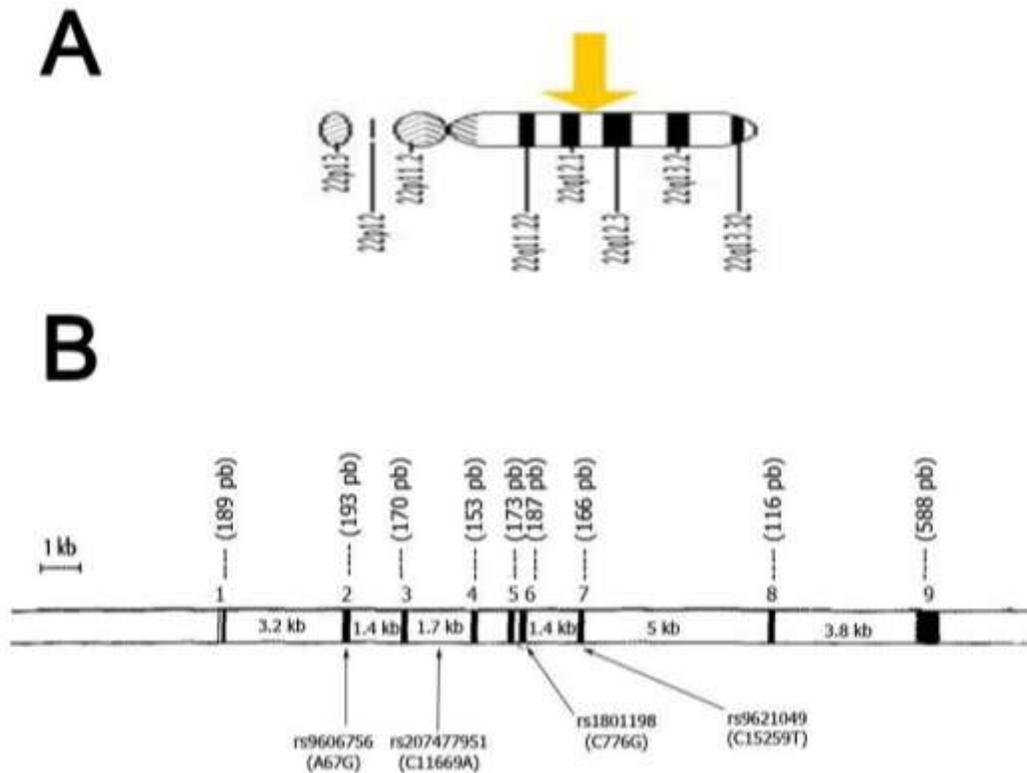


Figura 12. A) Señalamiento de la localización cromosómica del gen *TCN2* en el cromosoma 22. B) Composición del gen *TCN2*. En esta imagen se observa el tamaño de las regiones intrónicas y exónicas del gen, así como la localización de variantes alelicas descritas (Modificado de Li, 1995)

5.2.5.2 TCN2 C776G y DTN

Respecto a la relación de esta variante con DTN, los resultados las investigaciones realizadas hasta el momento, muestran discrepancias entre ellos.

Existen reportes que señalan al genotipo 776GG materno incrementa el riesgo de MMC en poblaciones de Polonia en 2.22 (Pietrzyk et al. 2003) y la India en 1.34 (Godbole et al. 2011), mientras que otras investigaciones, no han encontrado que la variante C776G represente un factor de riesgo, ya sea en la madre o en el producto (Afman et al. 2002, Swanson et al. 2005, Boyles et al. 2006, Candito et al. 2007, Brouns et al. 2008, Pangilinan et al. 2012).

5.2.6 TYMS

TYMS es un gen localizado en el cromosoma 18, conformado por 7 exones (Figura 13), cuyo producto codificado recibe el nombre de Timidilato Sintetasa (TS), la cual es una enzima con un peso molecular de 72 kDa, encargada de catalizar la metilación de dUMP a dTMP.

Esta enzima se considera vital para el mantenimiento de los requerimientos metabólicos esenciales en la proliferación y crecimiento celular, pudiendo su inactivación tener consecuencias de gravedad, como lo son el agotamiento de timina, la inhibición de la síntesis de ADN y en última instancia la muerte celular (Liu et al., 2002; Kawate et al., 2002). De igual forma se ha observado que esta enzima desempeña una función importante en la regulación del ciclo celular y apoptosis, a través de un efecto regulatorio en la expresión de proteínas vinculadas al ciclo celular, como p53 (Liu et al. 2002).

La importancia de TS en el metabolismo de los folatos, recae en la competencia que tiene con la enzima MTHFR, por 5-10 metilenTHF, el cual es un compuesto de importancia en este metabolismo (Liu et al. 2002 Trinh et al. 2002, Ulrich et al. 2002).

Se ha observado que los niveles folato intracelular pueden afectar la expresión de TS, así como también la presencia de polimorfismos en el gen *TYMS*, pueden tener efectos sobre su actividad enzimática, afectando de esta manera los niveles folato y homocisteina (Chu y Allegra 1996, Ulrich et al. 2002, Trinh et al. 2002).

5.2.6.1 *TYMS* Rep28pb 3G>C

Para el gen *TYMS* se ha descrito la variante 2R/3R (series de repeticiones) de 28pb en la región 5' sin traducir (5'-UTR) (rs45445694) (Ulrich et al. 2000), además de una sustitución G>C (Figura 13), que modifica los efectos de 3R, la cual ha sido identificada dentro de las repeticiones de 28pb (rs34743033) (Mandola et al. 2003). Las variantes 2R/3R son los polimorfismos mejor estudiados de *TYMS*.

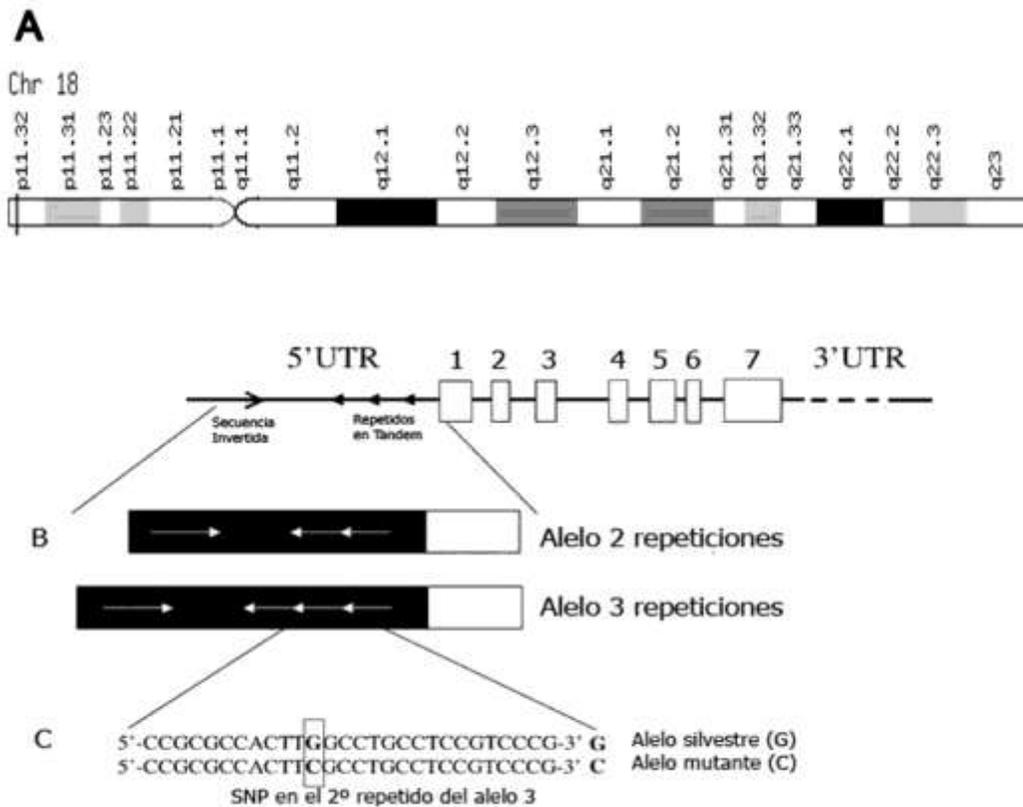


Figura 13. Localización del gen *TYMS*, estructura y polimorfismos. A) Localización de *TYMS* en el cromosoma 18, región p11.32. B) Localización de la serie de repetidos en la zona no transcrita de la región 5' en *TYMS*. C) Sustitución de guanina por citosina en el 2do repetido del alelo de 3 repeticiones en *TYMS* (G>C) (Modificado de Marsh, 2005).

La región 5'-UTR de *TYMS* contiene una secuencia repetida de 28pb, indispensable para una expresión eficiente, la cual usualmente se encuentra por triplicado en el sentido del codón de inicio, en la región de alargamiento de *TYMS* (Horie et al. 1995), esta secuencia es referida como la repetición tándem triple (3R), mientras que la repetición doble (2R) fue descrita en 1995 (Horie et al. 1995). El número de repeticiones controla la actividad de *TYMS*, afectando su eficiencia traduccional, presentándose una mayor eficiencia cuando se encuentra

presente la repetición triple, en comparación con la repetición doble (Kawakami et al. 2001).

La frecuencia del genotipo 2R/2R varía dependiendo del grupo étnico de la población, siendo menos común para asiáticos (2-10%) en comparación con africanos (14-19%) o caucásicos (18-23%) (Hishida et al. 2003, Sharp et al. 2004, Ulrich et al. 2005, Wang et al. 2005).

La proteína expresada por el genotipo homocigoto a 2R es de tres a cuatro veces menos eficiente que la expresada por el genotipo 3R/3R (Horie et al. 1995, Kawakami et al. 2001, Mandola et al. 2003). Los niveles de Hcy parecen no verse afectados por esta variante (Chen et al. 2003, Brown et al. 2004).

Por otra parte, se ha descrito que una transición de guanina por citosina, en el nucleótido número doce, de la segunda repetición del genotipo 3R (3G>C) (Figura 13C), cambia un residuo crítico en el elemento E-box USF, impidiendo la unión de la proteína USF-1, la cual actúa como un potenciador de la transcripción, alterando la actividad transcripcional (Mandola et al. 2003).

En lo que respecta a la frecuencia del alelo 3C, se ha observado variación entre diferentes grupos étnicos, siendo el grupo de africanos el que presenta este alelo con menor frecuencia (15%), seguido de los hispánicos (26%), mientras que los chinos y caucásicos presentan este alelo de manera más frecuente (30% y 33% respectivamente) (Mandola et al. 2003). Referente al genotipo 3C/3C la población en que se presenta más frecuentemente es la China (14%), seguida por los Caucásicos (9%), Hispánicos (7%), y finalmente Africanos (2%) (Mandola et al. 2003).

5.2.6.2 TYMS Rep28pb 3G>C y DTN

El estudio de la variante *TYMS*Rep28pb, como factor de riesgo para DTN, ha arrojado resultados contradictorios. Se ha observado que el genotipo 2R/2R incrementa hasta cuatro veces el riesgo para espina bífida en la población caucásica de Estados Unidos (Volcick et al. 2003), mientras que para la población caucásica del reino unido no se encontró asociación alguna entre esta variante y el incremento en el riesgo para espina bífida (Wilding et al. 2004).

5.2.7 DHFR

La enzima Dihidrofolato Reductasa (DHFR) es codificada por el gen *DHFR*, el cual está localizado en el cromosoma 5, tiene una extensión de 30kb y su región codificante está conformada por 6 exones (Figura 14) (Chen et al. 1984). La función de esta enzima es de vital importancia en el ciclo de los folatos, ya que es la encargada de reducir el folato ingerido a través de la dieta, para que pueda así unirse al metabolismo (Johnson et al. 2004). Aproximadamente la mitad del folato ingerido en la dieta, proveniente de vitaminas, suplementos y alimentos fortificados, ingresa al organismo en forma de ácido fólico, la cual es una forma no reducida de folato, por lo tanto necesita ser reducida por la enzima DHFR antes de poder participar en cualquier reacción celular, de esta forma DHFR actúa como un umbral, a través del cual, el folato participa en el metabolismo (Johnson et al. 2004).

Además de reducir el ácido fólico ingerido en la dieta, DHFR es la encargada de reducir el dihidrofolato (DHF), formado en la síntesis de timidilato, en THF, permitiendo de esta forma que el THF pueda reingresar al ciclo para participar nuevamente en la formación de timidilato, o bien, en el ciclo de metilación sirviendo como donador de grupos metilo para la remetilación de homocisteína. De esta manera la enzima DHFR participa en procesos que son esenciales en etapas tempranas del desarrollo, como lo son la producción de timidilato, síntesis y metilación de ADN (van der Linden et al. 2007).

5.2.7.1 *DHFR* delección 19pb

Para el gen *DHFR* se ha descrito la existencia de una delección de 19pb en el intrón 1 (Figura 14), la cual remueve un sitio de unión para el factor de transcripción Sp1, afectando de esta forma la expresión del gen (Johnson et al 2004).

No se ha observado que la presencia de este polimorfismo afecte los niveles de folato y homocisteína (Stanisiawska-Sachadyn et al. 2008).

Se ha reportado que el genotipo homocigoto para la delección de 19pb está presente en un rango de 17%-22% para la población caucásica (Johnson et al 2004, van der Linden et al. 2007), mientras que en la población mexicana se ha reportado que este genotipo está presente en un 37.33% (Vazquez-Sanchez

2007).

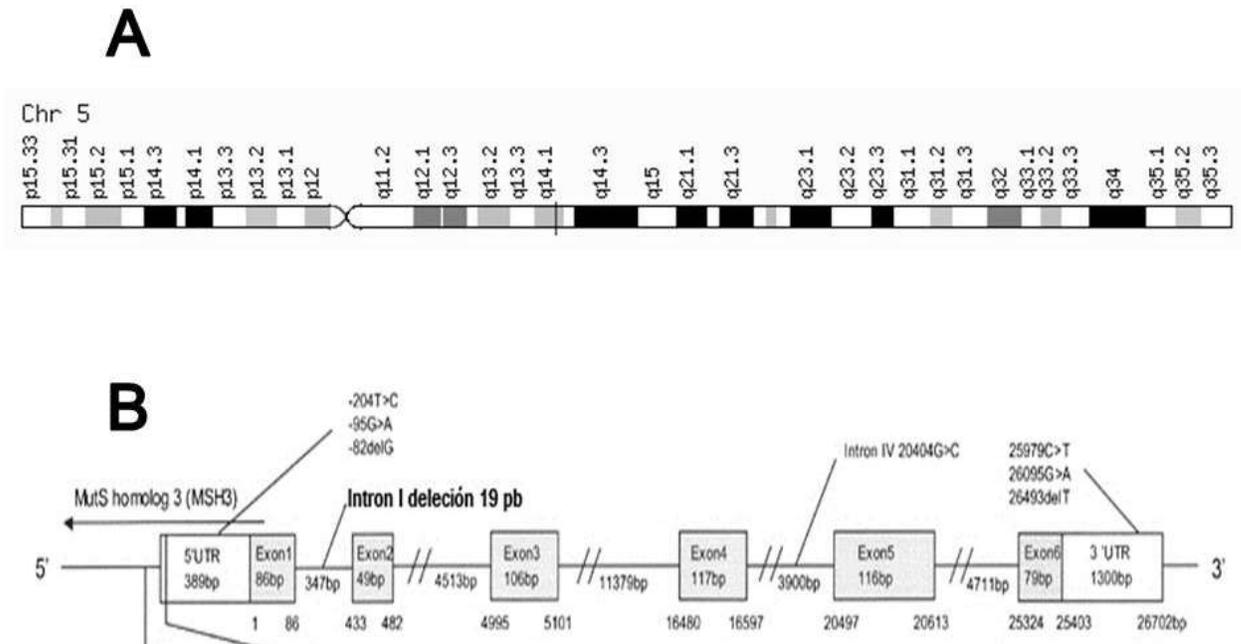


Figura 14. Localización y estructura del gen *DHFR*. A) Localización cromosómica del gen *DHFR*, región q14.1 del cromosoma 5. B) Estructura del gen *DHFR*, se señalan la localización de algunas de sus variantes reportadas, incluyendo la delcación de 19pb en el intrón 1 (Modificado de Gellekink 2006).

5.2.7.2 *DHFR* del19pb y DTN

Esta variante ha sido reportada en asociación con los DTN cuando está presente en el genotipo materno incrementando hasta 2 veces el riesgo para espina bífida, cuando el genotipo homocigoto para la delcación está presente (Johnson et al. 2004). Por otra parte esta misma asociación no ha sido encontrada en otros estudios (van der Linden et al. 2007, Parle-McDermott et al. 2007, Doudney et al. 2009, Pangilinan et al. 2012), e incluso se ha reportado que el genotipo del/del actúa como factor protector materno, incrementado los niveles de RNAm del gen *DHFR* en mujeres embarazadas (Parle-McDermott et al. 2007).

6. METODOLOGÍA

6.1 Población en estudio

Casos: Para la realización de este proyecto fue necesaria la recolección de muestras sanguíneas de 250 tríos familiares conformados por un paciente con MMC y sus progenitores. Dichas muestras pertenecen a pacientes de cualquiera de los 15 diferentes Centros de Rehabilitación Infantil Teletón (CRIT) localizados en los estados de Aguascalientes, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Durango, Estado de México, Guadalajara, Guanajuato, Hidalgo, Oaxaca, Quintana Roo, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán.

La participación de las familias fue recaudada mediante la firma de un consentimiento informado, donde accedieron a participar en la investigación, posteriormente se tomó una muestra sanguínea, o en caso excepcional de mucosa oral, de cada uno de los miembros del trio familiar. A su vez se realizó el llenado de las encuestas de antecedentes clínico-genéticos y frecuencia de consumo de alimentos.

6.1.1 Criterios de selección

Criterios de inclusión

1. Pacientes con alguna de las variedades de MMC, cuyos progenitores acepten participar y firmen el consentimiento informado.
2. Que las madres acepten responder la encuesta de antecedentes clínico-genéticos de las respectivas familias.
3. Que acepten donar una muestra de sangre, tanto los progenitores como el paciente.

Criterios de exclusión

1. Que no sea posible estudiar a ambos progenitores.
2. Que el paciente sea adoptado.
3. Que el paciente presente MMC como parte de un síndrome.

Criterios de eliminación

1. Que el diagnóstico clínico sugiera MMC, pero que estuviera aún en estudio y no se haya confirmado.
2. Que el paciente haya sido de alta y no se haya completado ya sea la aplicación de la encuesta o la toma de muestra.
3. Que la familia decidiera en cualquier momento que no se analice la información y muestras biológicas proporcionadas.
4. Cantidad y calidad de la muestra insuficiente para la realización de los análisis.
5. Cambio de diagnóstico de MMC aislado a una entidad sindrómica durante el transcurso del estudio.

6.2 Controles

Para el grupo control se recolectaron muestras sanguíneas de recién nacidos sanos, de la misma localización geográfica y etnicismo que los casos.

6.2.1 Criterios de selección

Criterios de inclusión

1. Recién nacidos, sin ningún tipo de malformación congénita, de la misma localización geográfica y etnicismo que el grupo de casos.

6.3 Descripción del procedimiento

Las muestras sanguíneas fueron transportadas al laboratorio del departamento de genética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), para su respectivo procesamiento, el cual consistió en la extracción de ADN mediante el método de extracción por sales. El material genético obtenido fue almacenado a una temperatura de -70°C hasta realizar la genotipificación de variantes.

La genotipificación de variantes en los genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *TCNII* y *MTHFD1* se llevó a cabo utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, mediante el uso de sondas "TaqMan" diseñadas específicamente para la localización de las variantes. En el caso de las variantes de *TYMS* y *DHFR*, que corresponden a deleciones y repeticiones de pb, se utilizó PCR de punto final, el producto fue sometido a electroforesis en geles de agarosa al 3%. La presencia de deleciones y repeticiones fue determinada mediante la comparación de pesos moleculares de los fragmentos resultantes. Finalmente para determinar la presencia de la variante G>C de *TYMS*, se utilizó la técnica de PCR-RFLP, donde se amplificó mediante el método de PCR de punto final el fragmento correspondiente al alelo de 3 repeticiones, para posteriormente someterlo a un proceso de digestión con la enzima de restricción *HaeII* a 37°C durante 3 horas. El producto de la digestión fue verificado por medio de una electroforesis en geles de agarosa al 3%, en donde por medio de la comparación de pesos moleculares, de los fragmentos obtenidos, se determinó la presencia de la variante.

6.4 Variantes a analizar

Las variantes analizadas fueron las siguientes: C677T, A1298C del gen Metilen Tetrahydrofolato Reductasa (*MTHFR*). A2756G del gen Metionina Sintetasa (*MTR*). A66G del gen Metionina Sintetasa Reductasa (*MTRR*). G1958A del gen Metil Tetrahydrofolato Deshidrogenasa (*MTHFD1*). C776G del transportador de transcobalamina (*TCNII*). Delección de 19 pb del gen Dihydrofolato Reductasa (*DHFR*). Repetición de 28pb y 3RG>C del gen Timidilato Sintetasa (*TYMS*).

6.5 Métodos de laboratorio

6.5.1 Extracción de ADN en sangre periférica por método de sales

- 1.- Se homogenizó la muestra de sangre periférica recolectada, y se repartieron 700 µl de sangre en 4 tubos de 1.5 ml.
- 2.- Se agregaron 500 µl de TTS y se agitó manualmente. Posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm durante 2 minutos.
- 3.- Terminado el centrifugado, el sobrenadante se desechó cuidadosamente. El sedimento del fondo fue lavado con 1 ml de TTS y fue sometido a centrifugación por 2 minutos a 14 000 rpm.
Este paso se repitió 2 veces más, hasta que el sedimento tomo un color blanco o transparente.
- 4.- Se decantó el sobrenadante del último lavado y se resuspendió el sedimento en 570 µl de NaCl 5 mM.
- 5.- Se adicionaron 30 µl de SDS al 10% y la mezcla se homogenizó por 30 segundos en el agitador vortex.

- 6.- Posteriormente se añadieron 200 μ l de NaCl saturado, se agitó en el vortex por 30 segundos y se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min.
- 7.- Se recolectó el sobrenadante y se lavó con 500 μ l de Cloroformo-alcohol isoamílico 49:1. Se agitó vigorosamente, para después ser centrifugado a 14 000 rpm durante 10 min.
- 8.- La fase superior, resultante del centrifugado, se transfirió a un tubo cónico de 15 ml con 6ml de etanol absoluto frío y se almacenó a -20°C durante 2 horas, con el fin de obtener un precipitado, el cual contiene el ADN.
- 9.- El botón de ADN se lavó con 300 μ l de etanol al 70% y se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min.
- 10.- El etanol se decantó y el ADN se dejó secar a temperatura ambiente.
- 11.- Una vez seco el ADN se resuspendió en 300 μ l de agua.

6.5.2 Cuantificación de ADN

La cuantificación se realizó por densitometría en un espectrofotómetro (Nanodrop) a una longitud de onda de 260 nm para ácidos nucleicos y 280 para proteínas, el factor de las lecturas a 260/280 nm ≥ 1.8 corresponde a un ADN libre de proteínas. Gracias a esta medición se logró conocer la concentración inicial de las muestras en análisis, de esta manera se pudo realizar una dilución a cada una de ellas para llevarlas a una concentración de trabajo de 5ng/ μ l.

6.5.3 Genotipificación de las variantes alélicas por medio de PCR en tiempo

real

Para la detección de variantes en los genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *MTHFD1* y *TCN2* se utilizó la técnica de PCR en tiempo real, a través de sondas TaqMan, utilizando el equipo StepOnePlus de Applied BioSystems®. La secuencia de las sondas utilizadas se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Modelo y secuencia de sondas utilizadas para la genotipificación de las variantes *MTHFR C667T*, *A1298C*, *MTR A2756G*, *MTRR A66G*, *MTHFD1 G1958A*, *TCNII C776G*.

Variante	Sonda	Secuencia
<i>MTHFR</i> <i>C667T</i>	C__1202883_20	GAAAAGCTGCGTGATGATGAAATCG[G/A]CTCCCGCAGACA CCTTCTCCTTCAA
<i>MTHFR</i> <i>A1298C</i>	C___850486_20	AAGAACGAAGACTTCAAAGACACTT[G/T]CTTCACTGGTCAG CTCCTCCCCCA
<i>MTR</i> <i>A2756G</i>	C__12005959_10	GAAGAATATGAAGATATTAGACAGG[A/G]CCATTATGAGTCT CTCAAGGTAAGT
<i>MTRR</i> <i>A66G</i>	C__3068176_10	AGGCAAAGGCCATCGCAGAAGAAAT[A/G]TGTGAGCAAGCT GTGGTACATGGAT
<i>MTHFD1</i> <i>G1958A</i>	C__1376137_10	GGCAATTCCTCCATCATTGCAGACC[A/G]GATCGCACTCAA GCTTGTTGGCCCA
<i>TCNII</i> <i>C776G</i>	C___325467_10	CAGTTCCTCATGACTTCCCCCATGC[C/G]TGGGGCAGAACT GGGAACAGCATGT

Preparación de la mezcla de reacción:

Se preparó la mezcla para la reacción de PCR con los siguientes reactivos:

- Agua libre de ADNAsas
- Sonda a una concentración 40X (ABI/No. de Part: 4351379)

- Genotyping Master Mix (ABI frasco de 10-ml/No de Part 4371355) o Type-it Fast SNP Probe PCR Kit (Qiagen/ No. Cat 206045)

Las concentraciones y cantidades necesarias para la mezcla de amplificación se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Reactivos y concentraciones utilizadas para la preparación de la mezcla de reacción, según el protocolo de PCR en tiempo real.

Reactivo	Concentración	Cantidad en μl para 1 reacción de 10 μl	Cantidad en μl para 105 reacciones de 10 μl
Master Mix	2X	3.50	367.50
Sonda	40X	0.09	9.50
Agua		3.41	359.10

Preparación de placa de reacción

- 1.- Se realizó un mapa de muestras en la cuadrícula de 12X8 para genotipificación de SNPs
- 2.- Se aplicó a cada pozo 3 μl de ADN a una concentración de 5 ng/ μl .
- 3.- Se colocaron 130 μl de la mezcla de reacción en tiras de 8 tubos de PCR.
- 4.- Se repartió con pipeta multicanal 7 μl de mezcla de reacción para cada pozo.
- 5.- Se cubrió la placa con adhesivo óptico.
- 6.- Se verificó no dejar burbujas y que toda la mezcla de reacción permaneciera en el fondo.

Las condiciones de amplificación se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3. Descripción del programa de amplificación utilizado para el protocolo de genotipificación por PCR en tiempo real.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	60°C	3 min
2	95°C	10 min
3	95°C	15 seg
4	60°C	1 min con lectura de fluorescencia
5	Repetir 39 veces más los pasos 3-4	
6	60°C	30 seg con lectura de fluorescencia

6.5.4 PCR y Electroforesis

Para la genotipificación de las variantes en los genes *DHFR* y *TYMS* se utilizó la técnica de PCR de punto final, seguida por una electroforesis en geles de agarosa al 3%. Para la variante 3G>C se realizó una digestión con la enzima HaeIII, para posteriormente corroborar la presencia del polimorfismo en una electroforesis en gel de agarosa al 3%. La secuencia de los oligonucleótidos que se emplearon para la genotipificación de estas variantes se describe en la tabla 4.

Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados como cebadores para las variantes TYMS Rep28pb y DHFR Del19pb.

Variante	Secuencia
TYMS	F: GTGGCTCCTGCGTTTCCCC
Rep28pb	R: GCTCCGAGCCGGCCACAGGCATGGCG
DHFR	F1: CCACGGTCGGGGTACCTGGG
Del19pb	F2: ACGGTCGGGGTGGCCGACTC
	R: AAAAGGGGAATCCAGTCGG

6.5.4.1 PCR de punto final

Preparación de la mezcla de reacción.

Para la preparación de la mezcla, de la reacción de amplificación, se utilizaron los reactivos detallados en la tabla 5.

Tabla 5. Reactivos, concentraciones y cantidades utilizadas para la preparación de la mezcla de reacción, según el protocolo de PCR de punto final.

Reactivo	Concentración	Cantidad de μl para una reacción de 25 μl
Flexi Buffer Green Go Taq Promega®	5X	5.00
MgCl ₂ Promega®	25 mM	1.50
PCR Nucleotide Mix Promega®	10mM	0.50
DNA Polimerasa Go Taq Flexi Promega®	5U/ μl	0.20
Primer F	10 μM	0.25
Primer R	10 μM	0.25
H ₂ O		14.30

Preparación de la reacción

- 1.- Se realizó un mapa registro de las muestras que serán colocadas en cada pozo de la placa.
- 2.- Se aplicó a cada pozo 3 μl de ADN a una concentración de 5 ng/ μl .
- 3.- Se colocaron 23 μl de la mezcla de reacción a cada pozo de la placa.
- 5.- Las placas fueron tapadas herméticamente con sus tapas correspondientes, para evitar la evaporación y pérdida de la reacción.
- 6.- Las placas fueron revisadas, evitando dejar burbujas y asegurándose que toda la mezcla de reacción permaneciera en el fondo.

Las condiciones de amplificación para cada gen se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 6. Descripción de los programas de amplificación usados en el protocolo de genotipificación por PCR de punto final, para las variantes de *TYMS* rep28pb y *DHFR* del19pb.

<i>TYMS</i> rep28pb			<i>DHFR</i> del19pb		
Paso	Temperatura	Tiempo	Paso	Temperatura	Tiempo
1	95°C	2 min	1	95°C	2 min
2	95°C	30 seg	2	95°C	30 seg
3	71.4°C*	30 seg	3	62.7°C*	30 seg
4	72°C	30 seg	4	72°C	30 seg
5	Repetir desde paso 2	14 veces	5	Repetir desde paso 2	14 veces
6	95°C	30 seg	6	95°C	30 seg
7	64.4°C	30 seg	7	55.7°C	30 seg
8	72°C	30 seg	8	72°C	30 seg
9	Repetir desde paso 6	23 veces	9	Repetir desde paso 6	23 veces
10	72°C	5 min	10	72°C	5 min

*Esta temperatura disminuye 0.5°C en cada ciclo.

6.5.4.2 Electroforesis

Para determinar la presencia de las variantes del19 de *DHFR* y Rep28pb de *TYMS*, se sometió el producto amplificado por PCR, a una electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio.

Para la variante del19pb de *DHFR*, se observó que el genotipo homocigoto silvestre presenta una sola banda de 111 pb, el genotipo heterocigoto presenta dos bandas, una de 111 pb y la segunda de 92 pb, mientras que el genotipo homocigoto a la delección presenta una sola banda de 92 pb (Figura 15).

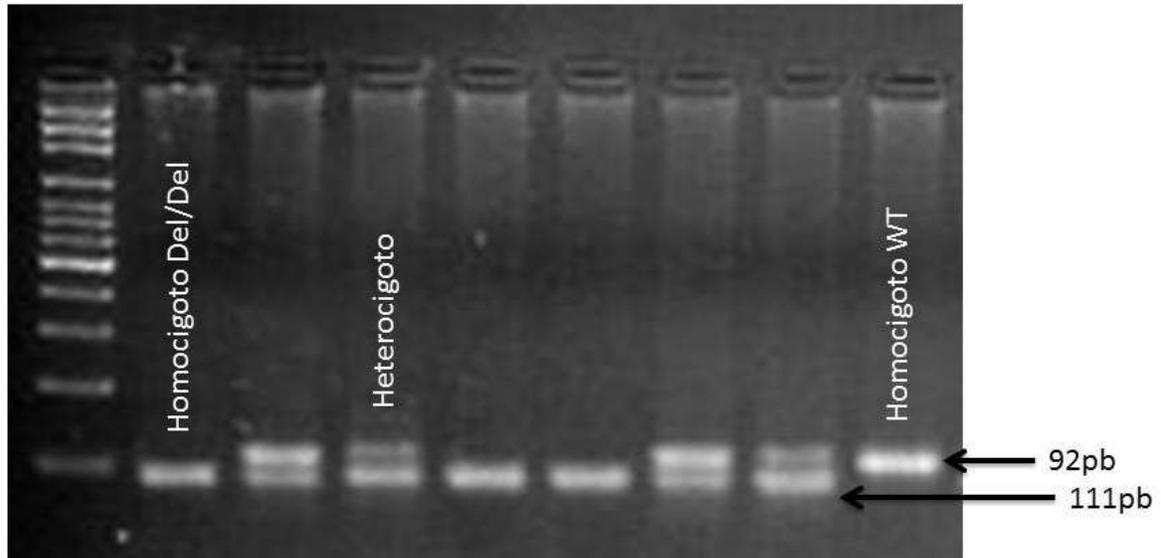


Figura 15. Interpretación de los resultados esperados para la genotipificación de la variante *DHFR* del 19pb a través de la clasificación de bandas, respecto a su peso molecular, por electroforesis en geles de agarosa al 3%.

Por su parte la variante Rep28pb del gen *TYMS*, mostró una banda con un peso molecular de 210pb para el alelo de 2 repeticiones, mientras que el alelo correspondiente a 3 repeticiones producía una banda con un peso molecular de 238pb (Figura 16).

6.5.5 Identificación de la variante 3G>C *TYMS*

Para la genotipificación de esta variante, se sometió a la técnica RFLP, con la enzima *HaeIII*, el producto amplificado de *TYMS*, generando una mezcla de 20µl totales, que incluyen 15µl del amplificado, más 5µl de la mezcla de digestión. La concentración y cantidad de cada reactivo utilizado en esta mezcla de digestión se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7. Reactivos, concentraciones y cantidades utilizadas para la preparación de la mezcla de digestión, en el protocolo de identificación de la variante G>C del gen TYMS.

Reactivo	Concentración	Cantidad de μ l para reacción
Buffer C Promega	10X	1.5
Enzima Hae III Promega	10U/ μ l	1
Albumina Bovina Sérica Promega	10mg/ml	0.2
H2O		2.8

Electroforesis

El producto de la digestión fue separado por electroforesis en un gel de agarosa al 3%. Para el alelo G de la variante se observaron bandas de 12, 28, 44, 47 y 66 pb, mientras que el alelo C produce bandas de 12, 44 47 y 94 pb (Figura 17).

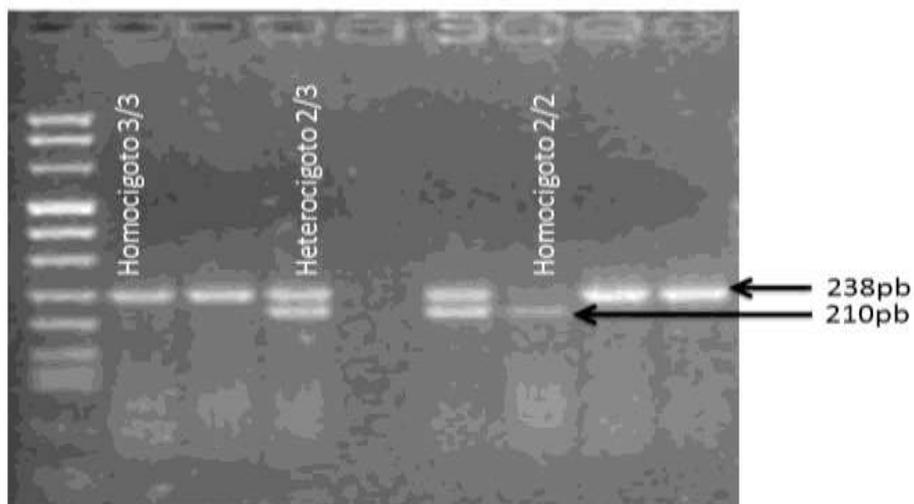


Figura 16. Interpretación de genotipos para la variante *TYMS* rep28pb, a través de discriminación de bandas, respecto a su peso molecular, por electroforesis en geles de agarosa al 3%.

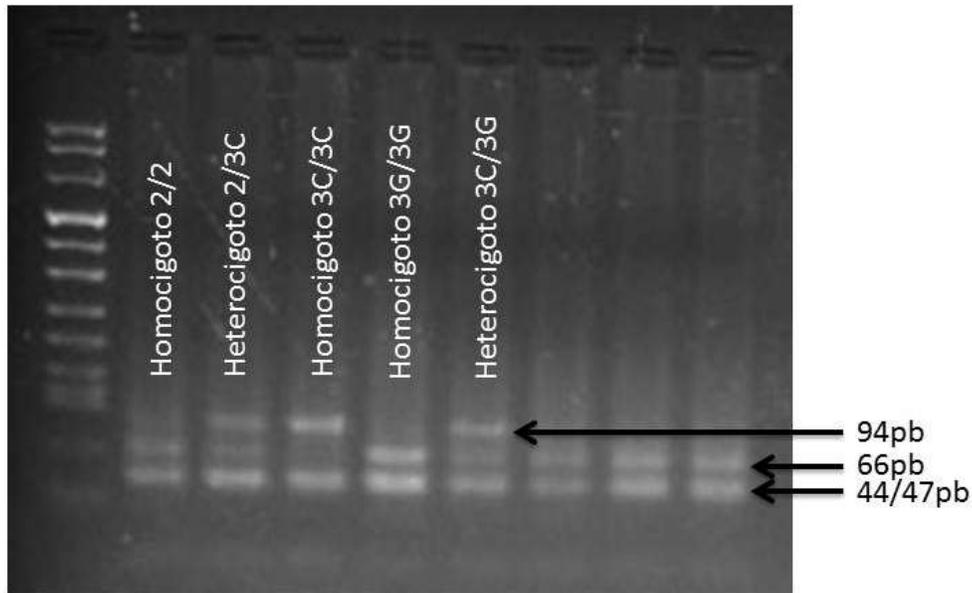


Figura 17. Interpretación de genotipos para la variante *TYMS* 3G>C, a través de la separación de bandas, del producto de la digestión con la enzima Hae III, por medio de electroforesis en geles de agarosa al 3%.

6.6 Análisis estadístico

Después de genotipificar la totalidad de la población en estudio, se procedió a realizar el cálculo de frecuencias alélicas y genotípicas de cada una de las variantes.

6.6.1 Comparación de frecuencias genotípicas

Se comparó, mediante la prueba de χ^2 o la Prueba Exacta de Fisher (PEF), las frecuencias de los genotipos homocigotos de la población en estudio con las frecuencias del grupo control, debido a que son estos genotipos los que tienen un mayor efecto sobre el producto codificado.

Esta comparación se realizó con el fin de observar si existe, en alguna de las variantes del metabolismo de los folatos, una diferencia estadísticamente significativa entre la frecuencia genotípica de los dos grupos en estudio.

Debido a las múltiples comparaciones realizadas durante el estudio, se realizó la corrección de Bonferroni, dando como resultado, que para determinar la existencia de una diferencia estadísticamente significativa, entre las frecuencias comparadas, se tomara un nivel de significancia menor a 0.001.

6.6.2 Prueba de desequilibrio de transmisión (TDT)

Para determinar si existe una transmisión de tipo preferencial, de alguno de los alelos en estudio, se realizó el análisis de desequilibrio de transmisión. Para evitar asociaciones espurias, debido a las múltiples comparaciones realizadas, el valor de significancia se corrigió por medio de la corrección de Bonferroni, por lo que se tomó en cuenta un nivel de significancia menor a 0.001.

6.6.3 Correlación fenotipo-genotipo

Para evaluar la posible existencia de una correlación fenotipo-genotipo, los pacientes con MMC fueron agrupados dependiendo de la localización del MMC en MMC Torácico, Toracolumbar, Lumbar, Lumbosacro y Sacro, para posteriormente comparar las frecuencias genotípicas entre los grupos y determinar si la presencia de alguna de estas variantes se presenta de manera característica en un fenotipo determinado. Tomando como criterio la altura de la lesión de MMC, se realizó una categorización de gravedad para los diferentes fenotipos, siendo catalogados

como fenotipos de alta gravedad aquellos cuya lesión se localiza en las vértebras torácicas (Torácico y Toracolumbar) y de menor gravedad los fenotipos que afectan las vértebras lumbares y sacras (Lumbar, Lumbosacro y Sacro), esto con el fin de comparar las frecuencias genotípicas obtenidas entre estos grupos, además del grupo control, para así determinar si alguna de las variantes en estudio representa un factor de riesgo ligado al desarrollo de las formas más graves de MMC.

6.6.4 Interacción génica

Para determinar la presencia de interacción entre las variantes analizadas, se realizó el análisis de reducción de dimensionalidad multifactorial (MDR). Todas las combinaciones posibles, de uno a tres polimorfismos, fueron analizadas con la intención de encontrar alguna interacción que represente un incremento en el riesgo de MMC.

La significancia estadística fue evaluada usando un análisis de permutación para comparar la precisión de prueba (TA) observada, con la esperada, bajo la hipótesis nula (no asociación). Obteniendo que el valor de significancia para este análisis es $TA=0.60$.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de frecuencias genotípicas

Después de genotipificar 250 tríos, compuestos por individuos con mielomeningocele (MMC) y sus progenitores, se obtuvieron las frecuencias genotípicas y alélicas mostradas en la tabla 8.

Tabla 8. Frecuencias alélicas y genotípicas, para cada una de las variantes analizadas, de los individuos que conforman los tríos familiares en estudio.

Variante	Casos (%)	Madres (%)	Padres (%)
<i>MTHFR C667T</i>			
CC	46 (18.40)	60 (24.00)	59 (23.60)
CT	129 (51.60)	119 (47.60)	109 (43.60)
TT	75 (30.00)	71 (28.40)	82 (32.80)
Alelo C	0.44	0.48	0.45
Alelo T	0.56	0.52	0.55
<i>MTHFR A1298C</i>			
AA	187 (74.80)	187 (74.80)	185 (74.00)
AC	61 (24.40)	57 (22.80)	54 (21.60)
CC	2 (0.80)	6 (2.40)	11 (4.40)
Alelo A	0.87	0.86	0.85
Alelo C	0.13	0.14	0.15
<i>MTR A2756G</i>			
AA	156 (62.40)	146 (58.40)	153 (61.20)
AG	87 (34.80)	96 (38.40)	83 (33.20)
GG	7 (2.80)	8 (3.20)	14 (5.60)
Alelo A	0.80	0.78	0.78
Alelo G	0.20	0.22	0.22
<i>MTRR A66G</i>			
AA	172 (68.80)	168 (67.20)	159 (63.60)
AG	70 (28.00)	70 (28.00)	79 (31.60)
GG	8 (3.20)	12 (4.80)	12 (4.80)
Alelo A	0.83	0.81	0.79
Alelo G	0.17	0.19	0.21

Variante	Casos (%)	Madres (%)	Padres (%)
<i>MTHFD1 G1958A</i>			
GG	38 (15.20)	39 (15.60)	34 (13.60)
GA	113 (45.20)	114 (45.60)	120 (48.00)
AA	99 (39.60)	97 (38.80)	96 (38.40)
Alelo G	0.38	0.38	0.38
Alelo A	0.62	0.62	0.62
<i>TCNIIIC776G</i>			
CC	112 (44.80)	130 (52.00)	115 (46.00)
CG	113 (45.20)	96 (38.40)	102 (40.80)
GG	25 (10.00)	24 (9.60)	33 (13.20)
Alelo C	0.67	0.71	0.66
Alelo G	0.33	0.29	0.34
<i>DHFR Del19pb</i>			
1/1	30 (12.10)	24 (9.68)	36 (14.52)
½	145 (58.47)	149 (60.08)	135 (54.44)
2/2	73 (29.44)	75 (30.24)	77 (31.05)
Alelo 1	0.41	0.40	0.42
Alelo 2	0.59	0.60	0.58
<i>TYMS Rep28pb G>C</i>			
2/2	35 (14.11)	37 (14.92)	32 (12.90)
2/3C	100 (40.32)	96 (38.71)	94 (37.90)
2/3G	40 (16.13)	48 (19.35)	50 (20.16)
3C/3G	30 (12.10)	28 (11.29)	22 (8.87)
3C/3C	34 (13.71)	30 (12.10)	44 (17.74)
3G/3G	9 (3.63)	9 (3.63)	6 (2.42)
Alelo 2	0.42	0.44	0.42
Alelo 3C	0.40	0.37	0.41
Alelo 3G	0.18	0.19	0.17

Posteriormente se realizó la genotipificación del grupo control, conformado por recién nacidos sanos, de la misma localización geográfica que los individuos con MMC, con el fin de realizar una comparación entre las frecuencias genotípicas de

ambos grupos. A su vez se comprobó que las poblaciones se encontraran en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 9).

Posteriormente se realizó la comparación de frecuencias genotípicas entre los individuos afectados con MMC y el grupo control. Solo se compararon las frecuencias genotípicas correspondientes a los genotipos homocigotos de cada variante, debido a que estos genotipos son los más contrastantes con respecto al producto codificado. Este análisis no mostro ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias genotípicas de casos y controles (Tabla 9).

La comparación de frecuencias para las variantes DHFR Del19pb y TYMS Rep28pbG>C no pudo realizarse, debido a que, la calidad de las muestras del grupo control, no cumplia con los estándares adecuados para su genotipificación, por medio de la metodología planteada.

Tabla 9. Frecuencias genotípicas, valor del equilibrio de Hardy-Weinberg y resultado de la comparación de frecuencias entre casos y controles.

Variante	Genotipos						HWE P Casos/Controles	P
	Casos (%)			Controles (%)				
	WT	HT	MT	WT	HT	MT		
<i>MTHFR C667T</i>	46(18.40)	129(51.60)	75(30.00)	47(18.80)	128(51.20)	75 (30.00)	0.46/0.55	0.93
<i>MTHFR A1298C</i>	187(74.80)	61(24.40)	2(0.80)	186(74.40)	59(23.60)	5(2.00)	0.21/0.89	0.26
<i>MTR A2576G</i>	156(62.40)	87(34.80)	7(2.80)	168(67.20)	69(27.60)	13(5.20)	0.21/0.10	0.25
<i>MTRR A66G</i>	172(68.80)	70(28.00)	8(3.20)	167(66.80)	68(27.20)	15(6.00)	0.79/0.03	0.14
<i>MTHFD1 G1958A</i>	38(15.20)	113(45.20)	99(39.60)	27(10.80)	121(48.40)	102(40.80)	0.54/0.31	0.20
<i>TCNII C776G</i>	112(44.80)	113(45.20)	25(10.00)	129(51.60)	107(42.80)	14(5.60)	0.65/0.17	0.04

WT. Homocigoto silvestre

HT. Heterocigoto

MT. Homocigoto mutante

HWE P. Valor estadístico del equilibrio de Hardy-Weinberg.

P. Valor estadístico de la comparación de las frecuencias genotípicas, por χ^2 o PEF, entre casos y controles.

Debido a los reportes que señalan al heterocigoto compuesto, de las variantes *MTHFR C667T +A1298C*, como un factor de riesgo para MMC, se realizó el cálculo de frecuencias para este genotipo en la población en estudio (Tabla 10).

Tabla 10. Frecuencia del alelo compuesto *MTHFR* C667T - A1298C en los tríos familiares, así como en el grupo control.

<i>MTHFR</i> C667T + A1298C	Grupos de estudio			
	Casos (%)	Controles (%)	Madres (%)	Padres (%)
CC + AA	21 (8.40)	20 (8.00)	28 (11.20)	23 (9.20)
CC + AC	23 (9.20)	24 (9.60)	26 (10.40)	25 (10.00)
CC + CC	2 (0.80)	3 (1.20)	6 (2.40)	11 (4.40)
CT + AA	91 (36.40)	94 (37.60)	88 (35.20)	80 (32.00)
CT + AC	38 (15.20)	33 (13.20)	31 (12.40)	29 (11.60)
CT + CC	0 (0.00)	1 (0.40)	0 (0.00)	0 (0.00)
TT + AA	75 (30.00)	72 (28.80)	71 (28.40)	82 (32.80)
TT + AC	0 (0.00)	2 (0.80)	0 (0.00)	0 (0.00)
TT + CC	0 (0.00)	1 (0.40)	0 (0.00)	0 (0.00)
Total	250 (100.00)	250 (100.00)	250 (100.00)	250 (100.00)

De igual forma, se calcularon las frecuencias para el genotipo compuesto por las variantes *MTR* A2756C y *MTRR* A66G, debido a que se reporta un incremento en el riesgo para MMC, cuando estas variantes se encuentran en un mismo individuo (Tabla 11).

Para determinar una posible asociación entre estos genotipos compuestos y el riesgo para MMC, se compararon las frecuencias del grupo de casos, con su respectivo grupo control. Para la comparación por χ^2 se tomó como genotipos de riesgo (expuestos) aquellos individuos que tuvieran ambas variantes, ya sea en estado heterocigoto u homocigoto, mientras que el grupo de no expuestos fue conformado por individuos que presentaron en sus genotipos solo una o ninguna de las variantes analizadas. Mediante este análisis no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa. Los resultados de esta comparación se muestran en la tabla 12.

Tabla 11. Frecuencia del alelo compuesto *MTR* A2756C -*MTRR* A66G en los tríos familiares, así como en el grupo control.

MTR + MTRR A2756G + A66G	Grupos de estudio			
	Casos (%)	Controles (%)	Madres (%)	Padres (%)
AA + AA	106 (42.40)	111(44.40)	100(40.00)	98(39.20)
AA + AC	47(18.80)	47(18.80)	39(15.60)	48(19.20)
AA + CC	3(1.20)	10(4.00)	7(2.80)	7(2.80)
AC + AA	60(24.00)	49(19.60)	63(25.20)	53(21.20)
AC + AC	22(8.80)	16(6.40)	28(11.20)	26(10.40)
AC + CC	5(2.00)	4(1.60)	5(2.00)	4(1.60)
CC + AA	6(2.40)	7(2.80)	5(2.00)	8(3.20)
CC + AC	1(0.40)	5(2.00)	3(1.20)	5(2.00)
CC + CC	0(0.00)	1(0.40)	0(0.00)	1(0.40)
Total	250(100.00)	250(100.00)	250(100.00)	250(100.00)

Tabla 12. Resultados de la comparación de frecuencias por χ^2 entre el grupo de casos y controles para los genotipos compuestos por las variantes *MTHFR* C667T-A1298C y *MTR* A2756G-*MTRR* A66G.

Genotipos Compuestos	Casos		Controles		χ^2	Odds Ratio	P
	Ex	NoEx	Ex	NoEx			
<i>MTHFR</i> C667T-A1298C	38	212	37	213	0.02	1.03 (0.61-1.74)	0.900
<i>MTR – MTRR</i> A2756C-A66G	28	222	26	224	0.08	1.08 (0.59-1.99)	0.773

Ex: Individuos expuestos

NoEx: Individuos no expuestos

7.2 Correlación fenotipo-genotipo

Con el fin de determinar una posible relación entre el genotipo y la altura de la lesión del MMC, se clasificaron los individuos en cinco grupos: Torácico, Toracolumbar, Lumbar, Lumbosacro y Sacro, con respecto a la localización de la lesión, a su vez, se les otorga a estos grupos una categorización de riesgo, siendo fenotipos de MMC Alto, aquellos donde la lesión involucra las vértebras torácicas (Torácico y Toracolumbar), mientras que se catalogó como fenotipos de MMC

Medio, aquellos cuya afección radica en las vértebras lumbares (Lumbar y Lumbosacro), finalmente se determinó la creación de un tercer grupo, conformado por los fenotipos de MMC Sacro . Esta clasificación se realizó con la finalidad de determinar si existe una relación entre la presencia de ciertas variantes y el riesgo de desarrollar una forma más grave de MMC.

Las frecuencias alélicas y genotípicas para cada una de las variantes, en los diferentes genotipos se muestran en la tabla 13.

En la comparación de frecuencias genotípicas, entre los diferentes fenotipos y el grupo control, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa (Tabla 14), así como tampoco en la comparación realizada entre los rangos de gravedad.

Se compararon entre si los diferentes rangos formados (MMC Alto, MMC Medio y MMC Sacro), observándose dos valores interesantes al comparar las frecuencias de los grupos MMC Alto y MMC Medio, correspondientes a las variantes *MTHFR* C667T ($\chi^2= 7.52$ P= 0.006 OR= 3.34 IC95%= 1.29-9.15) y *TYMS* Rep28pb ($\chi^2= 8.16$ P= 0.004 OR= 5.00 IC95%= 1.42-19.85) , que a pesar de no alcanzar una diferencia estadísticamente significativa, muestran una clara tendencia hacia dicho valor. (Tabla 15).

Al realizar las comparaciones de los grupos de riesgo con el respectivo grupo control, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las comparaciones (Tabla 16).

A manera de ejercicio se realizó una comparación entre los grupos de riesgo, así como con el grupo control, comparando los alelos de las frecuencias de los

genotipos homocigotos (Tabla 17), observándose una tendencia hacia el nivel de significancia para diferentes variantes, esto nos indica que de realizarse un estudio con un mayor tamaño de muestra, será posible encontrar asociaciones que no son detectadas con el tamaño poblacional de este estudio.

Tabla 13. Frecuencias alélicas y genotípicas de los diferentes fenotipos que presentan los afectados por MMC

Variantes	Fenotipo (%)				
	Torácico	Toracolumbar	Lumbar	Lumbosacro	Sacro
<i>MTHFR C667T</i>					
CC	4(8.33)	5(13.51)	14(20.59)	19(27.14)	4(14.81)
CT	28(58.33)	17(45.95)	39(57.35)	32(45.71)	13(48.15)
TT	16(33.33)	15(40.54)	15(22.06)	19(27.14)	10(37.04)
Alelo C	0.38	0.36	0.49	0.50	0.39
Alelo T	0.63	0.64	0.51	0.50	0.61
<i>A1298C</i>					
AA	38(79.17)	32(86.49)	47(69.12)	49(70.00)	21(77.78)
AC	10(20.83)	5(13.51)	19(27.94)	21(30.00)	6(22.22)
CC	0(0.00)	0(0.00)	2(2.94)	0(0.00)	0(0.00)
Alelo A	0.90	0.93	0.83	0.85	0.89
Alelo C	0.10	0.07	0.17	0.15	0.11
<i>MTRR A66G</i>					
AA	29(60.42)	30(81.08)	45(66.18)	49(70.00)	19(70.37)
AG	17(35.42)	6(16.22)	22(32.35)	17(24.29)	8(29.63)
GG	2(4.17)	1(2.70)	1(1.47)	4(5.71)	0(0.00)
Alelo A	0.78	0.89	0.82	0.82	0.85
Alelo G	0.22	0.11	0.18	0.18	0.15
<i>MTR A2576G</i>					
AA	27(56.25)	25(67.57)	42(61.76)	44(62.86)	18(66.67)
AG	17(35.42)	12(32.43)	25(36.76)	25(35.71)	8(29.63)
GG	4(8.33)	0(0.00)	1(1.47)	1(1.43)	1(3.70)
Alelo A	0.74	0.84	0.80	0.81	0.81
Alelo G	0.26	0.16	0.20	0.19	0.19

Variantes	Fenotipo (%)				
	Torácico	Toracolumbar	Lumbar	Lumbosacro	Sacro
<i>MTHFD1</i> G1958A					
GG	6(12.50)	2(5.41)	13(19.12)	13(18.57)	4(14.81)
GA	25(52.08)	17(45.95)	26(38.24)	34(48.57)	11(40.74)
AA	17(35.42)	18(48.65)	29(42.65)	23(32.86)	12(44.44)
Alelo G	0.39	0.28	0.38	0.43	0.35
Alelo A	0.61	0.72	0.62	0.57	0.65
<i>TCN2</i> C776G					
CC	20(41.67)	18(48.65)	31(45.59)	29(41.43)	14(51.85)
CG	21(43.75)	16(43.24)	34(50.00)	32(45.71)	10(37.04)
GG	7(14.58)	3(8.11)	3(4.41)	9(12.86)	3(11.11)
Alelo C	0.64	0.70	0.71	0.64	0.70
Alelo G	0.36	0.30	0.29	0.36	0.30
<i>DHFR</i> Del19pb					
1/1	3(6.25)	5(13.51)	11(16.67)	7(10.00)	4(14.81)
½	36(75.00)	17(45.95)	34(51.52)	38(54.29)	20(74.07)
2/2	9(18.75)	15(40.54)	21(31.82)	25(35.71)	3(11.11)
Alelo 1	0.44	0.36	0.42	0.37	0.52
Alelo 2	0.56	0.64	0.58	0.63	0.48
<i>TYMS</i> 3G>C					
2/2	1(2.08)	4(10.81)	13(19.70)	12(17.14)	5(18.52)
2/3C	22(45.83)	15(40.54)	29(43.94)	24(34.29)	10(37.04)
2/3G	12(25.00)	3(8.11)	10(15.15)	12(17.14)	3(11.11)
3C/3G	9(18.75)	0(0.00)	8(12.12)	9(12.86)	4(14.81)
3C/3C	2(4.17)	13(35.14)	2(3.03)	12(17.14)	5(18.52)
3G/3G	2(4.17)	2(5.41)	4(6.06)	1(1.43)	0(0.00)
Alelo 2	0.38	0.35	0.49	0.43	0.43
Alelo 3C	0.36	0.55	0.31	0.41	0.44
Alelo 3G	0.26	0.09	0.20	0.16	0.13

Tabla 14. Comparación de frecuencias genotípicas entre los diferentes fenotipos de MMC y el grupo control, para cada una de las variantes.

Variante	Genotipos (%)						P
	Casos			Controles			
<i>MTHFR</i> C667T	CC	CT	TT	CC	CT	TT	
Torácico	4(8.33)	28(58.33)	16(33.33)				0.109
Toracolumbar	5(13.51)	17(45.95)	15(40.54)				0.244
Lumbar	14(20.59)	39(57.35)	15(22.06)	47(18.80)	128(51.20)	75 (30.00)	0.336
Lumbosacro	19(27.14)	32(45.71)	19(27.14)				0.209
Sacro	4(14.81)	13(48.15)	10(37.04)				0.466
<i>MTHFR</i> A1298C	AA	AC	CC	AA	AC	CC	
Torácico	38(79.17)	10(20.83)	0(0.00)				
Toracolumbar	32(86.49)	5(13.51)	0(0.00)				
Lumbar	47(69.12)	19(27.94)	2(2.94)	186(74.40)	59(23.60)	5(2.00)	0.587
Lumbosacro	49(70.00)	21(30.00)	0(0.00)				
Sacro	21(77.78)	6(22.22)	0(0.00)				
<i>MTR</i> A2576G	AA	AG	GG	AA	AG	GG	
Torácico	27(56.25)	17(35.42)	4(8.33)				0.278
Toracolumbar	25(67.57)	12(32.43)	0(0.00)				
Lumbar	42(61.76)	25(36.76)	1(1.47)	168(67.20)	69(27.60)	13(5.20)	0.236
Lumbosacro	44(62.86)	25(35.71)	1(1.43)				0.216
Sacro	18(66.67)	8(29.63)	1(3.70)				0.755

Variante	Genotipos (%)						P
	Casos			Controles			
<i>MTRR</i> A66G	AA	AG	GG	AA	AG	GG	
Torácico	29(60.42)	17(35.42)	2(4.17)				0.733
Toracolumbar	30(81.08)	6(16.22)	1(2.70)				0.327
Lumbar	45(66.18)	22(32.35)	1(1.47)	167(66.80)	68(27.20)	15(6.00)	0.150
Lumbosacro	49(70.00)	17(24.29)	4(5.71)				0.870
Sacro	19(70.37)	8(29.63)	0(0.00)				
<i>MTHFD1</i> G1958A	GG	GA	AA	GG	GA	AA	
Torácico	6(12.50)	25(52.08)	17(35.42)				0.580
Toracolumbar	2(5.41)	17(45.95)	18(48.65)				0.250
Lumbar	13(19.12)	26(38.24)	29(42.65)	27(10.80)	121(48.40)	102(40.80)	0.182
Lumbosacro	13(18.57)	34(48.57)	23(32.86)				0.060
Sacro	4(14.81)	11(40.74)	12(44.44)				0.708
<i>TCNII</i> C776G	CC	CG	GG	CC	CG	GG	
Torácico	20(41.67)	21(43.75)	7(14.58)				0.019
Toracolumbar	18(48.65)	16(43.24)	3(8.11)				0.528
Lumbar	31(45.59)	34(50.00)	3(4.41)	129(51.60)	107(42.80)	14(5.60)	0.863
Lumbosacro	29(41.43)	32(45.71)	9(12.86)				0.022
Sacro	14(51.85)	10(37.04)	3(11.11)				0.320

P. Valor estadístico de la comparación de las frecuencias genotípicas, por χ^2 o PEF.

Tabla 15. Comparación de las frecuencias genotípicas entre los diferentes grupos de fenotipos.

Variante	Comparación	χ^2	P	OR	IC95%
<i>MTHFR C667T</i>	MMC Alto - MMC Medio	7.52	0.006	3.34	1.29 - 9.15
	MMC Alto – MMC Sacro	0.21	0.647	1.37	0.25 – 6.39
	MMC Medio – MMC Sacro	2.00	0.157	0.41	0.08 - 1.62
<i>MTR A2756G</i>	MMC Alto - MMC Medio	2.03	0.153	3.30	0.45 - 37.43
	MMC Alto – MMC Sacro	0.08	0.776	1.38	0.12 - 71.91
	MMC Medio – MMC Sacro	0.51	0.473	0.42	0.02 - 26.05
<i>MTRR A66G</i>	MMC Alto - MMC Medio	0.01	0.952	0.95	0.14 - 5.12
	MMC Alto – MMC Sacro	0.95	0.328	-	0.23*
	MMC Medio – MMC Sacro	1.00	0.316	-	0.25*
<i>MTHFD1 G1958A</i>	MMC Alto - MMC Medio	2.98	0.084	2.18	0.83 - 6.22
	MMC Alto – MMC Sacro	0.29	0.587	1.46	0.27 - 6.70
	MMC Medio – MMC Sacro	0.42	0.514	0.66	0.14 - 2.49
<i>TCNII C776G</i>	MMC Alto - MMC Medio	0.33	0.563	1.31	0.46–3.69
	MMC Alto – MMC Sacro	0.08	0.777	1.22	0.26 - 7.92
	MMC Medio – MMC Sacro	0.01	0.922	0.93	0.21 - 5.84
<i>DHFR del19pb</i>	MMC Alto - MMC Medio	0.11	0.745	1.17	0.41 - 3.59
	MMC Alto – MMC Sacro	2.79	0.095	4.00	0.52 - 32.21
	MMC Medio – MMC Sacro	2.48	0.115	3.41	0.51 - 25.12
<i>TYMS Rep28pb</i>	MMC Alto - MMC Medio	8.16	0.004	5.00	1.42 - 19.85
	MMC Alto – MMC Sacro	2.89	0.089	3.80	0.59 - 24.26
	MMC Medio – MMC Sacro	0.15	0.695	0.76	0.15–3.84
<i>TYMS G>C</i>	MMC Alto - MMC Medio	0.15	0.702	1.33	0.23 -8.17
	MMC Alto – MMC Sacro	1.26	0.261	0.00	0.00 -3.55*
	MMC Medio – MMC Sacro	1.66	0.197	0.00	0.00 -2.62*

P. Valor estadístico de la comparación de las frecuencias genotípicas, por χ^2 o PEF.

*No es posible establecer un intervalo de confianza exacto, debido a que existen en la comparación valores de 0.

Tabla 16. Comparación de frecuencias genotípicas entre fenotipos de riesgo y el grupo control.

Variante	Comparación	χ^2	P	OR	IC95%
<i>MTHFR C667T</i>	MMC Alto – Controles	3.42	0.064	2.16	0.90 - 5.60
	MMC Medio – Controles	2.04	0.153	0.65	0.34 - 1.23
	MMC Sacro – Controles	0.53	0.466	1.56	0.42 – 7.22
<i>MTR A2756G</i>	MMC Alto – Controles	0.01	0.992	0.99	0.22 - 3.40
	MMC Medio – Controles	2.71	0.099	0.30	0.03 - 1.38
	MMC Sacro – Controles	0.10	0.755	0.71	0.16 - 5.35
<i>MTRR A66G</i>	MMC Alto – Controles	0.52	0.473	1.70	0.25 – 9.01
	MMC Medio – Controles	0.81	0.367	1.77	0.40 - 7.91
	MMC Sacro – Controles	0.57	0.451	0.00	0.00 - 7.11*
<i>MTHFD1 G1958A</i>	MMC Alto – Controles	0.11	0.742	1.16	0.46 – 3.22
	MMC Medio – Controles	3.93	0.047	0.53	0.27 - 1.05
	MMC Sacro – Controles	0.14	0.708	0.79	0.22 - 3.65
<i>TCNII C776G</i>	MMC Alto – Controles	3.99	0.045	2.42	0.88 - 6.40
	MMC Medio – Controles	2.13	0.144	1.84	0.73 - 4.57
	MMC Sacro – Controles	0.99	0.320	1.97	0.32 - 8.37

P. Valor estadístico de la comparación de las frecuencias genotípicas, por χ^2 o PEF.

Tabla 17. Comparación de frecuencias genotípicas y de los alelos de los genotipos homocigotos entre los fenotipos de riesgo y el grupo control.

Variante	Comparación	χ^2	P	OR	IC95%
MTHFR C667T	MMC Alto - MMC Medio	15.04	0.0001	3.34	1.72 – 6.63
	MMC Alto- Controles	6.84	*0.0089	2.15	1.17 - 4.11
MTHFD1 G1958A	MMC Alto - MMC Medio	5.95	*0.0147	2.18	1.11 - 4.43
	MMC Medio - Controles	7.85	*0.0051	0.53	0.33 - 0.85
TCNII C776G	MMC Alto - Controles	7.98	*0.0047	2.42	1.21 - 4.73
DHFR del19pb	MMC Alto - MMC Sacro	5.57	*0.0183	4.00	1.01 - 16.03
	MMC Medio - MMC Sacro	4.97	*0.0258	3.41	0.95- 12.70
TYMS Rep28pb	MMC Alto- MMC Medio	16.31	0.0001	5.00	2.09 - 12.58
	MMC Alto- MMC Sacro	5.78	*0.0162	3.80	1.06 - 13.41

*A pesar de no alcanzar significancia estadística, la variante *MTR A2576G* muestra una clara tendencia de riesgo, para los fenotipos que involucran la región torácica.

7.3 Interacción génica

Al realizar un análisis exhaustivo con las 6 variantes involucradas, la prueba de MDR no mostró ningún resultado con nivel estadístico significativo (Tabla 18), por este motivo se realizó un análisis forzado con cada una de las combinaciones posibles que involucran de uno a cuatro variantes.

Tabla 18. Resultados del análisis MDR exhaustivo en casos y controles.

Modelo	Precisión de orientación	Precisión de prueba (TA)	CV Consistencia
<i>MTR</i> A2756C	0.5384	0.508	7/10
<i>MTRR</i> A66G, <i>MTHFD1</i> G1958A,	0.5756	0.508	5/10
<i>MTHFR</i> A1298C, <i>MTRR</i> A66G, <i>MTHFD1</i> G1958A	0.6120	0.524	4/10

Los resultados del análisis forzado mostraron 20 posibles interacciones que rodean el valor de significancia para este análisis (TA= 0.60) (Tabla 19).

Se observa que la variante *MTHFD1* G1958A se presenta en 14 interacciones, interactuando con una mayor frecuencia con las variantes *MTRR* A66G (9 interacciones), *MTHFR* A1298C (8 interacciones) y *TCNII* C776G (6 interacciones).

Las combinación de genotipos con un nivel cercano a la significancia que más se presentó fue: *MTHFR* A1298C - *MTRR* A66G- *MTHFD1* G1958A, presentándose en 4 ocasiones.

Tabla 19. Combinaciones de genotipos que mostraron interacciones cercanas a la significancia del análisis MDR forzado.

Combinaciones				TA	p	OR	IC
MTHFRA1298C	MTRA2756G			0.570	0.313	1.795	(1.250-2.576)
MTHFRA1298C	MTRRA66G			0.560	0.390	1.641	(0.528-5.092)
MTHFRA1298C	MTHFD1G1958A			0.564	0.361	1.688	(0.546-5.215)
MTRRA66G	MTHFD1G1958A			0.568	0.335	1.731	(0.564-5.308)
MTHFRC667T	MTRRA66G	MTHFD1G1958A		0.558	0.411	1.595	(0.521-4.880)
MTHFRC667T	MTRRA66G	TCNIIC776G		0.566	0.349	1.706	(0.555-5.240)
MTHFRA1298C	MTRA2756G	MTRRA66G		0.558	0.411	1.597	(0.521-4.890)
MTHFRA1298C	MTRA2756G	MTHFD1G1958A		0.582	0.224	2.077	(0.633-6.809)
MTHFRA1298C	MTRA2756G	TCNIIC776G		0.554	0.437	1.566	(0.503-4.871)
MTHFRA1298C	MTRRA66G	MTHFD1G1958A		0.582	0.246	1.939	(0.630-5.971)
MTRA2756G	MTRRA66G	MTHFD1G1958A		0.564	0.351	1.728	(0.544-5.484)
MTRA2756G	MTHFD1G1958A	TCNIIC776G		0.556	0.427	1.571	(0.513-4.806)
MTRRA66G	MTHFD1G1958A	TCNIIC776G		0.550	0.479	1.493	(0.490-4.553)
MTHFRC667T	MTHFRA1298C	MTRRA66G	MTHFD1G1958A	0.588	0.212	2.040	(0.660-6.302)
MTHFRC667T	MTHFRA1298C	MTHFD1G1958A	TCNIIC776G	0.568	0.336	1.729	(0.564-5.295)
MTHFRC667T	MTRA2756G	MTRRA66G	TCNIIC776G	0.602	0.113	2.488	(0.797-7.761)
MTHFRC667T	MTRRA66G	MTHFD1G1958A	TCNIIC776G	0.566	0.348	1.707	(0.555-5.248)
MTHFRA1298C	MTRA2756G	MTRRA66G	MTHFD1G1958A	0.568	0.331	1.747	(0.564-5.412)
MTHFRA1298C	MTRA2756G	MTHFD1G1958A	TCNIIC776G	0.574	0.293	1.823	(0.591-5.619)
MTHFRA1298C	MTRRA66G	MTHFD1G1958A	TCNIIC776G	0.602	0.146	2.315	(0.739-7.255)

Los resultados de todas las combinaciones analizadas se muestran en el Anexo I.

7.4 Análisis de desequilibrio de transmisión

La prueba de desequilibrio de transmisión fue realizada con el fin de determinar si existe una transmisión de tipo preferencial de alguno de los alelos en estudio.

Al analizar cada una de las variantes en estudio, no se encontraron resultados que indicaran la transmisión preferencial de alguno de los alelos (Tabla 20).

Tabla 20. Resultados del análisis de desequilibrio de transmisión para cada una de las variantes en estudio.

Variante	TI	χ^2	P
<i>MTHFR T667C</i>	228	2.53	0.11
<i>MTHFR A1298C</i>	111	2.02	0.15
<i>MTR A2576G</i>	179	2.46	0.11
<i>MTRR A66G</i>	149	4.19	0.04
<i>MTHFD1 G1958A</i>	234	0.01	0.89
<i>TCN2 C776G</i>	198	0.98	0.31
<i>DHFR del19</i>	284	0.12	0.72
<i>TYMS Repetidos</i>	287	0.17	0.68
<i>TYMS G>C</i>	338	0.26	0.87

TI: Transmisiones informativas.

χ^2 : Resultado del análisis de chi cuadrada.

P: Valor estadístico de la prueba de desequilibrio de transmisión.

De igual forma se realizó el análisis TDT para cada uno de los fenotipos de MMC que involucra el estudio (Tabla 21), sin encontrar un resultado estadísticamente significativo en ninguna de las comparaciones.

Tabla 21. Resultados del análisis de desequilibrio de transmisión de las variantes del metabolismo de los folatos para los fenotipos en estudio.

Variante	Fenotipo									
	Torácico		Toracolumbar		Lumbar		Lumbosacro		Sacro	
	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P
<i>MTHFR T667C</i>	1.52	0.21	0.03	0.86	0.69	0.40	0.60	0.43	0.66	0.41
<i>MTHFR A1298C</i>	2.00	0.15	1.66	0.19	0.29	0.59	1.52	0.21	0.00*	0.00*
<i>MTR A2576G</i>	2.00	0.15	0.80	0.37	1.52	0.21	3.50	0.06	0.22	0.63
<i>MTRR A66G</i>	0.12	0.72	2.33	0.12	0.75	0.38	3.76	0.05	0.09	0.76
<i>MTHFD1 G1958A</i>	0.21	0.64	0.61	0.43	0.13	0.70	0.05	0.81	0.14	0.70
<i>TCN2 C776G</i>	0.02	0.87	0.00	1.00	0.29	0.58	1.42	0.23	0.18	0.66
<i>DHFR del19</i>	0.01	0.90	0.02	0.87	0.12	0.72	0.00	1.00	2.31	0.12
<i>TYMS Repetidos</i>	0.05	0.80	2.77	0.09	0.11	0.73	1.38	0.23	0.12	0.72
<i>TYMS G>C</i>	0.90	0.63	6.56	0.04	0.11	0.94	1.69	0.42	0.82	0.66

χ^2 : Resultado del análisis de chi cuadrada.

P: Valor estadístico de la prueba de desequilibrio de transmisión.

*No pudo realizarse el análisis, debido a que no se presentaron las transmisiones informativas, mínimas requeridas.

8. DISCUSIÓN

En este estudio se analizaron 250 tríos familiares compuestos por un individuo afectado por MMC y sus progenitores. El análisis consistió en la genotipificación de los individuos para las variantes *MTHFR* C667T, A1298C, *MTRR* A66G, *MTR* A2576G, *MTHFD1* G1958A, *TCNII* C776G.

MTHFR C667T A1298C

En lo que corresponde a la variante *MTHFR* C667T, al genotipificar a los individuos con MMC, se obtuvieron las frecuencias de 18.40% 51.60% y 30.00% para los genotipos CC, CT y TT respectivamente, con una frecuencia alélica de 0.44 para el alelo C y 0.56 para el alelo T. Este resultado nos indica que la variante C667T presenta una alta frecuencia en la población en estudio, lo cual coincide con lo reportado por Mutchinick (1999), quien reportó en una población mestiza, conformada por 250 mujeres en edad reproductiva, reclutadas de nueve hospitales, localizados en diferentes estados de México, una frecuencia del genotipo 667TT del 34.8%, con una frecuencia alélica de 0.58 del alelo T. Considerando la alta prevalencia de DTN que se presenta en la población mexicana, además de las alteraciones bioquímicas y moleculares que tiene el genotipo TT sobre la enzima *MTHFR*, se podría suponer que la alta frecuencia de esta variante estaría relacionada con el riesgo a DTN en la población mexicana.

Al realizar la comparación de las frecuencias genotípicas, entre los individuos afectados por MMC y el grupo control, conformado por recién nacidos sanos, no se encontró diferencia estadística significativa, ya que el grupo control presentó

una frecuencia genotípica muy similar al grupo de casos (18.80% CC 30.00% TT). Este resultado nos indica que el genotipo 667TT, en el producto, no representa un factor de riesgo para MMC, lo cual resulta contrastante con lo reportado en otros estudios de distintas poblaciones, donde relacionan la presencia de la variante, tanto en el producto, como en la madre, con un incremento en el riesgo de DTN (Shaw et al. 1998, Christensen et al. 1999, Botto et al. 2000, Volcik et al. 2003, Vollset et al. 2005, Amorim et al. 2007, Shaw et al. 2009, Yan et al. 2012), así como también con los estudios realizados en población mexicana, en los cuales se señala que el genotipo 667TT representa un factor de riesgo para anencefalia (Blanco-Muñoz et al. 2007), además de modificar los niveles de homocisteína y folato en mujeres portadoras, lo cual representa un factor de riesgo para DTN (Lascaña et al. 2012). Las discrepancias encontradas con los estudios realizados en la población mexicana podrían deberse al tipo de DTN estudiado. Por lo que podríamos asumir que el genotipo homocigoto de esta variante es un factor de riesgo en la población mexicana para anencefalia, pero no para MMC.

Al analizar la frecuencia de la variante *MTHFR* C667T en relación a la altura de la lesión del MMC, se observó que la presencia de la variante C667T predomina en los casos de MMC Torácico y Toracolumbar (frecuencia alélica 0.63 y 0,64 respectivamente), siendo el fenotipo Toracolumbar el que presenta la mayor frecuencia del genotipo 667TT (40.54%). Al realizar la comparación de las frecuencias genotípicas entre los diferentes grupos de MMC y el grupo control, no se observó diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los casos, sin embargo, al comparar las frecuencia de la clasificación por gravedad se observó

un valor cercano a la diferencia estadística al comparar el grupo de MMC Alto, con MMC Medio ($\chi^2= 7.52$ P= 0.006 OR= 3.34 IC95%= 1.29-9.15). Este resultado nos indica la existencia de una posible relación entre la presencia del genotipo 667TT y el MMC en el área torácica, por lo que mediante estos resultados, es posible especular que la presencia del genotipo 667TT en el producto, representa un factor de riesgo para desarrollar las formas de MMC de mayor gravedad.

La variante *MTHFR* A1298C resultó ser muy poco frecuente en la población en estudio, presentando una frecuencia del alelo C de 0.13. Las frecuencias genotípicas observadas en los individuos afectados por MMC fueron 74.80%, 24.40% y 0.80% para los genotipos silvestre, heterocigoto y homocigoto mutante respectivamente. Esta frecuencia varía con la reportada por Guéant-Rodriguez, para la población mexicana, ya que en sus resultados se muestra una frecuencia del 2% para el genotipo 1298CC, con una frecuencia de 0.147 para el alelo C. Esta variación puede explicarse debido a las diferencias entre las poblaciones en estudio, ya que mientras la población utilizada para el estudio de Guéant-Rodriguez, consistió de individuos sanos, residentes de la ciudad de México, en nuestro estudio la población fue conformada por individuos afectados por MMC y sus progenitores, procedentes de quince diferentes estados de la República Mexicana. Por lo tanto, la diversidad geográfica de nuestra población en estudio, puede ser la causa de variación a las frecuencias previamente reportadas. De manera interesante, la frecuencia del genotipo 1298CC se asemeja a la reportada por Guéant-Rodriguez, cuando solo se toma en cuenta a los padres de los afectados (2.4% para madres y 4.4% para padres con una frecuencia alélica de

0.14 y 0.15 respectivamente). Tomando en cuenta que los padres de los afectados pueden considerarse individuos sanos, las diferencias entre frecuencias de individuos sanos reportados e individuos con MMC, podrían ser un indicador de que la variante A1298C está relacionada con el MMC, para la población mexicana, presentándose en mayor medida en individuos sanos, lo que significaría que representa un factor de protección. Sin embargo, al realizar la comparación de frecuencias entre los individuos afectados y su grupo control correspondiente, no se encontró evidencia estadística que soportara la teoría anterior. Esto concuerda con lo reportado en otras poblaciones del mundo, donde la variante *MTHFR* A1298C no representa un factor de riesgo para DTN, pero difiere con lo reportado por González-Herrera (2007), quien señaló al genotipo 1298CC como un factor de riesgo materno para espina bífida, en un estudio realizado en población mexicana, del estado de Yucatán. La diferencia de resultados, entre el presente estudio y el arriba mencionado, radica en el análisis realizado, ya que mientras González-Herrera determinó y comparó la frecuencia de la variante *MTHFR* A1298C, entre madres con hijos afectados por espina bífida y un grupo control conformado por madres con hijos sanos del estado de Yucatán, con el fin de determinar si esta variante representa un factor de riesgo materno, nuestro estudio se centró en encontrar si esta variante representa un factor de riesgo cuando se encuentra en el genotipo del producto, usando una población de individuos afectados e individuos sanos de quince diferentes estados de la República Mexicana.

De manera similar el análisis de TDT no mostró una transmisión preferencial, así como tampoco la correlación entre genotipo y la altura de la lesión, mostró una

diferencia estadísticamente significativa. Por lo que se puede concluir que la variante *MTHFR* A1298C no representa un factor de riesgo individual para MMC en la población mexicana.

MTR A2756G

MTR A2756G no se encontró con gran frecuencia en nuestra población, observándose en los casos solo el 2.80% de individuos con genotipo 2756GG, además de una frecuencia alélica de 0.20. Estos datos no difieren de la frecuencia reportada en otras poblaciones del mundo (Sharp et al. 2004, Fredriksen et al. 2007, van der Put et al. 1997, Theodoratou et al. 2008).

Al comparar las frecuencias genotípicas obtenidas en el grupo de casos con las de su grupo control no se encontró una diferencia estadística que pudiera servir como evidencia de una asociación entre la variante *MTR* A2756G y el MMC, este resultado se suma al grupo de estudios que no han logrado encontrar alguna asociación entre la variante y el riesgo a DTN, (Al Farra 2010, Candito et al. 2008, O Leary et al. 2005, Ouyang et al. 2013), pero contradice otras investigaciones (Zhu et al. 2003, Doolin et al. 2002, Guéant-Rodríguez et al. 2003), en las cuales se reporta una asociación entre la presencia de la variante y el incremento en el riesgo a DTN. La diferencia de resultados entre este trabajo y los reportes de Doolin y Guéant-Rodríguez puede deberse a las poblaciones analizadas, ya que para estos últimos estudios se utilizó población caucásica residente de los Estados Unidos y población Italiana respectivamente, las cuales difieren genéticamente de la población mexicana analizada en nuestro trabajo. Por otra parte el estudio de

Zhu et al. (2003) fue realizado en una población mexicana, residente de la frontera entre México y Texas. En este estudio se reportaron frecuencias genotípicas similares a las encontradas en nuestra población (62.40% AA, 34.80% AG, 2.80% GG), encontrando una asociación entre esta variante y el riesgo a DTN. La diferencia de resultados entre este último estudio y el nuestro, puede deberse a la diferencias de la muestra poblacional, ya que en el estudio realizado en la frontera México-Texas se incluyeron individuos con espina bífida y anencefalia, mientras que en nuestro estudio solo se tomaron en cuenta individuos con espina bífida, específicamente MMC, además es importante tomar en cuenta la diferencia entre los factores ambientales a los que están sometidos ambas poblaciones. Por lo tanto, esta conformación poblacional, así como la exposición a distintos factores ambientales, podría ocasionar un incremento en la frecuencia de la variante *MTR* A2756G en el grupo de casos del estudio de Zhu, lo que se reflejaría en una diferencia estadísticamente significativa al momento de realizar el análisis.

MTRR A66G

El análisis de la variante *MTRR* A66G mostró una baja frecuencia del genotipo 66GG en la población de individuos afectados con MMC (3.20%), además de una baja frecuencia alélica (0.17 alelo G). Estos resultados son discordantes a lo reportado en la población mexicana por Shi (2003), quien determinó una frecuencia alélica de 0.21 para el alelo G con un 6% de individuos homocigotos GG. Las altas frecuencias encontradas en el último estudio pueden explicarse por

el tamaño poblacional, debido a que para esa investigación solo se tomaron en cuenta 50 individuos. Al comparar las frecuencias genotípicas de nuestro grupo de casos con el grupo control correspondiente no se encontró que existiera una diferencia estadísticamente significativa, lo cual contrasta con los resultados previamente reportados en una población mexicana, residente de la frontera México-Texas (Zhu et al. 2003). Como se explicó en párrafos anteriores, es posible que esta variación en los resultados sea debido a la conformación de la población en estudio y a la diferente exposición de factores ambientales a las que están sometidas ambas poblaciones. Por otra parte no se encontró diferencia estadísticamente significativa en la comparación de frecuencias genotípicas de los diferentes fenotipos analizados, por lo que no se considera que la variante *MTRR* A66G represente un factor de riesgo individual para MMC.

MTHFD1 G1958A

Debido a la importancia que tiene la enzima *MTHFD1* para la síntesis de ADN, se ha considerado que la presencia de polimorfismos en el gen *MTHFD1*, pueden ser factores de riesgo de diversas enfermedades, entre ellas MMC.

Al analizar la población en estudio, se observó una frecuencia de 39.60% de homocigotos *MTHFD1* 1958AA, con una frecuencia alélica de 0.62 para el alelo A. Estos porcentajes muestran, que en la población en estudio, la variante G1958A se presenta en gran frecuencia. Estos datos resultan distintos a los reportados en

la población caucásica, donde esta variante se presenta en un rango de 15% a 21% dependiendo de la localización geográfica de la población.

Debido a la alta prevalencia de DTN reportada en la población mexicana, se podría considerar que la frecuencia en la que se presenta esta variante representa un factor de riesgo para estas malformaciones. Sin embargo el análisis de comparación de frecuencias genotípicas no mostró la existencia de una diferencia estadísticamente significativa que pudiera relacionar la presencia de la variante *MTHFD1* G1958A con un incremento al riesgo de MMC. Al revisar lo reportado en otras poblaciones del mundo, respecto a la asociación de esta variante con DTN, podemos indagar que la población mexicana no es susceptible al efecto que pudiera tener esta variante sobre el riesgo a tener un embarazo afectado por DTN, como se ha reportado en las poblaciones de Irlanda e Italia, donde la presencia de esta variante tanto en el fenotipo materno, como en el producto incrementa el riesgo a DTN. La explicación a esta disparidad de resultados puede atribuirse a la variación genética existente entre las poblaciones estudiadas.

De manera similar al análisis de frecuencias genotípicas, entre casos y controles, no se encontró ninguna asociación al comparar las frecuencias obtenidas en los diferentes fenotipos de MMC, por lo cual, asumimos que la presencia de la variante *MTHFD1* G1958 no representa ningún factor de riesgo para DTN.

TCNII C776G

En relación al transportador de cobalamina, se ha destacado su importancia, debido a que la vitamina B12 funciona como cofactor para la remetilación de homocisteína, el cual es un paso importante en el ciclo de metilación. Se ha observado un déficit de vitamina B12 en madres de hijos con DTN, esta deficiencia puede atribuirse a una mala ingesta de vitamina B12 o bien a alteraciones en su transporte. Por este motivo se cree que la presencia de variantes genéticas en el gen *TCNII* puede incrementar el riesgo a DTN.

Al realizar la genotipificación y análisis de los respectivos genotipos, para la variante *TCNII C776G*, obtuvimos una frecuencia de 10.00% de individuos con genotipo *776GG*, además de una frecuencia alélica de 0.33. Esta frecuencia de homocigotos encontrada es menor al 17.60% reportado anteriormente en población mexicana (Guéant et al. 2007). Esta variación puede ser explicada por la diferente distribución geográfica de las poblaciones, ya que el estudio realizado por Guéant contó con una muestra centralizada, conformada en su totalidad por individuos cuya residencia estaba en la Ciudad de México o su periferia, mientras tanto, para nuestro estudio, la población conto con individuos de 15 diferentes estados de la República Mexicana.

A pesar de la importancia de la enzima *TCNII*, a la cual codifica este gen, y los posibles efectos conocidos que podrían ocasionar una disfunción de esta misma, al realizar la comparación de frecuencias genotípicas entre los grupos de casos y controles, no se encontró evidencia estadística sobre una posible asociación entre la variante *TCNII C776G* y el incremento en el riesgo para DTN. Mediante este resultado podemos asumir que la población mexicana es diferente a las

poblaciones de Polonia y la India, ya que en estas dos últimas, se ha reportado que la presencia de la variante C776G representa un factor de riesgo para DTN, cuando se encuentra en estado homocigoto, en el genotipo materno. Cabe mencionar que en ambas poblaciones se reportaron junto con la variante bajos niveles de vitamina B12, especialmente en la población India, donde la alimentación es principalmente vegetariana, lo cual nos indica que esta variante puede interactuar con factores ambientales, como lo es la alimentación, para así incrementar el riesgo a defectos del tubo neural.

En el análisis de correlación fenotipo-genotipo tampoco demostró algún tipo de asociación entre la variante *TCNII* C776G y la altura de la lesión de MMC. Por lo cual, con los resultados obtenidos, se asume que no existe una asociación entre la variante C776G como factor de riesgo individual y el MMC en la población mexicana.

DHFR del19pb y *TYMS* Rep28pbG>C

A pesar de no contar con un grupo control apropiado para realizar la comparación de frecuencias de las variantes *DHFR* del19pb y *TYMS* Rep28pbG>C, se obtuvieron resultados interesantes para el resto de los análisis, en específico para las variantes de *TYMS*.

El análisis de correlación fenotipo-genotipo mostro un resultado, que a pesar de no alcanzar la significancia estadística, nos sugiere que el genotipo homocigoto de 3 repeticiones para *TYMS* podría estar relacionado con el desarrollo de las formas más graves de MMC. Este resultado resulta contradictorio con lo reportado en antiguas investigaciones, donde se reporta al genotipo homocigoto para el alelo de

2 repeticiones como un factor de riesgo para DTN en población caucásica (Volcick et al. 2003).

La diferencia de nuestros resultados con los reportados en otras investigaciones radican en la población en estudio, ya que las poblaciones caucásicas y mexicanas difieren en su composición genética, teniendo esta última un linaje mestizo de las poblaciones amerindia e hispánica, por lo que podría suponerse que el genotipo homocigoto 3C para la variante *TYMS* Rep28pbG>C representa un factor de riesgo para formas graves de MMC para la población mexicana en específico.

Sin embargo, es necesario realizar este análisis en presencia de un grupo control sano, con el fin de realizar un análisis más completo, que permita confirmar la función de la variante *TYMS* Rep28pbG>C, como un factor de riesgo para MMC en la población mexicana.

Es posible que debido al tamaño de muestra, utilizado para este estudio, no se hayan encontrado algunas asociaciones entre las variantes y el riesgo a DTN. Por ese motivo se realizó una comparación entre los individuos clasificados por la gravedad de su genotipo y el grupo control, utilizando el número de alelos de la frecuencia reportada por los genotipos homocigotos a cada variante. De manera interesante, se observó que mediante esta comparación, que simula doblar el tamaño de muestra, las variantes *MTHFR* C667T, *MTHFD1* G1958A, *TCNII* C776G, *DHFR* del19pb y *TYMS* Rep28p mostraban valores cercanos a la significancia estadística al comparar los grupos de riesgo entre sí, y con el grupo control. Este resultado nos deja ver la existencia de asociaciones que podrían ser

encontradas en futuros estudios, con un mayor tamaño poblacional, lo cual nos permitiría obtener mayor información que nos ayude a comprender mejor la etiología del MMC.

Análisis de interacción génica

En lo que corresponde a los análisis de interacción génica realizados por el software MDR, no se encontró ninguna interacción, con un valor estadísticamente significativo, que representara un riesgo para el MMC, al realizar un análisis exhaustivo con todas las variantes en estudio.

Sin embargo al realizar el análisis forzado para todas las combinaciones posibles de genotipos, que involucraran hasta cuatro variantes, se observaron 20 posibles interacciones que se acercaban al valor de significancia establecido.

De estas interacciones, la variante *MTHFD1 G1958A* se presentó en 14 de ellas, interactuando en mayor proporción con las variantes *MTHFR A1298C*, *MTRR A66G* y *TCNII C776G*, siendo la interacción de estas 4 variantes la que mostró un alto nivel cercano a la significancia estadística del análisis (TA= 0.602)

Tomando en cuenta la función de las proteínas codificadas por estos genes, podemos deducir la importancia que tendría, en el proceso de formación del tubo neural, una deficiencia múltiple de estas enzimas, ocasionada por la presencia de estos polimorfismos.

El curso normal del metabolismo de los folatos puede ser alterado al verse afectada la función primordial de la enzima TCNII, encargada del transporte de vitamina B12 al interior de la célula, ya que al reducirse la disponibilidad de esta vitamina, en combinación con una actividad enzimática reducida de MTRR, debido

a la presencia del polimorfismo *MTRR A66G*, la actividad enzimática de MTR se vería afectada al verse desprovista de su cofactor, debido a deficiencias tanto del transporte, como la activación de la vitamina B12, ocasionando así una falla en el proceso de remetilación de homocisteína.

Sumado a esto, se ha reportado que la presencia de la variante *MTHFR C667T* en estado homocigoto, o bien formando un heterocigoto compuesto junto con la variante *MTHFR A1298C*, puede reducir la actividad de la enzima MTHFR, la cual realiza la función de reducir el compuesto 5-10 MetilTHF, generando 5-MetilTHF, para que este último funcione como donador de grupos metilo para la remetilación de homocisteína.

Por su parte, la enzima C1-THF, la cual es codificada por el gen *MTHFD1*, desarrolla una función primordial en el metabolismo de los folatos, siendo una proteína capaz de catalizar tres reacciones distintas. Su dominio Formil-Tetrahydrofolato-Sintetasa (FTHF) es el encargado de sintetizar, a partir de formato y tetrahydrofolato, el compuesto 10-formil-THF, el cual puede servir como cofactor para la síntesis de purinas, o bien puede ser deshidratado y reducido por los dominios Metenil-Tetrahydrofolato-Ciclohidrolasa (MTHFC) y 5-10 Metil-Tetrahydrofolato-Deshidrogenasa (MTHFD) de la enzima C1-THF, para formar 5-10 Metil-THF e incorporarse a la biosíntesis de timidilato y metionina. Por lo que una disminución en la actividad de esta proteína, podría causar deficiencias en procesos de suma importancia para el desarrollo embrionario, como son la síntesis y metilación de ADN.

Considerando los antecedentes reportados, sobre la función de las enzimas metabolizadoras de los folatos, además de la evidencia estadística, obtenida en

este estudio, sobre una posible interacción entre las variantes presentes en los genes codificadores de estas enzimas, proponemos un modelo de interacción entre las variantes *MTHFR C667T*, *MTHFR A1298C*, *MTRR A66G*, *MTR A2756G*, *MTHFD1 G1958A* y *TCNII C776G*, en el cual, al encontrarse estas variantes en conjunto, en el genotipo del producto, podría darse una alteración en el correcto desarrollo del ciclo, debido a una disminución en la actividad de sus respectivas enzimas, provocando una disminución en los niveles de vitamina B12, así como de cofactores importantes para el desarrollo del ciclo, como lo son 10-Formil-THF, 5-10-Metilen-THF y 5-Metil-THF, la cual podría verse reflejada con un aumento en los niveles de homocisteína, pudiendo este conjunto de eventos provocar deficiencias en los procesos de síntesis y metilación de ADN en etapas tempranas del desarrollo embrionario, predisponiendo así a la ocurrencia de MMC.

Sin embargo es necesario realizar más investigación al respecto, con el fin de obtener evidencia que resulte contundente y permita explicar de una manera más amplia y detallada la etiología del MMC.

Por este motivo se espera que en futuras investigaciones relacionadas al tema, sea posible ampliar la muestra poblacional, para que de esta forma se pueda tener un mayor poder estadístico, así como la realización de análisis de expresión y metilación, que nos permitan obtener información que contribuya a la generación de conocimiento, para crear de esta forma un panorama más amplio, que nos brinde la posibilidad de entender más sobre las causas genéticas que predisponen al MMC.

Es importante mencionar que el incremento en el riesgo para MMC puede deberse a una serie de factores ambientales y nutricionales en interacción con la predisposición genética. En épocas recientes se ha estudiado a profundidad la relación del ácido fólico con los DTN, encontrando que una fortificación periconcepcional reduce hasta en un 50% el riesgo para estas malformaciones (Smithells et al. 1981, Bower et al. 1989, Czeizel et al. 1992, De-Regil et al. 2010). Por tal motivo las autoridades de los Estados Unidos comenzaron en 1992 una campaña de información recomendando a las mujeres en edad reproductiva consumir 400 µg de ácido fólico diariamente. En 1998 “La Administración de Alimentos y Medicamentos” comenzó una campaña de fortificación en todos los alimentos a base de cereales, suplementando con 140 µg de ácido fólico cada 100 gr de cereal. A partir de esta medida se ha reportado una disminución de 11%-20% en la ocurrencia de anencefalia y una disminución de 21%-34% en la ocurrencia de espina bífida (Honein et al. 2001). Por su parte en México se implementó el programa de suplementación con ácido fólico a mujeres en edad reproductiva en el año 2003. Sin embargo diversos estudios han reportado que la suplementación con ácido fólico no presenta ningún beneficio para la población mexicana que habita en la frontera con Estados Unidos (Harris et al. 1995, Suarez et al. 2000), mientras que un estudio realizado en Nuevo León, afirma que los nacimientos con DTN se vieron reducidos en un 50% después de dos años de iniciado un programa de fortificación en la región (Martinez et al. 2002). Esta diferencia de resultados nos indica, que si bien la suplementación periconcepcional con ácido fólico puede disminuir la ocurrencia de DTN, existen otros nutrientes, participantes en la vía metabólica de los folatos, que podrían

modificar el riesgo de que se presenten este tipo de malformaciones, siendo un ejemplo de estos, la asociación de DTN con los bajos niveles de vitamina B12. Esta asociación ha sido reportada en poblaciones de la India (Godbole et al. 2011), donde se presenta una frecuencia de DTN de 11.4 por cada 1000 nacimientos. A diferencia de las poblaciones americanas, la población de la India adquiere altos niveles de folato a través de su dieta, sin embargo, al ser esta una dieta vegetariana, carecen de la ingesta de vitamina B12, la cual se obtiene de alimentos de origen animal (Godbole et al. 2011), por lo tanto, la suplementación necesaria en esta población, diferiría de la utilizada en los Estados Unidos y México, dejándonos ver que el riesgo de DTN diferiría entre las poblaciones según sus hábitos alimenticios.

Tomando en cuenta esto, es posible que el efecto de las variantes de las enzimas metabolizadoras de folatos, se vea modificado entre poblaciones como resultado de una interacción con los niveles de nutrientes adquiridos a través de la dieta. Lo cual explicaría que la presencia de variantes en el gen *TCNII* represente un factor de riesgo en poblaciones de la India, donde la dieta es pobre en vitamina B12, pero no en la población estadounidense o mexicana donde se consumen altos niveles de esta vitamina, o bien, que la presencia de variantes en los genes *MTRR* y *MTR* no represente un factor de riesgo para DTN en la población mexicana residente en México, debido a la ingesta frecuente de ácido fólico a través del consumo de legumbres, mientras si lo es para la población mexicana residente de los Estados Unidos, cuya dieta carece de este nutriente.

9. CONCLUSIONES

- En la población en estudio se reporta una alta frecuencia alélica de las variantes *MTHFR* C667T, *MTHFD1* G1958A, *DHFR* del19pb y *TYMS* rep28pb G>C en comparación con las poblaciones europeas y caucásicas.
- Las variantes *MTHFR* C667T, A1298C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G, *MTHFD1* G1958A, *TCNII* C776G no representan un factor de riesgo individual para MMC, en esta muestra de pacientes mexicanos, correspondiente a 15 estados de la República Mexicana.
- La variante *MTHFR* C667T presenta un resultado cercano al nivel de significancia propuesto, lo cual sugiere una posible relación con el MMC de tipo torácico y toracolumbar, lo que podría significar que la presencia de esta variante está ligada a las formas más graves de MMC.
- Los resultados del análisis MDR muestran la posible existencia de una interacción entre las variantes *MTHFR* C667T, *MTHFR* A1298C, *MTRR* A66G, *MTR* A2756G, *MTHFD1* G1958A y *TCNII* C776G. La cual puede resultar en la interrupción del ciclo de metilación y síntesis de ADN en etapas embrionarias tempranas.

- Es necesario que se realicen más investigaciones relacionadas con la asociación de variantes genéticas en el ciclo de los folatos y el MMC, ya que como se demostró, realizando la comparación de frecuencias, tomando en cuenta el número de alelos, es posible observar la presencia de nuevas asociaciones cuando el tamaño de muestra es incrementado.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Afman, L. A., K. J. Lievers, N. M. van der Put, F. J. Trijbels and H. J. Blom (2002). "Single nucleotide polymorphisms in the transcobalamin gene: relationship with transcobalamin concentrations and risk for neural tube defects." *Eur J Hum Genet* 10(7): 433-438.
2. Afman, L. A., N. M. Van Der Put, C. M. Thomas, J. M. Trijbels and H. J. Blom (2001). "Reduced vitamin B12 binding by transcobalamin II increases the risk of neural tube defects." *QJM* 94(3): 159-166.
3. Al Farra, H. Y. (2010). "Methionine synthase polymorphisms (MTR 2756 A>G and MTR 2758 C>G) frequencies and distribution in the Jordanian population and their correlation with neural tube defects in the population of the northern part of Jordan." *Indian J Hum Genet* 16(3): 138-143.
4. Amorim, M. R., M. A. Lima, E. E. Castilla and I. M. Orioli (2007). "Non-Latin European descent could be a requirement for association of NTDs and MTHFR variant 677C > T: a meta-analysis." *Am J Med Genet A* 143A(15): 1726-1732.
5. Au, K. S., A. Ashley-Koch and H. Northrup (2010). "Epidemiologic and genetic aspects of spina bifida and other neural tube defects." *Dev Disabil Res Rev* 16(1): 6-15.
6. Barbosa, P. R., S. P. Stabler, R. Trentin, F. R. Carvalho, A. D. Luchessi, R. D. Hirata, M. H. Hirata, R. H. Allen and E. M. Guerra-Shinohara (2008). "Evaluation of nutritional and genetic determinants of total homocysteine, methylmalonic acid and S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine values in Brazilian childbearing-age women." *Clin Chim Acta* 388(1-2): 139-147.
7. Beaudin, A. E. and P. J. Stover (2007). "Folate-mediated one-carbon metabolism and neural tube defects: balancing genome synthesis and gene expression." *Birth Defects Res C Embryo Today* 81(3): 183-203.
8. Beaudin, A. E. and P. J. Stover (2009). "Insights into metabolic mechanisms underlying folate-responsive neural tube defects: a minireview." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 85(4): 274-284.
9. Blatter, B. M., M. van der Star and N. Roeleveld (1994). "Review of neural tube defects: risk factors in parental occupation and the environment." *Environ Health Perspect* 102(2): 140-145.
10. Botto, L. D. and Q. Yang (2000). "5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review." *Am J Epidemiol* 151(9): 862-877.

11. Botto, N., M. G. Andreassi, S. Manfredi, S. Masetti, F. Cocci, M. G. Colombo, S. Storti, A. Rizza and A. Biagini (2003). "Genetic polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage." *Eur J Hum Genet* 11(9): 671-678.
12. Bower, C. and F. J. Stanley (1989). "Dietary folate as a risk factor for neural-tube defects: evidence from a case-control study in Western Australia." *Med J Aust* 150(11): 613-619.
13. Boyles, A. L., A. V. Billups, K. L. Deak, D. G. Siegel, L. Mehlretter, S. H. Slifer, A. G. Bassuk, J. A. Kessler, M. C. Reed, H. F. Nijhout, T. M. George, D. S. Enterline, J. R. Gilbert, M. C. Speer and N. T. D. C. Group (2006). "Neural tube defects and folate pathway genes: family-based association tests of gene-gene and gene-environment interactions." *Environ Health Perspect* 114(10): 1547-1552.
14. Brender, J. D. (1989). Anencephaly in Texas. Texas vital statistics. Austin Texas, Texas Department of Health: 42-43.
15. Brender, J. D., L. Carmichael, M. J. Preece, G. C. Larimer and L. Suarez (1989). "Epidemiology of anencephaly in Texas, 1981-1986." *Tex Med* 85(7): 33-35.
16. Brilakis, E. S., P. B. Berger, K. V. Ballman and R. Rozen (2003). "Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T and methionine synthase reductase (MTRR) 66A>G polymorphisms: association with serum homocysteine and angiographic coronary artery disease in the era of flour products fortified with folic acid." *Atherosclerosis* 168(2): 315-322.
17. Brody, L. C., M. Conley, C. Cox, P. N. Kirke, M. P. McKeever, J. L. Mills, A. M. Molloy, V. B. O'Leary, A. Parle-McDermott, J. M. Scott and D. A. Swanson (2002). "A polymorphism, R653Q, in the trifunctional enzyme methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase/formyltetrahydrofolate synthetase is a maternal genetic risk factor for neural tube defects: report of the Birth Defects Research Group." *Am J Hum Genet* 71(5): 1207-1215.
18. Brouns, R., N. Ursem, J. Lindemans, W. Hop, S. Pluijm, E. Steegers and R. Steegers-Theunissen (2008). "Polymorphisms in genes related to folate and cobalamin metabolism and the associations with complex birth defects." *Prenat Diagn* 28(6): 485-493.
19. Brown, C. A., K. Q. McKinney, J. S. Kaufman, R. A. Gravel and R. Rozen (2000). "A common polymorphism in methionine synthase reductase increases risk of premature coronary artery disease." *J Cardiovasc Risk* 7(3): 197-200.

20. Brown, K. S., L. A. Kluijtmans, I. S. Young, H. McNulty, L. E. Mitchell, J. W. Yarnell, J. V. Woodside, C. A. Boreham, D. McMaster, L. Murray, J. J. Strain and A. S. Whitehead (2004). "The thymidylate synthase tandem repeat polymorphism is not associated with homocysteine concentrations in healthy young subjects." *Hum Genet* 114(2): 182-185.
21. Candito, M., R. Rivet, B. Herbeth, C. Boisson, R. C. Rudigoz, D. Luton, H. Journel, J. F. Oury, F. Roux, R. Saura, I. Vernhet, P. Gaucherand, F. Muller, B. Guidicelli, H. Heckenroth, P. Poulain, M. Blayau, C. Francannet, L. Roszyk, C. Brustie, P. Staccini, P. Gerard, N. Fillion-Emery, R. M. Gueant-Rodriguez, E. Van Obberghen and J. L. Gueant (2008). "Nutritional and genetic determinants of vitamin B and homocysteine metabolisms in neural tube defects: a multicenter case-control study." *Am J Med Genet A* 146A(9): 1128-1133.
22. Canfield, M. A., J. F. Annegers, J. D. Brender, S. P. Cooper and F. Greenberg (1996). "Hispanic origin and neural tube defects in Houston/Harris County, Texas. I. Descriptive epidemiology." *Am J Epidemiol* 143(1): 1-11.
23. Canfield, M. A., J. F. Annegers, J. D. Brender, S. P. Cooper and F. Greenberg (1996). "Hispanic origin and neural tube defects in Houston/Harris County, Texas. II. Risk factors." *Am J Epidemiol* 143(1): 12-24.
24. Carroll, N., F. Pangilinan, A. M. Molloy, J. Troendle, J. L. Mills, P. N. Kirke, L. C. Brody, J. M. Scott and A. Parle-McDermott (2009). "Analysis of the MTHFD1 promoter and risk of neural tube defects." *Hum Genet* 125(3): 247-256.
25. Chen, J., D. J. Hunter, M. J. Stampfer, C. Kyte, W. Chan, J. G. Wetmur, R. Mosig, J. Selhub and J. Ma (2003). "Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region modifies the risk and survival of colorectal cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12(10): 958-962.
26. Chen, J., C. Kyte, M. Valcin, W. Chan, J. G. Wetmur, J. Selhub, D. J. Hunter and J. Ma (2004). "Polymorphisms in the one-carbon metabolic pathway, plasma folate levels and colorectal cancer in a prospective study." *Int J Cancer* 110(4): 617-620.
27. Chen, J., M. J. Stampfer, J. Ma, J. Selhub, M. R. Malinow, C. H. Hennekens and D. J. Hunter (2001). "Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction." *Atherosclerosis* 154(3): 667-672.
28. Chen, L. H., M. L. Liu, H. Y. Hwang, L. S. Chen, J. Korenberg and B. Shane (1997). "Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression." *J Biol Chem* 272(6): 3628-3634.

29. Christensen, B., L. Arbour, P. Tran, D. Leclerc, N. Sabbaghian, R. Platt, B. M. Gilfix, D. S. Rosenblatt, R. A. Gravel, P. Forbes and R. Rozen (1999). "Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects." *Am J Med Genet* 84(2): 151-157.
30. Christensen, K. E., C. V. Rohlicek, G. U. Andelfinger, J. Michaud, J. L. Bigras, A. Richter, R. E. Mackenzie and R. Rozen (2009). "The MTHFD1 p.Arg653Gln variant alters enzyme function and increases risk for congenital heart defects." *Hum Mutat* 30(2): 212-220.
31. Chu, E. and C. J. Allegra (1996). "The role of thymidylate synthase in cellular regulation." *Adv Enzyme Regul* 36: 143-163.
32. Colas, J. F. and G. C. Schoenwolf (2001). "Towards a cellular and molecular understanding of neurulation." *Dev Dyn* 221(2): 117-145.
33. Czeizel, A. E. and I. Dudas (1992). "Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation." *N Engl J Med* 327(26): 1832-1835.
34. Davis, S. R., E. P. Quinlivan, K. P. Shelnutt, D. R. Maneval, H. Ghandour, A. Capdevila, B. S. Coats, C. Wagner, J. Selhub, L. B. Bailey, J. J. Shuster, P. W. Stacpoole and J. F. Gregory, 3rd (2005). "The methylenetetrahydrofolate reductase 677C->T polymorphism and dietary folate restriction affect plasma one-carbon metabolites and red blood cell folate concentrations and distribution in women." *J Nutr* 135(5): 1040-1044.
35. De Marco, P., E. Merello, M. G. Calevo, S. Mascelli, A. Raso, A. Cama and V. Capra (2006). "Evaluation of a methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase 1958G>A polymorphism for neural tube defect risk." *J Hum Genet* 51(2): 98-103.
36. Deng, L., C. L. Elmore, A. K. Lawrance, R. G. Matthews and R. Rozen (2008). "Methionine synthase reductase deficiency results in adverse reproductive outcomes and congenital heart defects in mice." *Mol Genet Metab* 94(3): 336-342.
37. De-Regil, L. M., A. C. Fernandez-Gaxiola, T. Dowswell and J. P. Pena-Rosas (2010). "Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects." *Cochrane Database Syst Rev*(10): CD007950.
38. Devlin, A. M., R. Clarke, J. Birks, J. G. Evans and C. H. Halsted (2006). "Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine concentrations in a healthy elderly population." *Am J Clin Nutr* 83(3): 708-713.

39. Doolin, M. T., S. Barbaux, M. McDonnell, K. Hoess, A. S. Whitehead and L. E. Mitchell (2002). "Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida." *Am J Hum Genet* 71(5): 1222-1226.
40. Doudney, K., J. Grinham, J. Whittaker, S. A. Lynch, D. Thompson, G. E. Moore, A. J. Copp, N. D. Greene and P. Stanier (2009). "Evaluation of folate metabolism gene polymorphisms as risk factors for open and closed neural tube defects." *Am J Med Genet A* 149A(7): 1585-1589.
41. Franke, B., S. H. Vermeulen, R. P. Steegers-Theunissen, M. J. Coenen, M. M. Schijvenaars, H. Scheffer, M. den Heijer and H. J. Blom (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(3): 216-226.
42. Fredriksen, A., K. Meyer, P. M. Ueland, S. E. Vollset, T. Grotmol and J. Schneede (2007). "Large-scale population-based metabolic phenotyping of thirteen genetic polymorphisms related to one-carbon metabolism." *Hum Mutat* 28(9): 856-865.
43. Friso, S., S. W. Choi, D. Girelli, J. B. Mason, G. G. Dolnikowski, P. J. Bagley, O. Olivieri, P. F. Jacques, I. H. Rosenberg, R. Corrocher and J. Selhub (2002). "A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(8): 5606-5611.
44. Frosst, P., H. J. Blom, R. Milos, P. Goyette, C. A. Sheppard, R. G. Matthews, G. J. Boers, M. den Heijer, L. A. Kluijtmans, L. P. van den Heuvel and et al. (1995). "A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase." *Nat Genet* 10(1): 111-113.
45. Gellekink, H., H. J. Blom, I. J. van der Linden and M. den Heijer (2007). "Molecular genetic analysis of the human dihydrofolate reductase gene: relation with plasma total homocysteine, serum and red blood cell folate levels." *Eur J Hum Genet* 15(1): 103-109.
46. Godbole, K., P. Gayathri, S. Ghule, B. V. Sasirekha, A. Kanitkar-Damle, N. Memane, S. Suresh, J. Sheth, G. R. Chandak and C. S. Yajnik (2011). "Maternal one-carbon metabolism, MTHFR and TCN2 genotypes and neural tube defects in India." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 91(9): 848-856.
47. Gonzalez-Herrera, L., I. Castillo-Zapata, G. Garcia-Escalante and D. Pinto-Escalante (2007). "A1298C polymorphism of the MTHFR gene and neural tube defects in the state of Yucatan, Mexico." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 79(8): 622-626.

48. Goulding, C. W., D. Postigo and R. G. Matthews (1997). "Cobalamin-dependent methionine synthase is a modular protein with distinct regions for binding homocysteine, methyltetrahydrofolate, cobalamin, and adenosylmethionine." *Biochemistry* 36(26): 8082-8091.
49. Grewal, J., S. L. Carmichael, J. Song and G. M. Shaw (2009). "Neural tube defects: an analysis of neighbourhood- and individual-level socio-economic characteristics." *Paediatr Perinat Epidemiol* 23(2): 116-124.
50. Gueant, J. L., N. W. Chabi, R. M. Gueant-Rodriguez, O. M. Mutchinick, R. Debard, C. Payet, X. Lu, C. Villaume, J. P. Bronowicki, E. V. Quadros, A. Sanni, E. Amouzou, B. Xia, M. Chen, G. Anello, P. Bosco, C. Romano, H. R. Arrieta, B. E. Sanchez, A. Romano, B. Herbeth, W. Anwar and F. Namour (2007). "Environmental influence on the worldwide prevalence of a 776C->G variant in the transcobalamin gene (TCN2)." *J Med Genet* 44(6): 363-367.
51. Gueant-Rodriguez, R. M., J. L. Gueant, R. Debard, S. Thirion, L. X. Hong, J. P. Bronowicki, F. Namour, N. W. Chabi, A. Sanni, G. Anello, P. Bosco, C. Romano, E. Amouzou, H. R. Arrieta, B. E. Sanchez, A. Romano, B. Herbeth, J. C. Guiland and O. M. Mutchinick (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(3): 701-707.
52. Gueant-Rodriguez, R. M., Y. Juilliere, M. Candito, C. E. Adjalla, P. Gibelin, B. Herbeth, E. Van Obberghen and J. L. Gueant (2005). "Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTRA2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population." *Thromb Haemost* 94(3): 510-515.
53. Gueant-Rodriguez, R. M., C. Rendeli, B. Namour, L. Venuti, A. Romano, G. Anello, P. Bosco, R. Debard, P. Gerard, M. Viola, E. Salvaggio and J. L. Gueant (2003). "Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans." *Neurosci Lett* 344(3): 189-192.
54. Harris, J. A. and G. M. Shaw (1995). "Neural tube defects--why are rates high among populations of Mexican descent?" *Environ Health Perspect* 103 Suppl 6: 163-164.
55. Hernandez-Diaz, S., M. M. Werler, A. M. Walker and A. A. Mitchell (2000). "Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects." *N Engl J Med* 343(22): 1608-1614.
56. Hishida, A., K. Matsuo, N. Hamajima, H. Ito, M. Ogura, Y. Kagami, H. Taji, Y. Morishima, N. Emi and K. Tajima (2003). "Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine

- hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma." *Haematologica* 88(2): 159-166.
57. Hol, F. A., N. M. van der Put, M. P. Geurds, S. G. Heil, F. J. Trijbels, B. C. Hamel, E. C. Mariman and H. J. Blom (1998). "Molecular genetic analysis of the gene encoding the trifunctional enzyme MTHFD (methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase, methenyltetrahydrofolate-cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase) in patients with neural tube defects." *Clin Genet* 53(2): 119-125.
 58. Honein, M. A., L. J. Paulozzi, T. J. Mathews, J. D. Erickson and L. Y. Wong (2001). "Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects." *JAMA* 285(23): 2981-2986.
 59. Horie, N., H. Aiba, K. Oguro, H. Hojo and K. Takeishi (1995). "Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase." *Cell Struct Funct* 20(3): 191-197.
 60. Hustad, S., O. Midttun, J. Schneede, S. E. Vollset, T. Grotmol and P. M. Ueland (2007). "The methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T polymorphism as a modulator of a B vitamin network with major effects on homocysteine metabolism." *Am J Hum Genet* 80(5): 846-855.
 61. Jacques, P. F., A. G. Bostom, R. R. Williams, R. C. Ellison, J. H. Eckfeldt, I. H. Rosenberg, J. Selhub and R. Rozen (1996). "Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations." *Circulation* 93(1): 7-9.
 62. Johnson, W. G., E. S. Stenroos, J. R. Sychala, S. Chatkupt, S. X. Ming and S. Buyske (2004). "New 19 bp deletion polymorphism in intron-1 of dihydrofolate reductase (DHFR): a risk factor for spina bifida acting in mothers during pregnancy?" *Am J Med Genet A* 124A(4): 339-345.
 63. Kawakami, K., D. Salonga, J. M. Park, K. D. Danenberg, H. Uetake, J. Brabender, K. Omura, G. Watanabe and P. V. Danenberg (2001). "Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression." *Clin Cancer Res* 7(12): 4096-4101.
 64. Kawate, H., D. M. Landis and L. A. Loeb (2002). "Distribution of mutations in human thymidylate synthase yielding resistance to 5-fluorodeoxyuridine." *J Biol Chem* 277(39): 36304-36311.
 65. Kirke, P. N., A. M. Molloy, L. E. Daly, H. Burke, D. G. Weir and J. M. Scott (1993). "Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects." *Q J Med* 86(11): 703-708.

66. Kohlmeier, M., K. A. da Costa, L. M. Fischer and S. H. Zeisel (2005). "Genetic variation of folate-mediated one-carbon transfer pathway predicts susceptibility to choline deficiency in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(44): 16025-16030.
67. Koushik, A., P. Kraft, C. S. Fuchs, S. E. Hankinson, W. C. Willett, E. L. Giovannucci and D. J. Hunter (2006). "Nonsynonymous polymorphisms in genes in the one-carbon metabolism pathway and associations with colorectal cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(12): 2408-2417.
68. L., J. K. (1997). *Smith's recognizable, patterns of human malformations*. Philadelphia, Saunders.
69. Lacasana, M., J. Blanco-Munoz, V. H. Borja-Aburto, C. Aguilar-Garduno, M. Rodriguez-Barranco, J. A. Sierra-Ramirez, C. Galaviz-Hernandez, B. Gonzalez-Alzaga and R. Garcia-Cavazos (2012). "Effect on risk of anencephaly of gene-nutrient interactions between methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and maternal folate, vitamin B12 and homocysteine profile." *Public Health Nutr* 15(8): 1419-1428.
70. Leclerc D., Rozen R. (2005). *Molecular biology of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and overview of mutation/polymorphisms*. MTHFR Polymorphisms and Disease. R. Rozen. Georgetown Texas, Landes Bioscience: 1-20.
71. Li, N., S. Seetharam and B. Seetharam (1995). "Genomic structure of human transcobalamin II: comparison to human intrinsic factor and transcobalamin I." *Biochem Biophys Res Commun* 208(2): 756-764.
72. Li, Z., A. Ren, L. Zhang, R. Ye, S. Li, J. Zheng, S. Hong, T. Wang and Z. Li (2006). "Extremely high prevalence of neural tube defects in a 4-county area in Shanxi Province, China." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 76(4): 237-240.
73. Lievers, K. J., L. A. Afman, L. A. Kluijtmans, G. H. Boers, P. Verhoef, M. den Heijer, F. J. Trijbels and H. J. Blom (2002). "Polymorphisms in the transcobalamin gene: association with plasma homocysteine in healthy individuals and vascular disease patients." *Clin Chem* 48(9): 1383-1389.
74. Liu, J., J. C. Schmitz, X. Lin, N. Tai, W. Yan, M. Farrell, M. Bailly, T. Chen and E. Chu (2002). "Thymidylate synthase as a translational regulator of cellular gene expression." *Biochim Biophys Acta* 1587(2-3): 174-182.
75. Ma, J., M. J. Stampfer, B. Christensen, E. Giovannucci, D. J. Hunter, J. Chen, W. C. Willett, J. Selhub, C. H. Hennekens, R. Gravel and R. Rozen (1999). "A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8(9): 825-829.

76. MacFarlane, A. J., C. A. Perry, H. H. Ginary, D. Gao, R. H. Allen, S. P. Stabler, B. Shane and P. J. Stover (2009). "Mthfd1 is an essential gene in mice and alters biomarkers of impaired one-carbon metabolism." *J Biol Chem* 284(3): 1533-1539.
77. Mandola, M. V., J. Stoehmacher, S. Muller-Weeks, G. Cesarone, M. C. Yu, H. J. Lenz and R. D. Ladner (2003). "A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity." *Cancer Res* 63(11): 2898-2904.
78. Marsh, S. (2005). "Thymidylate synthase pharmacogenetics." *Invest New Drugs* 23(6): 533-537.
79. McIntosh, G. C., A. F. Olshan and P. A. Baird (1995). "Paternal age and the risk of birth defects in offspring." *Epidemiology* 6(3): 282-288.
80. Miller, J. W., M. I. Ramos, M. G. Garrod, M. A. Flynn and R. Green (2002). "Transcobalamin II 775G>C polymorphism and indices of vitamin B12 status in healthy older adults." *Blood* 100(2): 718-720.
81. Milunsky, A., E. Alpert, J. L. Kitzmiller, M. D. Younger and R. K. Neff (1982). "Prenatal diagnosis of neural tube defects. VIII. The importance of serum alpha-fetoprotein screening in diabetic pregnant women." *Am J Obstet Gynecol* 142(8): 1030-1032.
82. Milunsky, A., E. Alpert, R. K. Neff and F. D. Frigoletto, Jr. (1980). "Prenatal diagnosis of neural tube defects. IV. Maternal serum alpha-fetoprotein screening." *Obstet Gynecol* 55(1): 60-66.
83. MRC Vitamin Study Research Group (1991). "Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group." *Lancet* 338(8760): 131-137.
84. Munoz, J. B., M. Lacasana, R. G. Cavazos, V. H. Borja-Aburto, C. Galaviz-Hernandez and C. A. Garduno (2007). "Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and the risk of anencephaly in Mexico." *Mol Hum Reprod* 13(6): 419-424.
85. Mutchinick, O. M., M. A. Lopez, L. Luna, J. Waxman and V. E. Babinsky (1999). "High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects." *Mol Genet Metab* 68(4): 461-467.

86. Namour, F., J. Olivier, I. Abdelmouttaleb, C. Adjalla, R. Debard, C. Salvat and J. Gueant (2001). "Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood." *Blood* 97(4): 1092-1098.
87. Naushad, S. M. and A. R. Devi (2010). "Role of parental folate pathway single nucleotide polymorphisms in altering the susceptibility to neural tube defects in South India." *J Perinat Med* 38(1): 63-69.
88. Northrup, H. and K. A. Volcik (2000). "Spina bifida and other neural tube defects." *Curr Probl Pediatr* 30(10): 313-332.
89. Ogino, S. and R. B. Wilson (2003). "Genotype and haplotype distributions of MTHFR677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis." *J Hum Genet* 48(1): 1-7.
90. O'Leary, V. B., J. L. Mills, F. Pangilinan, P. N. Kirke, C. Cox, M. Conley, A. Weiler, K. Peng, B. Shane, J. M. Scott, A. Parle-McDermott, A. M. Molloy, L. C. Brody and G. Members of the Birth Defects Research (2005). "Analysis of methionine synthase reductase polymorphisms for neural tube defects risk association." *Mol Genet Metab* 85(3): 220-227.
91. Olteanu, H., T. Munson and R. Banerjee (2002). "Differences in the efficiency of reductive activation of methionine synthase and exogenous electron acceptors between the common polymorphic variants of human methionine synthase reductase." *Biochemistry* 41(45): 13378-13385.
92. Ouyang, S., Y. Li, Z. Liu, H. Chang and J. Wu (2013). "Association between MTR A2756G and MTRR A66G polymorphisms and maternal risk for neural tube defects: a meta-analysis." *Gene* 515(2): 308-312.
93. Ouyang, S., Z. Liu, Y. Li and J. Wu (2013). "Meta-analyses on the association of MTR A2756G and MTRR A66G polymorphisms with neural tube defect risks in Caucasian children." *J Matern Fetal Neonatal Med* 26(12): 1166-1170.
94. Pangilinan, F., A. M. Molloy, J. L. Mills, J. F. Troendle, A. Parle-McDermott, C. Signore, V. B. O'Leary, P. Chines, J. M. Seay, K. Geiler-Samerotte, A. Mitchell, J. E. VanderMeer, K. M. Krebs, A. Sanchez, J. Cornman-Homonoff, N. Stone, M. Conley, P. N. Kirke, B. Shane, J. M. Scott and L. C. Brody (2012). "Evaluation of common genetic variants in 82 candidate genes as risk factors for neural tube defects." *BMC Med Genet* 13: 62.
95. Parle-McDermott, A., P. N. Kirke, J. L. Mills, A. M. Molloy, C. Cox, V. B. O'Leary, F. Pangilinan, M. Conley, L. Cleary, L. C. Brody and J. M. Scott (2006). "Confirmation of the R653Q polymorphism of the trifunctional C1-synthase enzyme as a maternal risk for neural tube defects in the Irish population." *Eur J Hum Genet* 14(6): 768-772.

96. Parle-McDermott, A., J. L. Mills, P. N. Kirke, V. B. O'Leary, D. A. Swanson, F. Pangilinan, M. Conley, A. M. Molloy, C. Cox, J. M. Scott and L. C. Brody (2003). "Analysis of the MTHFR 1298A-->C and 677C-->T polymorphisms as risk factors for neural tube defects." *J Hum Genet* 48(4): 190-193.
97. Parle-McDermott, A., F. Pangilinan, J. L. Mills, P. N. Kirke, E. R. Gibney, J. Troendle, V. B. O'Leary, A. M. Molloy, M. Conley, J. M. Scott and L. C. Brody (2007). "The 19-bp deletion polymorphism in intron-1 of dihydrofolate reductase (DHFR) may decrease rather than increase risk for spina bifida in the Irish population." *Am J Med Genet A* 143A(11): 1174-1180.
98. Pietrzyk, J. J. and M. Bik-Multanowski (2003). "776C>G polymorphism of the transcobalamin II gene as a risk factor for spina bifida." *Mol Genet Metab* 80(3): 364.
99. Quadros, E. V. (2010). "Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism." *Br J Haematol* 148(2): 195-204.
100. Relton, C. L., C. S. Wilding, A. J. Laffling, P. A. Jonas, T. Burgess, K. Binks, E. J. Tawn and J. Burn (2004). "Low erythrocyte folate status and polymorphic variation in folate-related genes are associated with risk of neural tube defect pregnancy." *Mol Genet Metab* 81(4): 273-281.
101. Relton, C. L., C. S. Wilding, M. S. Pearce, A. J. Laffling, P. A. Jonas, S. A. Lynch, E. J. Tawn and J. Burn (2004). "Gene-gene interaction in folate-related genes and risk of neural tube defects in a UK population." *J Med Genet* 41(4): 256-260.
102. Rothenberg, S. P., M. P. da Costa, J. M. Sequeira, J. Cracco, J. L. Roberts, J. Weedon and E. V. Quadros (2004). "Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by a neural-tube defect." *N Engl J Med* 350(2): 134-142.
103. RYVEMCE (2008). Annual Report ICBDSR 2008: 172-3, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran, México.
104. S.J., J. (2005). The molecular dynamics of abnormal folate metabolism and DNA methylation: Implications for disease susceptibility and progression. MTHFR Polymorphisms and Disease. R. Rozen. Georgetown Texas, Landes Bioscience: 78-99.
105. Sadler, T. W. (2005). "Embryology of neural tube development." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 135C(1): 2-8.
106. Schoenwolf, G. C. (1988). "Microsurgical analyses of avian neurulation: separation of medial and lateral tissues." *J Comp Neurol* 276(4): 498-507.

107. Schoenwolf, G. C. and M. V. Franks (1984). "Quantitative analyses of changes in cell shapes during bending of the avian neural plate." *Dev Biol* 105(2): 257-272.
108. Sever, L. E. (1995). "Looking for causes of neural tube defects: where does the environment fit in?" *Environ Health Perspect* 103 Suppl 6: 165-171.
109. Sharp, L. and J. Little (2004). "Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review." *Am J Epidemiol* 159(5): 423-443.
110. Shaw, G. M., E. J. Lammer, H. Zhu, M. W. Baker, E. Neri and R. H. Finnell (2002). "Maternal periconceptional vitamin use, genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G), and risk of spina bifida." *Am J Med Genet* 108(1): 1-6.
111. Shaw, G. M., W. Lu, H. Zhu, W. Yang, F. B. Briggs, S. L. Carmichael, L. F. Barcellos, E. J. Lammer and R. H. Finnell (2009). "118 SNPs of folate-related genes and risks of spina bifida and conotruncal heart defects." *BMC Med Genet* 10: 49.
112. Shaw, G. M., E. M. Velie and D. Schaffer (1996). "Risk of neural tube defect-affected pregnancies among obese women." *JAMA* 275(14): 1093-1096.
113. Shi, M., D. Caprau, P. Romitti, K. Christensen and J. C. Murray (2003). "Genotype frequencies and linkage disequilibrium in the CEPH human diversity panel for variants in folate pathway genes MTHFR, MTHFD, MTRR, RFC1, and GCP2." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 67(8): 545-549.
114. Smithells, R. W., S. Sheppard, C. J. Schorah, M. J. Seller, N. C. Nevin, R. Harris, A. P. Read and D. W. Fielding (1981). "Apparent prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation." *Arch Dis Child* 56(12): 911-918.
115. Soler, N. G., C. H. Walsh and J. M. Malins (1976). "Congenital malformations in infants of diabetic mothers." *Q J Med* 45(178): 303-313.
116. Stanislawski-Sachadyn, A., K. S. Brown, L. E. Mitchell, J. V. Woodside, I. S. Young, J. M. Scott, L. Murray, C. A. Boreham, H. McNulty, J. J. Strain and A. S. Whitehead (2008). "An insertion/deletion polymorphism of the dihydrofolate reductase (DHFR) gene is associated with serum and red blood cell folate concentrations in women." *Hum Genet* 123(3): 289-295.
117. Stover, P. J. (2004). "Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease." *Nutr Rev* 62(6 Pt 2): S3-12; discussion S13.

118. Strassburg, M. A., S. Greenland, L. D. Portigal and L. E. Sever (1983). "A population-based case-control study of anencephalus and spina bifida in a low-risk area." *Dev Med Child Neurol* 25(5): 632-641.
119. Suarez, L., K. A. Hendricks, S. P. Cooper, A. M. Sweeney, R. J. Hardy and R. D. Larsen (2000). "Neural tube defects among Mexican Americans living on the US-Mexico border: effects of folic acid and dietary folate." *Am J Epidemiol* 152(11): 1017-1023.
120. Sunder-Plassmann, G. and M. Fodinger (2003). "Genetic determinants of the homocysteine level." *Kidney Int Suppl*(84): S141-144.
121. Tamura, T. and R. L. Goldenberg (1996). "Zinc nutriture and pregnancy outcome." *Nutrition Research* 16(1): 139-181.
122. Theodoratou, E., S. M. Farrington, A. Tenesa, G. McNeill, R. Cetnarskyj, R. A. Barnettson, M. E. Porteous, M. G. Dunlop and H. Campbell (2008). "Dietary vitamin B6 intake and the risk of colorectal cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(1): 171-182.
123. Thunem, N. Y., R. B. Lowry, B. J. Tucker and B. W. Medd (1988). "Birth prevalence and recurrence rates of neural tube defects in southern Alberta in 1970-81." *CMAJ* 138(9): 819-823.
124. Trinh, B. N., C. N. Ong, G. A. Coetzee, M. C. Yu and P. W. Laird (2002). "Thymidylate synthase: a novel genetic determinant of plasma homocysteine and folate levels." *Hum Genet* 111(3): 299-302.
125. Ulrich, C. M., J. Bigler, R. Bostick, L. Fosdick and J. D. Potter (2002). "Thymidylate synthase promoter polymorphism, interaction with folate intake, and risk of colorectal adenomas." *Cancer Res* 62(12): 3361-3364.
126. Ulrich, C. M., J. Bigler, C. M. Velicer, E. A. Greene, F. M. Farin and J. D. Potter (2000). "Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9(12): 1381-1385.
127. Ulrich, C. M., K. Curtin, J. D. Potter, J. Bigler, B. Caan and M. L. Slattery (2005). "Polymorphisms in the reduced folate carrier, thymidylate synthase, or methionine synthase and risk of colon cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(11 Pt 1): 2509-2516.
128. Vallee, B. L. and K. H. Falchuk (1993). "The biochemical basis of zinc physiology." *Physiol Rev* 73(1): 79-118.
129. van der Linden, I. J., M. den Heijer, L. A. Afman, H. Gellekink, S. H. Vermeulen, L. A. Kluijtmans and H. J. Blom (2006). "The methionine synthase

- reductase 66A>G polymorphism is a maternal risk factor for spina bifida." *J Mol Med (Berl)* 84(12): 1047-1054.
130. van der Linden, I. J., S. G. Heil, I. C. Kouwenberg, M. den Heijer and H. J. Blom (2007). "The methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (MTHFD1) 1958G>A variant is not associated with spina bifida risk in the Dutch population." *Clin Genet* 72(6): 599-600.
 131. van der Linden, I. J., U. Nguyen, S. G. Heil, B. Franke, S. Vloet, H. Gellekink, M. den Heijer and H. J. Blom (2007). "Variation and expression of dihydrofolate reductase (DHFR) in relation to spina bifida." *Mol Genet Metab* 91(1): 98-103.
 132. van der Put, N. M., F. Gabreels, E. M. Stevens, J. A. Smeitink, F. J. Trijbels, T. K. Eskes, L. P. van den Heuvel and H. J. Blom (1998). "A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?" *Am J Hum Genet* 62(5): 1044-1051.
 133. van der Put, N. M., R. P. Steegers-Theunissen, P. Frosst, F. J. Trijbels, T. K. Eskes, L. P. van den Heuvel, E. C. Mariman, M. den Heyer, R. Rozen and H. J. Blom (1995). "Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida." *Lancet* 346(8982): 1070-1071.
 134. van der Put, N. M., C. M. Thomas, T. K. Eskes, F. J. Trijbels, R. P. Steegers-Theunissen, E. C. Mariman, A. De Graaf-Hess, J. A. Smeitink and H. J. Blom (1997). "Altered folate and vitamin B12 metabolism in families with spina bifida offspring." *QJM* 90(8): 505-510.
 135. van der Put, N. M., L. P. van den Heuvel, R. P. Steegers-Theunissen, F. J. Trijbels, T. K. Eskes, E. C. Mariman, M. den Heyer and H. J. Blom (1996). "Decreased methylene tetrahydrofolate reductase activity due to the 677C-->T mutation in families with spina bifida offspring." *J Mol Med (Berl)* 74(11): 691-694.
 136. van der Put, N. M., E. F. van der Molen, L. A. Kluijtmans, S. G. Heil, J. M. Trijbels, T. K. Eskes, D. Van Oppenraaij-Emmerzaal, R. Banerjee and H. J. Blom (1997). "Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease." *QJM* 90(8): 511-517.
 137. van der Put, N. M., H. W. van Straaten, F. J. Trijbels and H. J. Blom (2001). "Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview." *Exp Biol Med (Maywood)* 226(4): 243-270.
 138. Vazquez-Sanchez, A. G. (2007). Caracterización genética de variantes alélicas de timidilato sintetasa y dihidrofolato reductasa en una muestra de población mexicana mestiza. Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad Nacional Autónoma de México.

139. Volcik, K. A., G. M. Shaw, E. J. Lammer, H. Zhu and R. H. Finnell (2003). "Evaluation of infant methylenetetrahydrofolate reductase genotype, maternal vitamin use, and risk of high versus low level spina bifida defects." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 67(3): 154-157.
140. Volcik, K. A., G. M. Shaw, H. Zhu, E. J. Lammer, C. Laurent and R. H. Finnell (2003). "Associations between polymorphisms within the thymidylate synthase gene and spina bifida." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 67(11): 924-928.
141. Vollset S. E., B. L. D. (2005). Neural tube defects, other congenital malformations and singlenucleotide polymorphisms in the 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene: A meta-analysis. *MTHFR Polymorphisms and Disease*. R. Rozen. Georgetown, Texas, Landes Bioscience: 125-143.
142. Waller, D. K., J. L. Mills, J. L. Simpson, G. C. Cunningham, M. R. Conley, M. R. Lassman and G. G. Rhoads (1994). "Are obese women at higher risk for producing malformed offspring?" *Am J Obstet Gynecol* 170(2): 541-548.
143. Wang, L., X. Miao, W. Tan, X. Lu, P. Zhao, X. Zhao, Y. Shan, H. Li and D. Lin (2005). "Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase and risk of pancreatic cancer." *Clin Gastroenterol Hepatol* 3(8): 743-751.
144. Wang, L. D., R. F. Guo, Z. M. Fan, X. He, S. S. Gao, H. Q. Guo, K. Matsuo, L. M. Yin and J. L. Li (2005). "Association of methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase promoter polymorphisms with genetic susceptibility to esophageal and cardia cancer in a Chinese high-risk population." *Dis Esophagus* 18(3): 177-184.
145. Watkins, D., M. Ru, H. Y. Hwang, C. D. Kim, A. Murray, N. S. Philip, W. Kim, H. Legakis, T. Wai, J. F. Hilton, B. Ge, C. Dore, A. Hosack, A. Wilson, R. A. Gravel, B. Shane, T. J. Hudson and D. S. Rosenblatt (2002). "Hyperhomocysteinemia due to methionine synthase deficiency, cblG: structure of the MTR gene, genotype diversity, and recognition of a common mutation, P1173L." *Am J Hum Genet* 71(1): 143-153.
146. Weisberg, I., P. Tran, B. Christensen, S. Sibani and R. Rozen (1998). "A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity." *Mol Genet Metab* 64(3): 169-172.
147. Wenstrom, K. D., G. L. Johanning, J. Owen, K. E. Johnston, S. Acton, S. Cliver and T. Tamura (2000). "Amniotic fluid homocysteine levels, 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase genotypes, and neural tube closure sites." *Am J Med Genet* 90(1): 6-11.

148. Wilding, C. S., C. L. Relton, M. J. Sutton, P. A. Jonas, S. A. Lynch, E. J. Tawn and J. Burn (2004). "Thymidylate synthase repeat polymorphisms and risk of neural tube defects in a population from the northern United Kingdom." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 70(7): 483-485.
149. Wilson, A., R. Platt, Q. Wu, D. Leclerc, B. Christensen, H. Yang, R. A. Gravel and R. Rozen (1999). "A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida." *Mol Genet Metab* 67(4): 317-323.
150. Yamada, K., Z. Chen, R. Rozen and R. G. Matthews (2001). "Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26): 14853-14858.
151. Yan, L., L. Zhao, Y. Long, P. Zou, G. Ji, A. Gu and P. Zhao (2012). "Association of the maternal MTHFR C677T polymorphism with susceptibility to neural tube defects in offsprings: evidence from 25 case-control studies." *PLoS One* 7(10): e41689.
152. Yang, Q. H., L. D. Botto, M. Gallagher, J. M. Friedman, C. L. Sanders, D. Koontz, S. Nikolova, J. D. Erickson and K. Steinberg (2008). "Prevalence and effects of gene-gene and gene-nutrient interactions on serum folate and serum total homocysteine concentrations in the United States: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey DNA Bank." *Am J Clin Nutr* 88(1): 232-246.
153. Yates, J. R., M. A. Ferguson-Smith, A. Shenkin, R. Guzman-Rodriguez, M. White and B. J. Clark (1987). "Is disordered folate metabolism the basis for the genetic predisposition to neural tube defects?" *Clin Genet* 31(5): 279-287.
154. Yoshimi, A., B. Aleksic, Y. Kawamura, N. Takahashi, S. Yamada, H. Usui, S. Saito, Y. Ito, N. Iwata, T. Inada, Y. Noda, K. Yamada and N. Ozaki (2010). "Gene-wide association study between the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) and schizophrenia in the Japanese population, with an updated meta-analysis on currently available data." *Schizophr Res* 124(1-3): 216-222.
155. Zetterberg, H., M. Palmer, C. Borestrom, L. Rymo and K. Blennow (2003). "The transcobalamin codon 259 polymorphism should be designated 776C>G, not 775G>C." *Blood* 101(9): 3749-3750; author reply 3750-3741.
156. Zhu, H., N. J. Wicker, G. M. Shaw, E. J. Lammer, K. Hendricks, L. Suarez, M. Canfield and R. H. Finnell (2003). "Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risks for neural tube defects." *Mol Genet Metab* 78(3): 216-221.

ANEXO I

Resultados del análisis MDR para las combinaciones posibles, de dos hasta cuatro variantes. Se observan en negritas los valores de TA cercanos a la significancia estadística.

Combinación		TBA	<i>p</i>	OR	IC
MTHFRC667T	MTHFRA1298C	0.428	0.308	0.559	(0.182-1.716)
MTHFRC667T	MTRA2756G	0.486	0.842	0.893	(0.294-2.714)
MTHFRC667T	MTRRA66G	0.514	0.838	1.126	(0.358-3.536)
MTHFRC667T	MTHFD1G1958A	0.452	0.496	0.678	(0.222-2.074)
MTHFRC667T	TCNIIC776G	0.466	0.622	0.751	(0.241-2.345)
MTHFRA1298C	MTRA2756G	0.570	0.313	1.795	(1.250-2.576)
MTHFRA1298C	MTRRA66G	0.560	0.390	1.641	(0.528-5.092)
MTHFRA1298C	MTHFD1G1958A	0.564	0.361	1.688	(0.546-5.215)
MTHFRA1298C	TCNIIC776G	0.514	0.840	1.122	(0.363-3.467)
MTRA2756G	MTRRA66G	0.478	0.755	0.838	(0.276-2.544)
MTRA2756G	MTHFD1G1958A	0.522	0.750	1.202	(0.386-3.744)
MTRA2756G	TCNIIC776G	0.532	0.636	1.322	(0.414-4.225)
MTRRA66G	MTHFD1G1958A	0.568	0.335	1.731	(0.564-5.308)
MTRRA66G	TCNIIC776G	0.486	0.842	0.892	(0.292-2.724)
MTHFD1G1958A	TCNIIC776G	0.502	0.976	1.017	(0.323-3.198)

Combination			TBA	p	OR	IC
MTHFRC667T	MTHFRA1298C	MTRA2756G	0.530	0.670	1.273	(0.418-3.879)
MTHFRC667T	MTHFRA1298C	MTRRA66G	0.502	0.977	1.016	(0.328-3.143)
MTHFRC667T	MTHFRA1298C	THFD1G1958A	0.530	0.669	1.274	(0.417-3.893)
MTHFRC667T	MTHFRA1298C	TCNIIC776G	0.506	0.932	1.049	(0.345-3.188)
MTHFRC667T	MTRA2756G	MTRRA66G	0.522	0.753	1.197	(0.389-3.678)
MTHFRC667T	MTRA2756G	MTHFD1G1958A	0.534	0.628	1.318	(0.430-4.035)
MTHFRC667T	MTRA2756G	TCNIIC776G	0.542	0.552	1.400	(0.460-4.260)
MTHFRC667T	MTRRA66G	MTHFD1G1958A	0.558	0.411	1.595	(0.521-4.880)
MTHFRC667T	MTRRA66G	TCNIIC776G	0.566	0.349	1.706	(0.555-5.240)
MTHFRC667T	THFD1G1958A	TCNIIC776G	0.498	0.977	0.984	(0.324-2.983)
MTHFRA1298C	MTRA2756G	MTRRA66G	0.558	0.411	1.597	(0.521-4.890)
MTHFRA1298C	MTRA2756G	THFD1G1958A	0.582	0.224	2.077	(0.633-6.809)
MTHFRA1298C	MTRA2756G	TCNIIC776G	0.554	0.437	1.566	(0.503-4.871)
MTHFRA1298C	MTRRA66G	MTHFD1G1958A	0.582	0.246	1.939	(0.630-5.971)
MTHFRA1298C	MTRRA66G	TCNIIC776G	0.514	0.835	1.131	(0.353-3.618)
MTHFRA1298C	MTHFD1G1958A	TCNIIC776G	0.532	0.650	1.293	(0.425-3.935)
MTRA2756G	MTRRA66G	MTHFD1G1958A	0.564	0.351	1.728	(0.544-5.484)
MTRA2756G	MTRRA66G	TCNIIC776G	0.510	0.887	1.083	(0.357-3.284)
MTRA2756G	MTHFD1G1958A	TCNIIC776G	0.556	0.427	1.571	(0.513-4.806)
MTRRA66G	MTHFD1G1958A	TCNIIC776G	0.550	0.479	1.493	(0.490-4.553)

Combinaciones				TBA	p	OR	IC
MTHFRC667T	MTHFRA1298C	MTRA2756G	MTRRA66G	0.510	0.881	1.093	(0.339-3.518)
MTHFRC667T	MTHFRA1298C	MTRA2756G	MTHFD1G1958A	0.538	0.590	1.356	(0.445-4.129)
MTHFRC667T	MTHFRA1298C	MTRA2756G	TCNIIC776G	0.546	0.510	1.459	(0.472-4.509)
MTHFRC667T	MTHFRA1298C	MTRRA66G	MTHFD1G1958A	0.588	0.212	2.040	(0.660-6.302)
MTHFRC667T	MTHFRA1298C	MTRRA66G	TCNIIC776G	0.528	0.692	1.251	(0.412-3.802)
MTHFRC667T	MTHFRA1298C	MTHFD1G1958A	TCNIIC776G	0.568	0.336	1.729	(0.564-5.295)
MTHFRC667T	MTRA2756G	MTRRA66G	MTHFD1G1958A	0.546	0.515	1.446	(0.475-4.405)
MTHFRC667T	MTRA2756G	MTRRA66G	TCNIIC776G	0.602	0.113	2.488	(0.797-7.761)
MTHFRC667T	MTRA2756G	MTHFD1G1958A	TCNIIC776G	0.510	0.887	1.083	(0.357-3.283)
MTHFRC667T	MTRRA66G	MTHFD1G1958A	TCNIIC776G	0.566	0.348	1.707	(0.555-5.248)
MTHFRA1298C	MTRA2756G	MTRRA66G	MTHFD1G1958A	0.568	0.331	1.747	(0.564-5.412)
MTHFRA1298C	MTRA2756G	MTRRA66G	TCNIIC776G	0.534	0.628	1.318	(0.430-4.042)
MTHFRA1298C	MTRA2756G	MTHFD1G1958A	TCNIIC776G	0.574	0.293	1.823	(0.591-5.619)
MTHFRA1298C	MTRRA66G	MTHFD1G1958A	TCNIIC776G	0.602	0.146	2.315	(0.739-7.255)
MTRA2756G	MTRRA66G	MTHFD1G1958A	TCNIIC776G	0.542	0.546	1.416	(0.456-4.393)