



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRÁN

**“ANÁLISIS DE VARIANTES GÉNICAS DE BAJA FRECUENCIA COMO
FACTORES DE RIESGO PARA MIELOMENINGOCELE EN FAMILIAS
MEXICANAS MESTIZAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA

ADRIANA NOHEMÍ VELÁZQUEZ BURCIAGA

TUTOR

DR. OSVALDO MÁXIMO MUTCHINICK BARINGOLTZ



CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Osvaldo Mutchinick por la oportunidad de realizar la especialidad en este Instituto, por sus grandes enseñanzas, anécdotas, paciencia y ánimos; además de toda la orientación en la elaboración de esta tesis. Evidentemente nada de esto hubiera sido posible sin usted, muchas gracias por creer en mí.

Al Dr. Adolfo Aguayo por ilustrarme y ayudarme en cada paso de este proyecto y por siempre estar dispuesto a auxiliarme.

A mi familia por el amor, el apoyo incondicional, por todo el esfuerzo que han invertido en mí y por impulsarme siempre a alcanzar mis metas.

A la Fundación Teletón México, A.C. y al CONACYT (S0008-SALUD 2013-1-201547) por el apoyo con la recolección de las muestras y por el financiamiento al proyecto de investigación.

A los pacientes y sus familias por su desinteresada y valiosa participación sin la cual este estudio no se hubiera podido realizar.

CONTENIDO

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
Embriología.....	8
Neurulación primaria	9
Neurulación primaria en ratones	9
Neurulación primaria en humanos	11
Neurulación secundaria.....	11
Moldeamiento de la placa neural	12
Plegamiento de los pliegues neurales	13
Neurulación craneal.....	14
Adhesión y fusión de los pliegues neurales	14
Regulación de la proliferación y muerte celular	15
Clasificación de los defectos de cierre del tubo neural	16
Etiología multifactorial de los defectos de cierre del tubo neural en humanos	21
Factores ambientales.....	21
Factores genéticos.....	24
Variantes génicas de baja frecuencia	30
HIPÓTESIS	31
OBJETIVO GENERAL.....	32
Objetivos específicos	32
MATERIAL Y MÉTODOS	32
Genotipificación	33
Criterios de selección de las variantes	33
Análisis estadístico.....	33
RESULTADOS.....	34
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	36
REFERENCIAS.....	41
ANEXOS:	48

RESUMEN

Introducción

El mielomeningocele (MMC) es una malformación congénita frecuente, con prevalencia de $\approx 1/1,000$ recién nacidos. La etiología es multifactorial. Se planteó que variantes génicas poco frecuentes podrían explicar parte de la etiología genética desconocida. El objetivo fue analizar si variantes génicas con frecuencia alélica menor del 10% son factores de riesgo para MMC.

Material y métodos

Se estudiaron 500 tríos (caso, madre y padre) de 16 Centros de Rehabilitación Infantil Teletón y un grupo control de 500 recién nacidos no malformados. Se genotipificó mediante microarreglos GoldenGate de Illumina®, que incluyó 768 variantes génicas. Se obtuvieron 161 variantes con frecuencia del alelo menor $<10\%$ en controles. Se analizaron frecuencias alélicas, genotípicas, desequilibrio de transmisión (TDT) y de interacción gen-gen, con Plink y Stata y se consideró diferencia estadísticamente significativa (DES) una $p < 0.05$ ajustada por control genómico.

Resultados

El análisis de asociación mostró DES de riesgo para MMC en variantes de los genes *CFL1*, *GAS1* y *APH1B*, con razón de momios (RM) de 1.64 a 1.97. El análisis de TDT mostró desequilibrio para la variante *PCNT* (rs35940413) con una RM de 1.63. Se observaron interacciones gen-gen de riesgo en variantes de sentido erróneo entre *PCNT*, *KDR*, *MMAA*, *TSC1*, *APEX1*, *CBS* y *CELSR1*.

Discusión y conclusiones

El MMC es un problema de salud pública por su frecuencia y complejidad. La variante *CFL1* (rs11227332), está reportada de riesgo para espina bífida en humanos. El gen *GAS1* se asocia a holoprosencefalia y regula a *Shh*. El gen *PCNT* es esencial para el centrosoma y mutaciones bialélicas causan enanismo osteodisplásico microcefálico tipo II. El análisis de interacción gen-gen mostró DES entre genes que participan en el centrosoma, apoptosis, biosíntesis de cisteína, metabolismo de cobalamina, regulación de mTOR y polaridad celular planar. Los resultados muestran que variantes de genes candidato de baja frecuencia son posibles factores de riesgo genético para MMC.

INTRODUCCIÓN

Los defectos congénitos comprenden un grupo de condiciones, que incluyen alteraciones físicas o bioquímicas, que se encuentran presentes al nacimiento, entre las cuales se incluyen las malformaciones, disrupciones, deformaciones y displasias (1).

Las malformaciones congénitas (MC) son anomalías morfológicas presentes al nacimiento, no progresivas, de un órgano o parte del cuerpo debido a una alteración primaria e intrínseca del proceso del desarrollo. En este, determinada estructura, tejido u órgano no se desarrolla correctamente, se forma parcialmente o lo hace de manera anormal. Típicamente ocurren durante el periodo embrionario e involucran vías celulares y moleculares de la organogénesis, lo que explica que la mayoría ocurren dentro de las primeras ocho semanas post-fecundación (2). Sin embargo, las malformaciones también pueden darse en estructuras que se desarrollan o que continúan su desarrollo posterior a esta etapa como lo son el sistema nervioso central, genitales internos y externos y los dientes (3).

Las MC suelen clasificarse en mayores y menores. Se consideran malformaciones congénitas mayores aquellas que limitan la función de un órgano o parte del cuerpo, inducen cambios que afectan los aspectos estéticos, lo que se traduce en pérdida de la autoestima y repercute en la adaptación social del paciente con el defecto. Las MC menores son las que alteran de manera leve el fenotipo, sin afectar la función del órgano o tejido, su reparación quirúrgica es fácil y se logra la restitución del defecto (4).

La prevalencia general para defectos congénitos en recién nacidos vivos, se calcula del 3 al 5% a nivel mundial (1).

En México, aproximadamente el 14% de los recién nacidos vivos tiene una malformación menor única, el 3% una malformación mayor única y el 0.7% múltiples MC mayores y menores (5). En mortinatos, el 10% presenta MC mayores y la frecuencia es aún mayor en los primeros meses de la gestación, pero estos fetos son abortados de manera espontánea en la mayoría de los casos (5).

Tabla 1. Prevalencia por 10,000 de malformaciones por sexo en un total de 1,116,898 nacidos vivos examinados: RYVEMCE 1978 a 2009 (4)

Malformación	Sexo						Total n=1,116,989	
	Masculino n=571,134		Femenino n=545,578		Intersexo n=186			
	n	Prev	n	Prev	n	Prev	n	Prev
Síndrome de Down	740	12.96	692	12.68	0	0	1432	12.82
Espina bífida	647	11.33	696	12.76	11	591.40	1354	12.12
Labio hendido con o sin paladar hendido	810	14.18	525	9.62	9	483.87	1344	12.03
Polidactilia	726	12.71	603	11.05	11	591.40	1340	12.00
Anotia / microtia	538	9.42	437	8.01	7	376.34	982	8.79
Hipospadias	428	7.49	0	0	44	2365.59	472	8.26
Anomalía en reducción de miembros	313	5.48	286	5.24	15	806.45	614	5.50
Hidrocefalia	297	5.20	262	4.80	7	376.34	566	5.07
Anencefalia	132	2.31	242	4.44	3	161.29	377	3.38
Ano imperforado	212	3.71	105	1.92	45	2419.35	362	3.24
Paladar hendido	130	2.28	183	3.35	3	161.29	316	2.83
Atresia de esófago	110	1.93	108	1.98	6	322.58	224	2.01
Gastrosquisis	107	1.87	105	1.92	3	161.29	215	1.92
Microcefalia	85	1.49	122	2.24	3	161.29	210	1.88
Encefalocele	91	1.59	109	2.00	2	107.53	202	1.81
Anoftalmia / microftalmia	86	1.51	96	1.76	2	107.53	184	1.65
Onfalocele	80	1.40	55	1.01	11	591.40	146	1.31

En la población mexicana mestiza la espina bífida en sus distintas variedades, el labio hendido con o sin paladar hendido y la polidactilia son las malformaciones congénitas más frecuentes con prevalencias al nacimiento de 1:825, 1:831 y 1:833 recién nacidos vivos respectivamente (4).

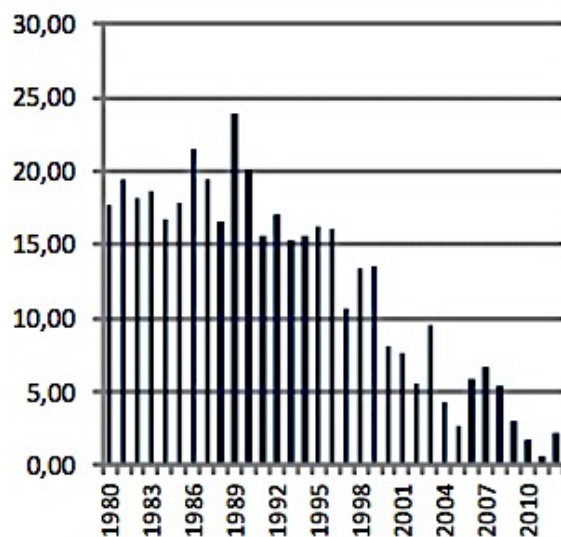
Los defectos de cierre del tubo neural son un importante problema de salud pública. A nivel mundial, se estima que cada año nacen aproximadamente 300,000 niños con defectos de cierre del tubo neural, que resulta en aproximadamente 88,000 muertes y 8,6 millones de años de vida ajustados en función de la discapacidad (6).

La espina bífida es una malformación congénita en la cual la columna vertebral no se desarrolla normalmente en las primeras semanas del embarazo. Provoca daños permanentes en la médula espinal y el sistema nervioso y puede dar lugar a parálisis de los miembros inferiores o problemas funcionales del intestino y la vejiga. El riesgo de la espina bífida se puede reducir hasta en un 70% si antes del embarazo la madre ingiere diariamente 400µg de ácido fólico como suplemento de una dieta balanceada (7).

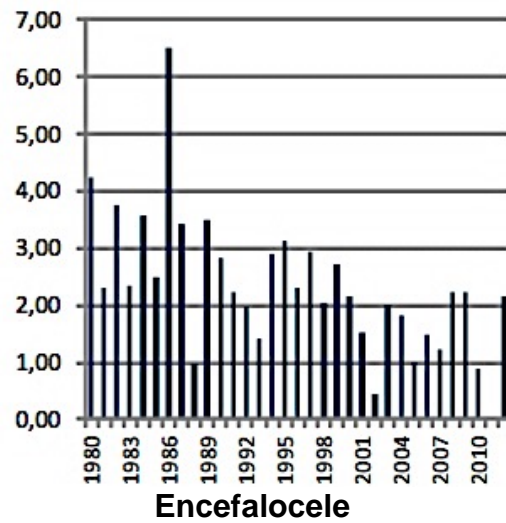
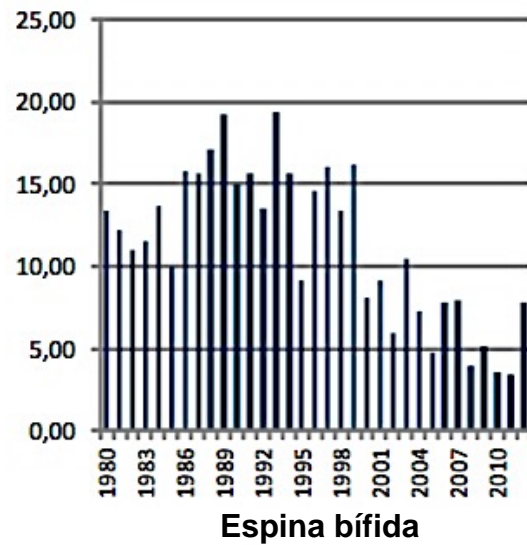
Espina bífida es un término amplio que comprende varios subgrupos de defectos incluyendo mielomeningocele (MMC), meningocele y lipomeningocele. El MMC, es la protrusión del tejido nervioso y su cubierta a través de un defecto en las vértebras. El MMC es la forma más frecuente de la espina bífida, representando aproximadamente el 90% de los casos de espina bífida (8).

La prevalencia de espina bífida en México reportada por el Registro Y Vigilancia Epidemiológica de Malformaciones Congénitas (RYVEMCE) en el año 2012 fue de 7.85 por 10,000. La prevalencia de defectos de cierre del tubo neural (espina bífida, anencefalia y encefalocele) en el mismo año reportada por el RYVEMCE fue de 12.13 por 10,000.

**México: RYVEMCE, tendencia en el tiempo 1980-2012
(Prevalencias al nacimiento por 10,000)**



Anencefalia



Embriología

La formación y el cierre del tubo neural se producen entre los días 17 y 28 (Figura 1) del desarrollo embrionario (9) y se divide en las siguientes etapas:

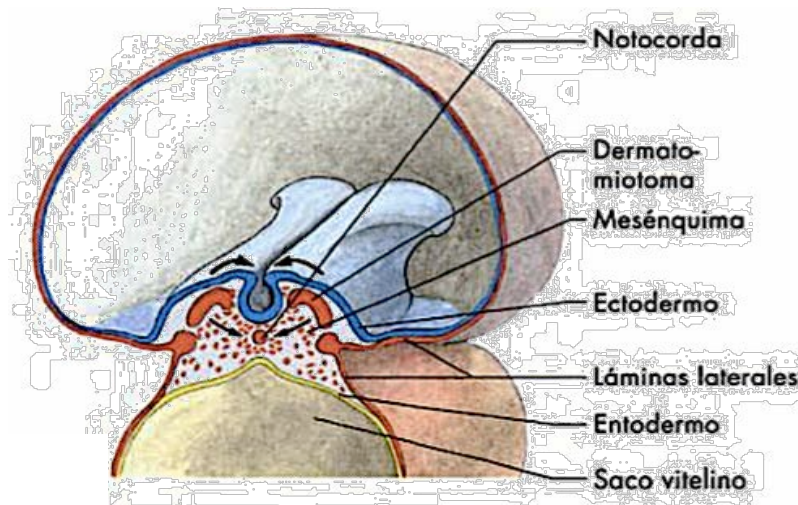


Figura 1. Formación del embrión en el día 22 post-fecundación. El disco embrionario, en el cual ocurre la formación del tubo neural (en azul), se vuelve más voluminoso (10).

Neurulación primaria

En el futuro cerebro y la médula espinal, la formación del tubo neural implica esencialmente el doblamiento del neuroepitelio en la línea media para generar pliegues neurales que se elevan, se encuentran y se fusionan en la línea media dorsal, lo que se denomina *neurulación primaria* (Figura 2). El cierre del tubo neural es un proceso discontinuo con sitios distintos de iniciación ubicados en niveles axiales característicos (9). Los mecanismos morfogénéticos y moleculares para el cierre del tubo neural varían dependiendo de su localización, por lo que un subfenotipo de DCTN determinado generalmente afecta a una misma región del tubo neural (11).

Neurulación primaria en ratones

El cierre primero se alcanza en el día embrionario 8.5 a nivel del límite entre el rombencéfalo y la región cervical, lo que corresponde al cierre 1 (Figura 3). Una falla en este evento genera una craneoraquisquisis (12). El cierre 2 se lleva a cabo en el día embrionario 9, en el prosencéfalo caudal o en el límite entre el prosencéfalo y el mesencéfalo (Figura 3). Una vez establecido el contacto y la fusión entre las puntas de los pliegues neurales, el cierre se propaga de manera bidireccional entre los sitios de cierre 1 y 2; además, en una dirección caudal desde el extremo rostral del tubo neural, que corresponde al punto de cierre 3 (Figura 3)

(9). Las regiones abiertas de los pliegues neurales, nombrados neuroporos, se acortan gradualmente, llevando a un cierre completo del neuroporo anterior, que es el que se localiza entre los cierres 2 y 3, en el día embrionario 9 y el neuroporo del rombencéfalo, que se encuentra entre los cierres 1 y 2, cierra unas horas después (11). Los DCTN craneales, como la anencefalia, resultan de una falla en el cierre 2, o de una falla en la progresión del acortamiento del neuroporo entre los cierres 1 y 2 (13).

La neurulación espinal, a diferencia del proceso craneal que es bidireccional, es únicamente dirigida caudalmente. La neurulación primaria se completa con el cierre del neuroporo posterior, que ocurre en el día embrionario 10. Una alteración en la progresión del cierre, y la consecuente persistencia del neuroporo posterior, resulta en espina bífida y el tamaño de la lesión se correlaciona directamente con el nivel en el que ocurra dicha alteración (11).

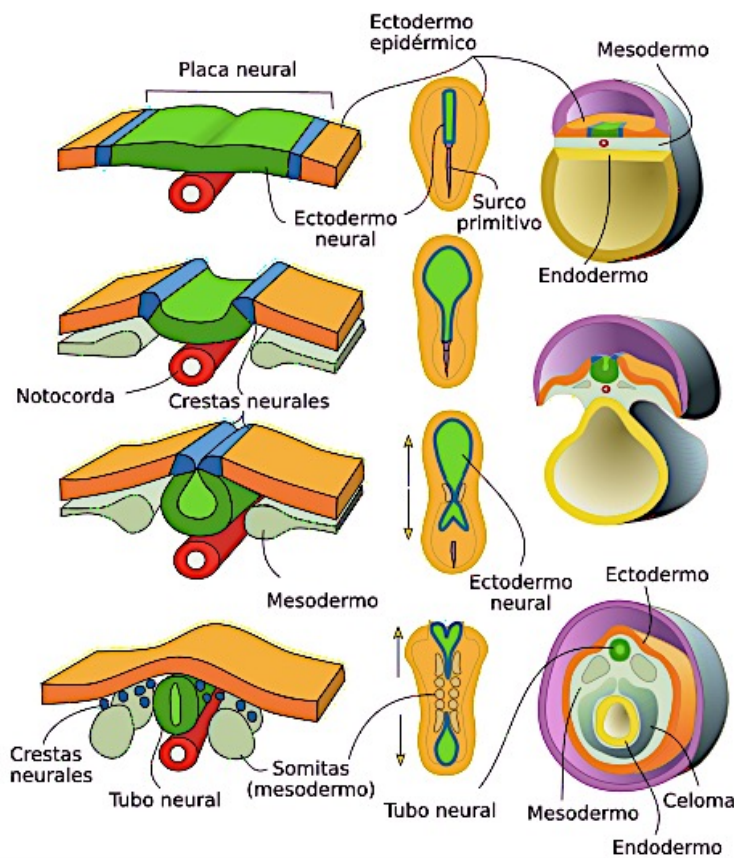


Figura 2. Esquematación de neurulación primaria. Las células que rodean la placa neural dirigen a las células de la placa neural a proliferar, invaginar y separarse del ectodermo (14).

Neurulación primaria en humanos

Distintos estudios en embriones humanos sugieren que el cierre, así como en ratones, es discontinuo (15),(16). El plegamiento de la placa neural inicia aproximadamente en el día 18 post fertilización, con un evento equivalente al cierre 1 de los ratones en el día 21 y el cierre completo del neuroporo posterior hacia los días 26-28 post fertilización. Aparentemente el cierre del prosencéfalo y del mesencéfalo en embriones humanos se alcanza por la progresión entre el sitio de cierre 1 y el extremo rostral de la placa neural sin la intervención del sitio de iniciación análogo al cierre 2 (16),(17).

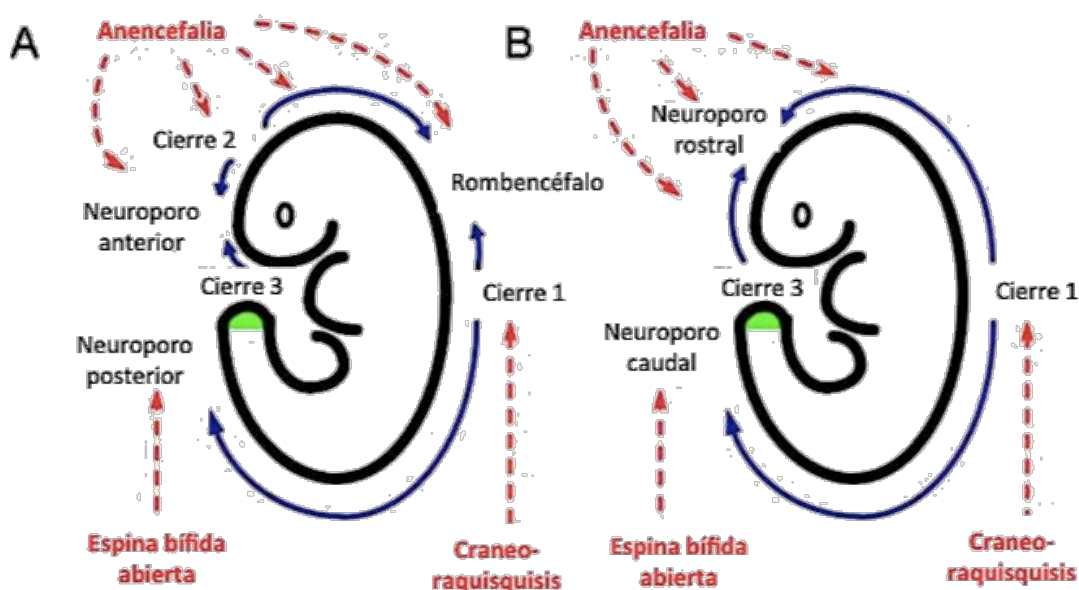


Figura 3. Representación del cierre del tubo neural y el origen de los DCTN en embriones de ratones (A) y de humanos (B) (18).

Neurulación secundaria

El tubo neural caudal a la región sacra media es continuo con el extremo caudal del tubo neural primario, pero se forma por un proceso distinto, denominado *neurulación secundaria*, tanto en ratones como en humanos (Figura 4). El proceso involucra la condensación de las células del primordio de la cola para formar un cordón epitelial que se canaliza para formar el lumen del tubo en las regiones sacra baja y coccígea (9). Las malformaciones que resultan de una alteración de la neurulación secundaria son cerradas y a menudo implican el síndrome de médula anclada con material lipomatoso ectópico asociado (11).

Neurulación secundaria: días 26-42

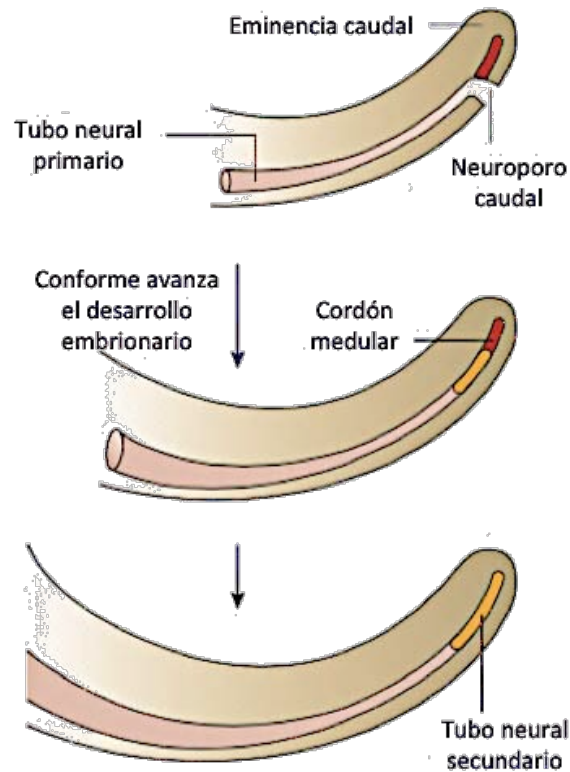


Figura 4. Representación sagital del proceso de neurulación secundaria, la cual involucra la condensación de la eminencia caudal, seguida de la canalización o formación del lumen, la terminación de la neurulación secundaria y la regresión de la cola. Este proceso finaliza en la 6ta semana post-fertilización (19).

Moldeamiento de la placa neural

Junto con el cierre del tubo neural, la placa neural sufre un estrechamiento en el eje medio-lateral, es decir, convergencia y elongación o extensión del eje rostrocaudal. Esta extensión convergente depende de la actividad de la vía de señalización no canónica de *Wnt*. La señalización ocurre vía receptores de membrana *Frizzled* y *Dishevelled* citoplásmico pero sin estabilización de β *catenina* (11). La disrupción funcional en los mediadores de la polaridad celular planar (PCP) previene la extensión convergente y la placa neural permanece ancha en embriones de *Xenopus* y ratones. Por lo que el cierre 1 falla, causando craneoraquisquisis en ratones homocigotos para mutaciones en genes esenciales para la PCP, incluyendo *Vangl2*, *Celsr1*, *Dvl-1*, *Dvl-2*, *Fzd-3* y *Fzd-6* (20). La craneoraquisquisis también resulta de mutación en los genes relacionados a la PCP *Scrb1* (21) y *Ptk7* (22) o en genes que codifican para proteínas accesorias como *Sec24b*, que afecta el transporte de *Vangl2* (23). La falla en la iniciación del cierre en embriones

mutantes para los principales genes de PCP se postula que resulta de la proximidad insuficiente de los pliegues neurales.

La espina bífida ocurre en algunos heterocigotos de cola en asa (*Vangl2*^{Lp/+}) (24) y en heterocigotos compuestos de *Vangl2*^{Lp/+} con mutaciones en *Ptk7*, *Sec24b* o *Sdc4* (25),(22),(23). Por otra parte, la señalización no canónica de *Wnt* está comprometida en embriones nulos para *Lrp6* que desarrollan espina bífida (26). Dichos estudios sugieren que la señalización de la PCP continúa siendo requerida conforme progresa la neurulación.

Plegamiento de los pliegues neurales

Para lograr el cierre del tubo neural, se requiere que el neuroepitelio se doble para que los extremos de los pliegues neurales logren la aposición. El plegamiento en ratones se lleva a cabo en sitios de articulación de bisagra: un punto medio de la bisagra en línea media y puntos pareados dorsolaterales (27) y existen distintos modos en regiones superior, media espinal y caudal del tubo neural espinal primario. Los mecanismos subyacentes del plegamiento neuroepitelial no se han dilucidado por completo, pero una característica notable de la región medio espinal es la predominancia de las células con forma de cuña, que son más anchas en la región basal que en la apical, en comparación con regiones de no plegamiento (28). El plegamiento está regulado por señalización que emiten tejidos no neurales dorsales y centrales a los pliegues neurales. El punto de bisagra medio espinal es inducido por señalización de la notocorda, localizada ventral a la línea media del neuroepitelio (29),(30). A nivel molecular, la señalización de *Shh* derivada de la notocorda induce el piso de la placa del tubo neural en el punto medio espinal de bisagra (31),(32). Sin embargo, esta acción no es esencial para el cierre del tubo neural, el cual se completa en ausencia del piso de la placa del tubo neural en embriones de ratones con desactivación génica de *Shh* o *FoxA2* (11). A diferencia del punto de bisagra medio espinal, el punto dorsolateral aparenta ser esencial para el cierre del tubo neural en la región baja espinal. En embriones mutantes para *Zic2*, en los que está ausente el punto de bisagra dorsolateral, desarrollan espina bífida grave (30).

La formación del punto de bisagra dorsolateral está activamente regulada. Esta regulación incluye efectos inhibitorios de *Shh* desde la notocorda y la señalización de *BMP* desde el ectodermo superficial en las puntas dorsales de los pliegues neuronales. Estas señales son contrarrestadas por el principio antagonista de *BMP*, cuya expresión en los pliegues neurales dorsales es suficiente para inducir el punto de bisagra dorsolateral (30),(33). En contraste con los efectos de la ausencia de señalización de *Shh*, los DCTN sí surgen de mutaciones que incrementan la señalización de *Shh*, por ejemplo, a través de la función inhibitoria deficiente o de genes relacionados con los cilios como *Gli3*, *Rab23*, *Fkbp8*, *Tulp3* e *Ift40* (34),(35).

Neurulación craneal

Los pliegues neuronales en la región craneal se doblan en la línea media y dorsolateralmente, como en la región medio espinal, pero el proceso del cierre es más complejo y sensible a alteraciones en roedores. Disrupciones en el citoesqueleto de actina previenen el cierre en la región craneal, mas no en la espinal (11).

Los microfilamentos de actina apicales están presentes en el neuroepitelio y la disrupción funcional de las proteínas asociadas al citoesqueleto como la proteína relacionada a *MARCKS* (proteína del sustrato de C-cinasa rica en alanina miristolada) y *Shroom3* causa DCTN tanto craneales como espinales, sugiriendo que la regulación del citoesqueleto de actomiosina tiene un papel en el cierre de ambas regiones (36),(37). Las proteínas *Shroom* aparentan tener un papel clave, la expresión de *Shroom* en *Xenopus* es suficiente para inducir la constricción apical de las células epiteliales, mientras que la disrupción funcional inhibe el plegamiento del tubo neural y reprime el cierre (38).

Adhesión y fusión de los pliegues neuronales

Una vez que los pliegues neuronales se aproximaron en la línea media, se lleva a cabo el proceso de adhesión, fusión y remodelamiento. En todos los niveles, el contacto inicial incluye protrusiones subcelulares (39),(40). No se ha caracterizado bien la base molecular de la adhesión, sin embargo, se sugiere que los receptores *ephrin* de superficie celular con ligandos Eph tienen un papel por la ocurrencia de

DCTN craneales en ratones sin la expresión de ephrina-A5 ó EphA7 y por el retraso en el cierre espinal en embriones de ratones expuestos a péptidos que bloquean la interacción ephrina-A/EphA (41, 42).

Regulación de la proliferación y muerte celular

El mantenimiento adecuado de la proliferación celular del neuroepitelio parece ser crucial para el cierre, particularmente en la región craneal. Por lo que en ratones, los DCTN pueden ser causados por exposición a agentes antimitóticos o por mutación en genes que codifican para proteínas asociadas a la progresión del ciclo celular (43),(44). Además, ocurren patrones característicos de muerte celular en los pliegues neurales y en la línea media del tubo neural cerrado. Una muerte celular incrementada podría afectar el cierre al comprometer la integridad mecánica o funcional del neuroepitelio (10).

Tabla 2. Malformaciones del SNC y estadio del desarrollo en el que ocurren (45).

Estadio gestacional	Malformación del sistema nervioso
Semana 3-4 Inducción dorsal: formación y cierre del tubo neural	Anencefalia, encefalocele, malformación de Arnold Chiari, disrafismos espinales
Semana 5-8 Inducción ventral: formación de las vesículas cerebrales	Holoprosencefalia, agenesia del cuerpo calloso, malformación de Dandy-Walker, anomalías faciales
Meses 3-6 Proliferación, migración neuronal e histogénesis	Heterotopias, agiria-paquigiria, polimicrogria, malformaciones vasculares, teratomas, facomatosis
Meses 7-15 Organización y mielinización neuronal	Retraso en el desarrollo, enfermedades desmielinizantes.

Clasificación de los defectos de cierre del tubo neural

El disrafismo se refiere a la falla de la fusión normal en la línea media y es un término general usado para describir al conjunto de anomalías que involucran defectos en las vértebras, médula espinal o raíces nerviosas (46).

La espina bífida es el término más empleado para estas lesiones disráficas y se define como una falla embriológica de la fusión de uno o más arcos vertebrales (46).

Tabla 3. Clasificación clínica de los defectos de cierre de tubo neural (46)

Defectos de tubo neural abiertos
Mielomeningocele
Mielosquisis
Hemimielomeningocele
Defectos de tubo neural cerrados
Meningocele
Posterior: lumbar, sacro, torácico
Posterior: cervical y mielosquisis dorsal limitado
Anterior: sacro
Mielocistocele
Malformación lipomatosa
Filum terminal anormal
Seno dérmico congénito
Diastematomielia
Quiste neuroentérico
Defectos de tubo neural asociados a síndrome de regresión caudal

Los DCTN se dividen en abiertos y cerrados. Los abiertos son los que tienen expuesto tejido neural y continuamente o intermitentemente se fuga líquido cefalorraquídeo. En cuanto a los cerrados, son aquellos que no presentan tejido neural visible ni se fuga líquido cefalorraquídeo (47).

Defectos de cierre del tubo neural abiertos

El defecto de cierre de tubo neural abierto más común es el MMC. En él, existe un defecto de los arcos vertebrales posteriores a través del cual protruyen las meninges y la médula espinal. Existe pérdida intermitente o continua de líquido cefalorraquídeo a través del defecto lo que resulta en alteración de todo el sistema nervioso central (48).

La mielosquisis es una forma de defecto abierto del cierre de tubo neural en la que no existe componente quístico. La placoda neural, que es un segmento de tejido neural no neurulado, que no se desarrolla en el estadio de placa neural, se encuentra cubriendo la pared ventral del canal espinal y continuamente drena líquido cefalorraquídeo (46). Lo anterior, produce una malformación de Chiari tipo II y alteración en la migración del cerebro (49), la cual es una condición muy rara, que corresponde al 1.2% de las disrafias abiertas (46).

El hemimielomeningocele es una forma muy rara de defecto de cierre en la que se presentan interrupciones en los procesos tanto de preneurulación como en neurulación y resultan en un cordón espinal hendido, cerrado en un lado y abierto en el otro (MMC) (46).

Defectos del tubo neural cerrados

El meningocele en la región lumbar o sacra resulta de una malformación en la secuencia de neurulación secundaria. En estos casos, habitualmente la exploración neurológica es normal, debido a que la alteración ocurre sin pérdida de líquido cefalorraquídeo (50).

En el caso de los meningoceles cervicales o dorsales, el defecto ocurre en el proceso de neurulación primario. Se ha postulado que esta alteración se presenta durante la gastrulación, como un tracto anormal endomesenquimal de línea media

que divide la notocorda y la placa neural y produce un trastorno secundario en el proceso de neurulación primaria (51).

Meningocele sacro anterior:

Son lesiones ocultas que se forman como resultado de un defecto en la embriogénesis que involucra la masa celular caudal, por lo que frecuentemente se asocian con anomalías renales, pélvicas, rectales y vertebrales, así como con quistes dermoides, teratomas o hamartomas. La alteración embriológica permite la herniación de la dura más allá del canal espinal, desarrollando así el meningocele anterior. Estas lesiones generalmente son pequeñas en la infancia y muestran crecimiento lento y progresivo secundario a la presión hidrostática y a las pulsaciones del líquido cefalorraquídeo (52).

Mielocele:

Es la protrusión de la médula espinal en la espina bífida (53).

Mieloquiste:

Presencia de cualquier quiste que se desarrolle del canal central rudimentario en el sistema nervioso central (53).

Mielocistocele:

Se define como una espina bífida que contiene sustancia de la médula espinal (53). Consiste en la herniación del canal central dilatado de la médula espinal que contiene líquido cefalorraquídeo que protruye a través de un defecto en los arcos vertebrales posteriores para extenderse más allá del canal espinal. Puede ocurrir a cualquier nivel de la médula espinal, pero se encuentra mayormente en la región cervical posterior y en la región lumbosacra, asociado con regresión caudal (54).

En un mielocistocele existen dos compartimentos líquidos separados, uno la evaginación del canal espinal central dilatado y otro el espacio subaracnoideo, ambos contienen líquido cefalorraquídeo (46).

Malformaciones lipomatosas:

En esta categoría se incluyen todos los defectos espinales de tubo neural cerrados con tejido lipomatoso excesivo presente dentro de o adherido a la médula espinal o *filum terminale*. Estas malformaciones lipomatosas representan la forma más

común de defecto de tubo neural espinal cerrado y varían desde un *filum terminale* alargado que contiene tejido adiposo a una masa grasa grande que ocupe la mayor parte de la región dorsolumbar y contiene a la médula espinal y líquido cefalorraquídeo. El pronóstico es muy variable, sin embargo, difiere considerablemente de aquel que tienen los defectos abiertos del tubo neural (46).

***Filum terminale* anormal:**

Esta alteración no se asocia con otras formas de malformaciones de tubo neural y constituye la forma más leve de defecto cerrado del tubo neural. El *filum* es corto y con un diámetro mayor a 2mm y contiene tejido conectivo incrementado y/o grasa con el *conus medullaris* por debajo de L2. El grado de afección es variable y los síntomas clínicos se localizan en el *conus medullaris*, siendo el déficit neurológico vesical el más común. Aproximadamente la mitad de los pacientes con *filum terminale* anormal no presentan marcadores cutáneos de disrafismo (46).

Seno dérmico congénito:

Consiste en un tracto cubierto por epitelio escamoso estratificado en la línea media, o cerca de ésta, y se cree que es el resultado de una adhesión anormal entre el ectodermo que dará origen al tubo neural y el que formará la piel suprayacente. Se localizan con mayor frecuencia en el área lumbosacra y generalmente se asocian a marcadores cutáneos como un mechón de pelo o una mácula en vino de oporto (55), (56). Los senos dérmicos congénitos pueden reducirse a una banda de tejido conectivo o pueden agrandarse para formar uno o más quistes dermoides (46).

Diastematomielia:

El término describe una malformación en la que la médula espinal está dividida en dos conductos, cada uno con un conjunto único de raíces nerviosas ventrales y dorsales contenidas en dos distintas vainas durales. Usualmente el desdoblamiento ocurre por debajo de la quinta vértebra dorsal y se asocia a otra malformación raquimedular en el 66% de los casos. Es una forma rara de disrafia espinal y corresponde a menos del 3% de los casos de disrafismo espinal cerrado (46). Embriológicamente, la diastematomielia corresponde a una alteración ventral en el proceso normal de pre-neurulación de la médula espinal (57).

Diplomielia:

Este término se emplea para indicar que existen dos segmentos de médula espinal que están duplicados, con un conjunto de 4 raíces nerviosas dorsales y centrales presentes dentro de una vaina dural única (58). Embriológicamente se trata de una alteración ventral en el proceso de pre-neurulación de la médula espinal.

Quistes neuroentéricos:

Durante la gastrulación, el canal neuroentérico conecta el saco vitelino a la cavidad amniótica a través del blastoporo, esto vincula temporalmente a los precursores del tracto gastrointestinal o respiratorio, la columna vertebral y la médula espinal (46). Por lo anterior, cualquier alteración en el desarrollo embriológico puede ocasionar un gran espectro de malformaciones.

Las alteraciones que pueden ocurrir en el extremo ventral del canal neuroentérico incluyen duplicación o malrotación intestinal (59). En la porción media del canal se pueden formar quistes entéricos mediastínicos, quistes mesentéricos abdominales y quistes neuroentéricos. Las alteraciones del canal a nivel dorsal involucran la columna vertebral y pueden variar desde una alteración mínima, hasta un defecto de cierre de tubo neural combinado anterior y posterior masivo en la que los cuerpos vertebrales se dividen en varios segmentos permitiendo que el contenido intestinal se hernie a través del defecto (46). Estas lesiones combinadas son raras y casi siempre incompatibles con la vida. Los quistes neuroentéricos ocurren con mayor frecuencia a nivel cervical bajo o torácico alto y en el *conus medullaris*.

Defectos del tubo neural asociados a síndrome de regresión caudal:

La regresión caudal es una malformación no sindrómica que resulta en ausencia completa o parcial de las vértebras coccígeas, sacras, lumbares y torácicas bajas. El espectro de regresión caudal varía desde agenesia de un segmento coccígeo bajo asintomático, a una malformación grave que resulte en aborto espontáneo o en óbito (60). El defecto de cierre de tubo neural asociado con regresión caudal más frecuente es un *conus medullaris* anormal con un *filum terminale* engrosado, lo que genera una malformación lipomatosa, meningocele, mielocistocele o diastematomielia (46).

Etiología multifactorial de los defectos de cierre del tubo neural en humanos

Tanto factores genéticos como no genéticos participan en la etiología de los DCTN (11). El riesgo de recurrencia para hermanos de un afectado es del 2 al 5%, aproximadamente 50 veces más que el riesgo de la población general (61). Cerca del 70% de la varianza en la prevalencia de los DCTN pueden deberse a factores genéticos (62). La mayoría de los casos son esporádicos, siendo pocos los reportes de casos familiares con afectados en varias generaciones, sugiriendo un patrón de herencia poligénico u oligogénico (63).

Factores ambientales

Respecto a los factores no genéticos de los DCTN, la mayoría resulta de la exposición muy temprana de la gestación a agentes teratogénicos. Uno es el ácido valpróico (64), el cual es un anticonvulsivante ampliamente utilizado y se ha demostrado que aumenta 10 veces el riesgo cuando se ingiere durante el periodo muy temprano después de la concepción (65). Se postula que su actividad inhibidora de la desacetilasa de histonas puede alterar el balance de la acetilación y desacetilación de proteínas, generando así la falla del cierre del tubo neural (66). Otro grupo de factores no genéticos que incrementan el riesgo de defectos de cierre del tubo neural son los relacionados con la absorción de folatos, la cual se inhibe por la carbamazepina, un producto fúngico llamado fumonisina (67) y el trimetoprim, o con la biodisponibilidad disminuida de los folatos (63).

Debido a la relación entre el nivel socioeconómico bajo y un mayor riesgo para malformaciones congénitas, se planteó el posible efecto de factores nutricionales en los DCTN. Posteriormente se observaron niveles de vitamina B12 menores en las madres de fetos con defectos de cierre del tubo neural (68), lo que justificó el estudio de la suplementación con ácido fólico como prevención de la recurrencia de DCTN (69), (70). Se comprobó que la suplementación materna con 4mg al día de ácido fólico reduce aproximadamente en 70% el riesgo de recurrencia (71) y se evaluó la evidencia de la reducción del riesgo de ocurrencia en aproximadamente un 50% (72), (73).

Como seguimiento a estos informes, en enero de 1998, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*Food and Drug Administration*) ordenó la fortificación con ácido fólico de todos los cereales y productos de grano. La prevalencia de nacimientos con espina bífida en los Estados Unidos disminuyó aproximadamente 23% entre 1995 y 2004 mostrando el efecto preventivo de la fortificación de la harina de trigo con ácido fólico (74).

A pesar de la fortificación implementada con ácido fólico, se estima que poco más del 30% de los casos no son prevenibles (65). Un hecho interesante es que en ratones la deficiencia de folatos no causa defectos del tubo neural a menos que exista una interacción gen-ambiente, con una deficiencia en combinación con una mutación de predisposición como en *Pax3* (75).

El aumento del riesgo de espina bífida con el aumento del consumo total de cafeína durante el año anterior al embarazo se informó en un estudio realizado en 1997-2002. Sin embargo, el consumo de té con cafeína mostró un efecto protector (76). Otro micronutriente crucial para el cierre del tubo neural es el inositol, que se ha demostrado que previene los DCTN en ratones que no responden al ácido fólico (77).

De las enfermedades maternas, la diabetes mellitus es un factor de riesgo predisponente de malformaciones congénitas, incluyendo los DCTN (78). Dentro de otros factores asociados a estas malformaciones congénitas, se encuentran la obesidad materna, probablemente por un mecanismo de disregulación de la glucemia (18). La hiperglucemia aislada es suficiente para causar DCTN en embriones de ratones (11). Se ha propuesto que los DCTN pueden ser el resultado del aumento del estrés oxidativo, la expresión alterada de genes como *Pax3* y la apoptosis de células neuroepiteliales (79), (80). Estudios recientes sugieren que la activación de la apoptosis regulada por la quinasa 1 (*ASK1*) en condiciones hiperglucémicas lleva a la activación de la apoptosis mediada por caspasa 8 por la estimulación del factor de transcripción FoxO3a (81).

La hipertermia es un potente teratógeno causante de DCTN en roedores y existen reportes que asocian la fiebre materna alta o el uso excesivo de saunas durante el primer trimestre del embarazo que sugieren que podría existir una relación similar

en humanos (82). También se ha encontrado una relación entre la deficiencia de zinc y los DCTN, no obstante, el mecanismo se desconoce (83).

En un metanálisis de la edad materna como factor de riesgo de defectos del tubo neural, los autores encontraron un mayor riesgo asociado con madres de más de 40 años y madres menores de 19 años. El efecto detectado fue más fuerte para espina bífida que para anencefalia (84).

En relación a las características étnicas de la población, en Estados Unidos se encontró una prevalencia de recién nacidos vivos con DCTN de 2 por 1,000 nacimientos para blancos no hispanos, 1.96 para hispanos y 1.74 para negros no hispanos. (74). Cabe destacar que se desconoce hasta qué punto estas diferencias se deben a factores dietéticos en interacción con factores genéticos predisponentes.

Tabla 4. Factores no genéticos asociados a defectos de cierre del tubo neural en embarazos humanos (18)

Categoría	Agente teratogénico	Mecanismo teratogénico propuesto
Antagonistas de folatos	Carbamazepina	Inhibición de la recaptura de folato celular
	Fumonisina	Inhibición de la recaptura de folato celular
	Trimetoprim	Alteración del metabolismo de folatos
Descontrol glucémico	Hiper glucemia	Muerte celular incrementada en el neuroepitelio
	Obesidad materna	Desconocido
Inhibidores de desacetilasa de histonas	Ácido valpróico	Disrupción de vías de señalización clave en neurulación
Deficiencias de micronutrientes	Folato	Alteración en el metabolismo de folatos
	Inositol	Alteración de fosforilación río abajo de la proteína cinasa C
	Vitamina B12	Alteración en el metabolismo de folatos
	Zinc	Desconocido
Disregulación térmica	Hipertermia o fiebre	Desconocido

Respecto a factores socioeconómicos, un estudio poblacional en recién nacidos y óbitos en California, E.U.A. encontró que las mujeres que no se graduaron de la educación media superior y vivían en zonas de bajo estatus socioeconómico exhibían un riesgo significativamente mayor de tener un hijo con DCTN que las mujeres con educación media superior o mayor que vivían en las mismas zonas (85).

Otro estudio reportó una correlación similar entre el estado de educación materna y los DCTN entre los hispanoamericanos, especialmente para los padres hispanos menos aculturados con mayor riesgo de tener descendientes afectados con DCTN (86). Este hallazgo puede ser parcialmente explicado por un reciente informe de que las madres de grupos sociales superiores o con educación superior tenían más probabilidades de usar ácido fólico en el período preconcepcional y durante el período de cierre del tubo neural (86), (76).

Para cada una de las situaciones mencionadas (Tabla 4), se asume que existe un rol característico por genotipo, que interactúa con el agente teratogénico. Por lo que los estudios para posibles agentes teratogénicos en humanos tendrían que considerar los efectos de variantes genéticas predisponentes.

Factores genéticos

Se han reconocido más de 200 genes como necesarios para un cierre del tubo neural exitoso en ratones (19). Se han realizado múltiples estudios de genes candidato, principalmente de los genes involucrados en el metabolismo de folatos. El hallazgo más frecuente es que los polimorfismos C677T y A1298C en el gen *MTHFR* están asociados a un incremento en el riesgo para DCTN (87). Sin embargo, este hallazgo sólo se ha encontrado en algunas poblaciones y no en la población hispana. Además se ha encontrado asociación con los genes de la vía no canónica de *Wnt* de polaridad celular planar (88). Además de identificar genes y las combinaciones de genes que resultan en DCTN. Otro reto es poder determinar los genes que son necesarios para el cierre del tubo neural. Debido a que se conocen varios genes necesarios para el cierre completo del tubo neural en uno o más aspectos, es posible ensamblarlos en vías de señalización específicas con funciones biológicas conocidas (19).

Las funciones celulares para el cierre del tubo neural incluyen proteínas del citoesqueleto, que son fundamentales para el cierre craneal, las proteínas relacionadas con el ciclo celular de las células involucradas en la neurogénesis, que se encargan de generar la proliferación necesaria y de evitar la formación neuronal prematura que impediría el cierre del tubo neural (63). También se encuentran involucradas las proteínas relacionadas con la viabilidad celular, para que junto con la proliferación adecuada, se obtenga la cantidad adecuada de células para lograr el cierre completo y las interacciones de la matriz extracelular de la superficie celular, que se desconoce su mecanismo en la neurogénesis (18).

Las vías de señalización que se relacionan con el cierre del tubo neural son: la vía de señalización de Hedgehog, la de la proteína morfogenética ósea y la señalización de retinoides (63). En particular, variantes de los genes de la vía de la PCP (20), de la cascada de señalización no canónica de *Wnt*, se han asociado a una variedad de DCTN (19).

Proteínas del citoesqueleto

Los principales genes que codifican para proteínas del citoesqueleto en la Tabla 5

Tabla 5. Genes de ratones causantes de defectos de cierre del tubo neural por alteración del citoesqueleto (18).

Gen	Tipo de defecto	Función de la proteína
<i>Abl1, Abl2</i>	Exencefalia	Tirosin quinasa no receptor
<i>Cofilina n</i>	Exencefalia	Factor despolarizante de actina F
<i>Grfl</i>	Exencefalia	Factor de unión al ADN del receptor de glucocorticoides
<i>Mapk8, Mapk9</i>	Exencefalia	Quinasas terminales c-Jun-N
<i>Marcks</i>	Exencefalia	Proteína relacionada con el citoesqueleto con función en la transducción de señales
<i>Mena, profilina</i>	Exencefalia	Regulación de la polimerización de actina
<i>Mena, vasp</i>	Exencefalia	Miembro de la familia de reguladores del citoesqueleto Mena / Vasp / Evl
<i>Mlp</i>	Exencefalia, espina bífida	Proteína relacionada con el citoesqueleto con función en la transducción de señales
<i>Palladina</i>	Exencefalia	Proteína de actina asociada con el citoesqueleto
<i>Shroom</i>	Exencefalia, espina bífida	Proteína citoesquelética con dominio PDZ
<i>Vinculina</i>	Exencefalia	Proteína citoesquelética

Estos incluyen componentes de proteínas del citoesqueleto *bona fide* como shroom, vinculina y proteínas asociadas al citoesqueleto como cofilina, mena y palladina (18). Notablemente, a pesar de que alteraciones tanto genéticas como teratogénicas del citoesqueleto producen exencefalia en ratones, sólo en muy pocos casos se ha observado un defecto de cierre del tubo neural y únicamente en modelos mutantes de *Shroom* y *Mlp* (89).

Ciclo celular y la neurogénesis

Entre los genes considerados esenciales para la proliferación celular y/o para evitar una neurogénesis prematura se encuentran *jumonji*, que tiene homología con las proteínas de unión a retinoblastoma asociadas al ciclo celular, neurofibromina1 y nucleoporina, que son reguladores negativos de los inhibidores del ciclo celular p21 y p27 respectivamente, y *Pax3* que se requiere para impulsar la proliferación neuroepitelial dorsal (63). También los DCTN resultan de alteraciones en genes que codifican para reguladores negativos de la vía de señalización de *Notch*, la cual se activa conforme el neuroepitelio inicia su diferenciación neuronal. *Hes1*, *Hes3* y *RBP-Jk* se requieren para postponer la diferenciación neuronal hasta que se haya completado el cierre del tubo neural (11).

Muerte celular

Un número insuficiente de células para el cierre del tubo neural puede ocurrir por una muerte celular excesiva (18). Las alteraciones genéticas en las que la muerte celular desmesurada ocurre antes o durante el cierre del tubo neural se dan en el gen anti-apoptótico *Bcl-10*, los factores *Ikk* que activan la vía anti-apoptótica de NFkB y los factores de transcripción *AP-2* y *Brca1* cuyas funciones río abajo se requieren para la supervivencia celular (63).

Superficie celular y matriz extracelular

Las interacciones entre la matriz extracelular y la receptores de la superficie celular, particularmente las integrinas, determinan la forma celular y la polarización, en parte, a través de modificaciones en el citoesqueleto. Los genes en esta categoría

incluyen la *laminina- α 5*, *perlecan* y las *integrinas α 3* y *α 6* (90), (91), (92). También hay evidencia que la adhesión intercelular puede ser clave para facilitar el proceso inicial de fusión de los extremos de los pliegues neurales (18).

Genes candidato del metabolismo de los folatos

Los folatos son indispensables para el metabolismo intracelular de un carbono, lo que produce purinas y pirimidinas para la síntesis de ADN y *s*-adenosil metionina que es el grupo donador universal de grupos metilo para todas las macromoléculas (63). Intrigantemente en estudios durante la gestación en modelos ratones, la deficiencia grave de folatos no mostró disminución en la metilación global del ADN embrionario (75).

Se ha estimado que aun con la suplementación con ácido fólico a dosis altas (4mg), el 1% de los embarazos presentan recurrencia en DCTN (93). Dado que no todos los casos de DCTN son prevenibles se están estudiando otros posibles tratamientos. En estudios en ratones se ha observado que en los ratones mutantes para *Pax3* y *Cited2* la frecuencia y gravedad de los DCTN disminuyen con ácido fólico, mientras que los mutantes para *curly tail* son resistentes al ácido fólico (94). El inositol es la única molécula que se requiere para el cierre del tubo neural en roedores y puede prevenir el desarrollo de DCTN en el modelo de ratones mutantes para *curly tail* con DCTN resistentes a ácido fólico (95). Además se ha visto que el inositol puede prevenir los DCTN inducidos por diabetes en ratones y ratas. Mutaciones inducidas en ratones en los genes *Itpk1*, *Pip5k1c* y *Inpp5e* producen DCTN por alteración directa en el metabolismo del inositol (95). Estos hallazgos junto con observaciones de bajas concentraciones de inositol maternas en embarazos con DCTN en comparación con embarazos no afectados han suscitado ensayos clínicos para evaluar al inositol como agente preventivo para DCTN, junto con el ácido fólico (96), (63).

En cuanto a las vías de señalización esenciales para la neurulación y los DCTN se encuentran las siguientes:

Señalización polar celular planar

Un hallazgo destacado en la base genética de la neurulación fue que la iniciación del cierre en el punto de cierre 1, que se presenta entre el rombencéfalo y la región cervical, requiere de la señalización no canónica de Wnt, la vía de la PCP. El primer gen para craneoraquisquisis se identificó en el año 2002, mediante la clonación posicional del gen *loop tail*, cuya homocigosidad produce una falla del cierre 1 (97), (98). Así como mutaciones homocigotas en los genes de la vía de la PCP producen craneoraquisquisis (*Celsr1*, *Vangl1*, *Vangl2*, *Fzd3*, *Fzd6*, *Dvl1*, *Dvl2* y *Dvl3*), se han encontrado embriones heterocigotos compuestos para mutaciones en los genes de la PCP *Vangl2*, *Celsr1* *Dvl* y genes que interactúan con proteínas de PCP como *Scrb* y *Ptk7* que generan el mismo fenotipo (99), (100). Se encontró que mutaciones de inactivación de ambos alelos de *Smurf1* y de *Smurf2* originan craneoraquisquisis y otras características. Ambos genes codifican para ubiquitin ligasas cuyas dianas incluyen *Prickle1*, lo que contribuye al rol crítico de la señalización de PCP para la iniciación del cierre del tubo neural (88).

Vangl2 puede originar diferentes fenotipos cuando se combina con mutaciones en otros genes de PCP, exhibiendo la capacidad de las interacciones génicas (88).

Señalización *Sonic Hedgehog*

Sonic hedgehog (*Shh*) inicia la vía de señalización intracelular al unirse a su receptor transmembrana *Patched1*. Si *Patched1* se encuentra sin su ligando *Shh*, éste interactúa con una proteína asociada a membrana, *Smoothed*, para inhibir su actividad. Al unirse *Shh* a *Patched1*, se retira el efecto inhibitorio en *Smoothed*, permitiendo a los miembros de la familia de proteínas *Gli* entrar al núcleo y actuar como activadores transcripcionales.

Variantes genéticas en las proteínas con influencia negativa en la vía de *Sonic hedgehog* han ocasionado DCTN en ratones, los cuales se enlistan en la Tabla 6.

Tanto mutaciones en *Patched1* que remueven la inhibición de la actividad de

Smoothened, como la pérdida de la fosforilación inhibitoria en la proteína quinasa A en *Gli2* conllevan a DCTN. La pérdida de función de otros genes inhibitorios de *Sonic hedgehog* incluyendo *Fkbp8*, *Gli3*, *Rab23* y *Tulp3* también producen DCTN. Sin embargo, la pérdida de función de las proteínas que activan la señalización, incluyendo *Smoothened* y *Sonic hedgehog* no produce DCTN, mientras que la sobre-expresión de dichas proteínas puede comprometer DCTN (31), (101). El efecto aparenta ser mediado por la prevención del plegamiento de la placa neural en la región dorsolateral, que es un factor fundamental del cierre tanto en mesencéfalo como en la región espinal baja (30), (18).

Tabla 6. Genes de ratones causantes de defectos de cierre del tubo neural por disregulación de la vía de señalización de sonic hedgehog (18).

Gen	Tipo de defecto	Función de la proteína
<i>Fkbp8</i>	Espina bífida	Regulador negativo de la señalización de Shh
<i>Gli2</i>	Exencefalia	Transducción de la señalización de Shh
<i>Luzp</i>	Exencefalia	Posible regulador negativo de la señalización de Shh
<i>Prkaca, Prkacb</i>	Exencefalia	Regulador negativo de la señalización de Shh
<i>Ptch1</i>	Exencefalia ó craneoraquisquisis	Receptor transmembrana para el péptido Shh, regulador negativo de la señalización Shh
<i>Rab23</i>	Exencefalia + espina bífida	Regulador negativo de la señalización de Shh
<i>Shh</i>	Exencefalia	Péptido de señalización regulador del modelamiento del sistema nervioso dorso-ventral
<i>Sufu</i>	Exencefalia	Inhibidor de la transducción de la señalización de Shh
<i>Tulp3</i>	Exencefalia + espina bífida	Regulador negativo de la señalización de Shh

Señalización de retinoides

El ácido retinóico se ha observado ampliamente como un potente teratógeno, encontrándose los DCTN entre las malformaciones más frecuentemente observadas. Cualquier alteración en la síntesis endógena de retinoides en el desarrollo temprano puede ocasionar DCTN. Se han observado DCTN en ratones con pérdida de función en los genes que codifican para *Raldh2*, la principal enzima en la síntesis del ácido retinóico, *Cyp26a1*, una enzima primordial para el metabolismo del ácido retinóico y los receptores α y γ del ácido retinóico, a través de los cuales se encuentra mediada la señalización del ácido retinóico (102), (103), (18).

Variantes génicas de baja frecuencia

En los estudios de asociación del genoma completo se han encontrado asociaciones genómicas nuevas en las que no se sospechaba un rol en las patologías comunes. La mayoría de las variantes comunes identificadas son difíciles de ligar con las enfermedades. Para la mayoría de las enfermedades comunes, las variantes frecuentes encontradas asociadas a la enfermedad sólo explican una proporción muy limitada de la etiología y heredabilidad de la enfermedad. Se sugirió que la proporción de la heredabilidad no explicada podría encontrarse si se consideran también las variantes raras de un solo nucleótido, y no sólo las comunes y estadísticamente significativas. En un estudio en relación a la talla en humanos, la proporción de la heredabilidad explicada tomando en cuenta las variantes estadísticamente significativas, explicaban el 10% de la heredabilidad, y ésta incrementó al 45% si se tomaban en cuenta todas las variantes de un solo nucleótido genotipificados en el estudio (104).

En los últimos años se ha propuesto que las variantes genéticas raras podrían explicar otra proporción significativa de la etiología y heredabilidad no explicada hasta el momento. Las variantes raras se han definido como las variantes que tienen una frecuencia del alelo menor <1%.

En la literatura existen dos modelos de la estructura genética que se han propuesto para explicar la susceptibilidad de las enfermedades comunes:

1. El modelo enfermedad común, variantes comunes
2. El modelo enfermedad común, variantes raras

En el primer modelo, se acepta que la mayor contribución al riesgo de las enfermedades comunes son las variantes genéticas con frecuencia relativamente alta en la población y de baja penetrancia. En el segundo modelo, se asume que existen abundantes variantes genéticas raras y que cada una contribuye con una alta penetrancia a la susceptibilidad de la enfermedad.

Para estudios de asociación de genoma completo se necesitan muestras de vasos muy grandes, algunos postulan de aproximadamente 25,000 casos en la fase de descubrimiento para alcanzar un poder del 90% de detectar mutaciones de sentido erróneo asociadas con un incremento significativo, de riesgo para la enfermedad, por lo que los estudios de genes candidato siguen siendo la mejor opción cuando no se cuenta muestras tan grandes (105).

Debido a que existen pocos estudios sobre la etiología genética de los pacientes con DCTN, se decidió analizar variantes génicas de baja frecuencia, con una frecuencia del alelo menor <10% en controles en una muestra de 500 pacientes con MMC, sus progenitores y un grupo control.

HIPÓTESIS

Las frecuencias alélicas y genotípicas de variantes génicas de riesgo poco frecuentes y raras se asocian con la presentación del MMC mostrando una prevalencia significativamente mayor de estas en los casos que en los controles, un desequilibrio de transmisión de la variante de riesgo y un efecto epistático entre ellas evidenciado por interacciones gen-gen que muestren significancia estadística.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente estudio fue analizar si determinadas variantes génicas con una frecuencia alélica menor del 10% son factores de riesgo asociados al MMC en una muestra de familias nucleares (tríos) mexicanas mestizas con un hijo(a) con MMC.

Objetivos específicos

1. Determinar si las frecuencias de las variantes alélicas y genotípicas de riesgo se presentan con una frecuencia significativamente mayor en los casos con MMC que en controles.
2. Determinar si las variantes génicas de riesgo se transmiten de manera preferencial de los progenitores a sus hijos con MMC que las variantes silvestres, consideradas de no riesgo por medio de la prueba de desequilibrio de transmisión (TDT, transmission disequilibrium test) en las familiares nucleares o tríos (caso, madre y padre).
3. Determinar si el efecto conjunto, aditivo o multiplicativo, de la expresión de las variantes génicas de riesgo, por medio del análisis de interacción gen-gen muestra diferencias significativas que sugieran un efecto epistático de las mismas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Es un estudio descriptivo, observacional, transversal, colaborativo y multicéntrico, que se llevó a cabo en 500 tríos, es decir, paciente con MMC, madre y padre sanos, que se obtuvieron de 16 Centros de Rehabilitación Infantil Teletón de 15 diferentes estados de la República Mexicana (Aguascalientes, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Durango, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán).

Se incluyeron pacientes con diagnóstico de MMC y ambos progenitores. El diagnóstico de MMC aislado fue confirmado por médicos pediatras o genetistas. Todos los participantes aceptaron voluntariamente y firmaron el consentimiento informado. Se les tomó muestra de sangre periférica, o en su defecto de la mucosa oral. Se excluyeron los casos en los que no se logró obtener muestra tanto del paciente como de sus progenitores y aquellos casos que no correspondieran a un MMC aislado. Como grupo control, se seleccionaron 500 muestras obtenidas del tamiz neonatal de recién nacidos no malformados residentes de la misma región geográfica que las familias de los casos.

Genotipificación

Se diseñó un microarreglo de tipo GoldenGate de Illumina®, que incluyó un total de 768 variantes génicas, entre las cuales 656 variantes fueron de genes candidato para DCTN y 112 variantes para la prueba de ancestría. Para el presente estudio, se seleccionaron las 161 variantes de 127 genes candidato que mostraron tener una frecuencia del alelo menor (FAM) de <10% en el grupo control (Tabla 7).

Criterios de selección de las variantes

La inclusión de variantes se realizó tomando en cuenta que existiera un estudio previo en la literatura que sugiriera asociación con DCTN en humanos o en modelos murinos, que las variantes se encontraran preferentemente en regiones codificantes, que condicionaran un cambio de aminoácido, que tuvieran una FAM igual o mayor al 10% en bases de datos y que participaran alguna de las siguientes vías biológicas: en la señalización de *Wnt*, en neurodesarrollo, en el metabolismo de folatos y vitamina B12, en elementos estructurales, expresión génica, adhesión celular, reparación del ADN, estrés oxidativo y señalización *Hedgehog*.

Análisis estadístico

Se realizaron análisis de comparación de frecuencias alélicas y genotípicas entre casos y controles, análisis de TDT en tríos y análisis de interacción gen-gen (IGG) entre casos y controles. Los análisis se llevaron a cabo mediante los programas Plink 1.07 y Stata 12. Se consideró como diferencia estadísticamente significativa (DES) una $p < 0.05$ ajustada por control genómico.

Para el análisis de IGG se incluyó sólo una variante por cada uno de los 127 genes seleccionados. Para la selección de estas variantes, se incluyeron preferentemente aquellas variantes que mostraran ser patogénicas o probablemente patogénicas en análisis *in silico*, que fueran variantes de sentido erróneo o que fuera la variante con mayor frecuencia del gen en los casos.

Tabla 7. Vías biológicas y el número de variantes génicas incluidas en este estudio.

Vías biológicas	Número de variantes génicas seleccionadas
Señalización <i>Wnt</i>	41
Neurodesarrollo	23
Metabolismo de folatos, homocisteína y vitamina B12	23
Estrés oxidativo y apoptosis	13
Metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos	12
Citoesqueleto	8
Señalización Hedgehog	6
Señalización Notch	5
Angiogénesis	5
Adhesión celular	5
Reparación de ADN	5
Otras: regulación de la traducción y de la transcripción, embriogénesis, respuesta inmune y cilios.	15
TOTAL	161

RESULTADOS

El análisis de asociación entre casos y controles mostró DES de riesgo para MMC en las variantes de los genes *CFL1* (rs11227332), *GAS1* (rs12342165), *APH1B* (rs117618017) y *DAB2IP* (rs10985372) con razón de momios (RM) de 1.50 a 1.97 (Tabla 8).

Tabla 8. Resultado de análisis de asociación de riesgo en las 161 variantes con FAM <10% en controles con p significativa.

No.	Cr	GEN- SNV	A1	A2	F_A	F_U	P	RM	IC 95%
1	11	CFL1- rs11227332	G	A	0.146	0.090	0.00013	1.723	(1.30-2.28)
2	9	GAS1- rs12342165	G	A	0.052	0.027	0.0053	1.974	(1.23-3.18)
3	15	APH1B- rs117618017	A	G	0.058	0.036	0.0255	1.636	(1.07-2.51)
4	9	DAB2IP- rs10985372	A	G	0.065	0.044	0.0485	1.501	(1.01-2.22)

No.: número de variante de la tabla, Cr: cromosoma, SNV: variante de un solo nucleótido, A1: alelo variante, A2: alelo silvestre, F_A: frecuencia del alelo variante en casos, F_U: frecuencia del alelo variante en el grupo control, P: nivel de significancia estadística, RM: razón de momios, IC 95%: intervalo de confianza al 95%.

Cuando se realizó ajuste por control genómico permanecieron significativas las variantes en la tabla anterior excepto la variante rs10985372 del gen *DAB2IP*.

El análisis de TDT en familias mostró un desequilibrio de transmisión alélica de riesgo para la variante rs35940413 del gen *PCNT* con una RM de 1.63 (Tabla 9).

Tabla 9. Resultado de prueba de desequilibrio de transmisión alélica en las 161 variantes con frecuencia del alelo menor debajo del 10% en controles con p significativa.

Cr	GEN- SNV	A1	A2	T	U	RM	IC 95%	χ^2	P
21	PCNT- rs35940413	G	A	67	41	1.634	(1.108-2.410)	6.259	0.0124

Cr: cromosoma, SNV: variante de un solo nucleótido, A1: alelo variante, A2: alelo silvestre, T: A1 transmitidos, U: A1 no transmitidos, RM: razón de momios, IC 95%: intervalo de confianza al 95%, χ^2 : chi cuadrada, P: nivel de significancia estadística.

El análisis de IGG se realizó con 34 variantes de 34 genes debido a que se realizó únicamente con una variante por gen, además de que sólo se realizó entre las variantes de sentido erróneo y se excluyeron aquellas variantes que no mostraron la presencia del alelo menor en los casos o en controles. Se observaron las siguientes IGG de riesgo de variantes de sentido erróneo con DES entre los genes: *PCNT* (rs35940413), *KDR* (rs1870377), *MMAA* (rs2270655), *TSC1* (rs1073123), *APEX1* (rs2307486), *CBS* (rs5742905) y *CELSR1* (rs12165943) con RM entre 10.34 y 3.83 (Tabla 10).

Tabla 10. Resultado de la prueba de interacción gen-gen entre variantes de sentido erróneo con diferencia estadística significativa ajustada por control genómico.

Gen 1	Gen 2	RM (IC 95%)	P
<i>KDR</i> -rs1870377	<i>PCNT</i> -rs35940413	3.94 (1.24-12.4)	0.020
<i>MMAA</i> -rs2270655	<i>TSC1</i> -rs1073123	3.83 (1.14-12.8)	0.030
<i>APEX1</i> -rs2307486	<i>PCNT</i> -rs35940413	10.33 (1.14-93.8)	0.038
<i>CBS</i> -rs5742905	<i>CELSR1</i> -rs12165943	10.34 (1.11-96.5)	0.040

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El MMC corresponde a la forma más frecuente de espina bífida. Es un problema de salud pública por ser una de las malformaciones congénitas más frecuentes en la población mexicana y por la complejidad del tratamiento. Poco se conoce sobre su etiología y la fortificación de las harinas con ácido fólico es la intervención con mayor impacto hasta el momento, disminuyendo su riesgo de ocurrencia hasta en un 70%.

Hasta nuestro conocimiento, este forma parte del estudio más grande en México sobre variantes génicas de riesgo para MMC. Debido a que se ha propuesto que las variantes génicas de baja frecuencia podrían ayudar a explicar una parte de la etiología genética de las enfermedades complejas que no se ha logrado identificar, se decidió analizar las variantes génicas con una frecuencia del AMF <10% en el grupo control.

El análisis de asociación entre casos y controles mostró diferencia estadística significativa para las siguientes variantes: *CFL1* (rs11227332), *GAS1* (rs12342165), *APH1B* (rs117618017) y *DAB2IP* (rs10985372).

El gen *CFL1* exhibe despolimerización de actina F sensible al pH y regula la dinámica del citoesqueleto de actina. Es importante para el progreso normal de mitosis y citocinesis y juega un papel en la regulación de la morfología celular y la organización del citoesqueleto. La N-cofilina (proteína codificada por el gen *CFL1*)

es esencial para el desarrollo embrionario. La inactivación del gen *Cfl1* en ratones resultó en embrioletalidad por falla en el cierre del tubo neural y migración anormal de las células de la cresta neural para el día embrionario 11 a 12 en los 184 ratones estudiados (106). Estos modelos de ratones con mutación nula para n-cofilina aparentan ser normales hasta el día embrionario 9.5, lo que sugiere que la n-cofilina no es necesaria para la gastrulación. En el día embrionario 10.5 los embriones mutantes mostraron menor tamaño que los controles silvestres y para el día 11 a 12 fue letal. De acuerdo a sus estudios la falla en el cierre del tubo neural pudiera deberse a una proliferación deficiente de las células de la cresta neural, además de la desorganización de la migración de estas células (106). Se ha observado que la delección de *cofilina-1* en el día embrionario 10.5 causa la inhibición de la migración radial de las células neurales a la corteza y de la extensión de las neuronas corticales, generando la ausencia de las capas corticales intermedias en el cerebro (107).

La variante rs11227332 del gen *CFL1*, corresponde a un cambio de G por A en la posición 65623739 pares de bases, en el intrón 1 del gen, la cual se encuentra reportada previamente asociada a riesgo de espina bífida en un estudio en California, EEUU, con una RM de 1.6 en el cual se recabaron 246 casos y 336 controles (108) y menciona que el alelo G del SNP genera una interrupción en un factor de transcripción putativo de unión a proteína de unión a CREB. En cuanto a los análisis *in silico*, en *FASTSNP* la variante está identificada como un potenciador intrónico y de acuerdo a *Predict SNP* es deletérea con 97% exactitud. En nuestro estudio se encontró asociación con prueba exacta de Fisher con una p de 0.000127, la menor encontrada en todas las variantes en el análisis de asociación, con una razón de momios de 1.72. Esta variante se encontró con una FAM en controles del 9%, comparada con un 15.6% reportada en población mexicana en *1000 Genomes*. En bases de datos la población con la frecuencia alélica del alelo variante más alta es la de los judíos Ashkenazi con FAM del 25%, sin embargo, la frecuencia de DCTN está reportada como baja en este grupo étnico, negros y orientales (109). Un estudio en Israel encontró que los defectos de cierre del tubo neural fueron aproximadamente dos veces más frecuentes entre no

judíos (anencefalia 8.8, espina bífida 10.3 y total 22.3 por 10,000 recién nacidos) que entre judíos (anencefalia 5.3, espina bífida 4.6 y total 11 por 10,000 recién nacidos) (110).

El gen *GAS1* (*Growth Arrest Specific 1*) bloquea la entrada a la fase S, controla la progresión del ciclo celular y está reportado como un probable gen supresor tumoral (111). El gen codifica para una proteína receptora de membrana anclada a glicosilfosfatidil inositol que actúa como co-receptor y regula positivamente la señalización de *SHH*. En modelos murinos, mutaciones nulas en *Gas1* producen un fenotipo del espectro de holoprosencefalia, defectos craneofaciales como microftalmia, disminución en la pigmentación de la retina, hipoplasia medifacial, paladar hendido e hipodactilia; sin embargo, no se han reportado DCTN (112). La variante rs12342165 del gen *GAS1* genera un cambio de A por G en la posición 89561919 pares de bases en la región no traducida (UTR *untranslated region*) 5' y de acuerdo al análisis *in silico* por *Predict SNP* está dictada con efecto neutral, con un 88% de exactitud.

El gen *APH1B* codifica para una proteína transmembrana, componente del complejo gamma-secretasa. El complejo está formado por 4 subunidades: *Presenilina*, *Nicastrina*, *Pen2*, *Aph1*, y escinde proteínas en su dominio transmembrana tipo I como los receptores *Notch*, *N-Cadherina* y la *proteína precursora de β amiloide*. Mutaciones en los genes que codifican para Presenilina 1 o su homólogo Presenilina 2 causan enfermedad de Alzheimer familiar, así como mutaciones en *APP* (proteína precursora de β amiloide) (113).

Los ratones tienen 3 diferentes genes *Aph1* (A, B y C), mientras que los humanos sólo dos. Estudios en ratones con mutaciones nulas para *Aph1A* fueron letales en el día embrionario 10.5 y desde el día 9.5 mostraron disminución en su tamaño a comparación de los modelos silvestres, vesículas hemisféricas hipoplásicas o ausentes, desorganización en la orientación de las células neuroepiteliales en el tubo neural y migración de estas células al mesodermo adyacente y apoptosis incrementada (113). Ratones con mutaciones nulas para *Aph1B* y *Aph1C*, que corresponde al modelo para la pérdida total de *APH1B* en humanos, fueron viables y presentaron una acumulación del fragmento C terminal de la proteína precursora

de β amiloide en el tallo cerebral y el bulbo olfatorio en las ratas adultas, más de dos veces mayor a las de las ratas silvestres del grupo control (113). La variante rs117618017 del gen *APH1B* corresponde a una mutación de sentido erróneo y está reportada en análisis *in silico* por *Predict SNP* con efecto neutral, con 89% de exactitud, por *SIFT* como tolerada y por *Polyphen* como benigna.

El gen *DAP2IP* codifica para una proteína activadora de GTPasa de Ras que actúa como tumor supresor. Estudios en ratones encontraron que este gen está involucrado en la regulación de la expresión de la proteína de citoesqueleto neuronal durante la neurogénesis y la inducción neuronal (114). La variante rs10985372 del gen *DAP2IP* se localiza en la región no traducida 3' y se tiene una predicción de efecto neutral por *Predict SNP* con 88% exactitud. En el análisis de asociación mostró diferencia estadística significativa, sin embargo, al realizar ajuste para múltiples pruebas por control genómico, perdió significancia estadística.

En el análisis de desequilibrio de transmisión alélica, la única variante de riesgo que mostró significancia estadística fue *PCNT* (rs35940413). El gen *PCNT* codifica para pericentrina, que es un componente integral del centrosoma y está involucrado en el establecimiento y organización de microtúbulos tanto en mitosis como en meiosis. En ratones se expresa en la base de los cilios primarios en la corteza cerebral en desarrollo en el día 13 de la embriogénesis (115). Mutaciones bialélicas de pérdida de función del gen *PCNT* causan enanismo primordial osteodisplásico microcefálico tipo II. Los pacientes con esta enfermedad presentan retraso del crecimiento intrauterino y postnatal, microcefalia, displasia de cadera y anomalías cardiovasculares como aneurismas intracraneales que corresponden a la principal causa de muerte de los casos (116). La variante rs35940413 del gen *PCNT* corresponde a una mutación de sentido erróneo y se encuentra reportada como benigna en análisis *in silico*.

El análisis de interacción gen-gen mostró DES entre genes que participan en la formación del centrosoma y microtúbulos, apoptosis, receptor del factor de crecimiento de células endoteliales, biosíntesis de cisteína, transporte y metabolismo de cobalamina, regulación negativa de la señalización de mTOR y el establecimiento de la polaridad celular planar. En análisis *in silico*, todas las

variantes están reportadas como benignas, excepto la variante de sentido erróneo rs5742905 del gen *CBS* que está como probablemente patogénica. Se ha observado en ratones que la variante genera que la enzima sólo tenga el 1 al 5% de su actividad normal (117). Además en un estudio en California, EUA con 610 casos con espina bífida de familias no relacionadas, esta variante se encontró estadísticamente significativa en el análisis de asociación (118).

Si bien cada una de las variantes mencionadas en forma aislada tiene un efecto leve e incluso ningún efecto, la DES encontradas en el análisis de interacción gen-gen, sugieren que muy probablemente el efecto aditivo (epistático), resultado del efecto combinado de dos genes condicionaría un riesgo definido para la presentación del MMC y también probablemente para otros defectos de cierre del tubo neural

Nuestros resultados muestran que determinadas variantes génicas de genes candidato de baja frecuencia deberían ser incluidas en el análisis, pues representan posibles factores de riesgo genético para el MMC y probablemente para otros defectos de cierre del tubo neural.

REFERENCIAS

1. Kirby RS. The prevalence of selected major birth defects in the United States. *Seminars in perinatology*. 2017;41(6):338-44.
2. Hennekam RC, Biesecker LG, Allanson JE, Hall JG, Opitz JM, Temple IK, et al. Elements of morphology: general terms for congenital anomalies. *American journal of medical genetics Part A*. 2013;161A(11):2726-33.
3. Bacino C. Birth defects: Epidemiology, types, and patterns 2017. Available from: <https://http://www.uptodate.com/contents/birth-defects-epidemiology-types-and-patterns>.
4. Mutchinick O. Herencia Multifactorial. In: Del Castillo U, Zafra, editor. *Genética clínica*. México: Manual Moderno; 2014.
5. Lisker R, Dehesa, A, González, P. Introducción a la genética humana. México: Manual Moderno; 2013. p. 117-29.
6. Zaganjor I, Sekkarie A, Tsang BL, Williams J, Razzaghi H, Mulinare J, et al. Describing the Prevalence of Neural Tube Defects Worldwide: A Systematic Literature Review. *PloS one*. 2016;11(4):e0151586.
7. Espina bífida e hidrocefalia [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2012. Available from: http://www.who.int/features/2012/spina_bifida/es/.
8. Au KS, Ashley-Koch A, Northrup H. Epidemiologic and genetic aspects of spina bifida and other neural tube defects. *Developmental disabilities research reviews*. 2010;16(1):6-15.
9. Greene ND, Copp AJ. Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube. *Prenatal diagnosis*. 2009;29(4):303-11.
10. Rohen JW, Lütjen-Drecoll, E. Hojas embrionarias y desarrollo del cuerpo del embrión. *Embriología funcional: una perspectiva desde la biología del desarrollo*. 3º ed. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 2007. p. 45.
11. Greene ND, Copp AJ. Neural tube defects. *Annual review of neuroscience*. 2014;37:221-42.
12. Copp AJ, Greene ND, Murdoch JN. The genetic basis of mammalian neurulation. *Nature reviews Genetics*. 2003;4(10):784-93.
13. Nikolopoulou E, Galea GL, Rolo A, Greene ND, Copp AJ. Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development*. 2017;144(4):552-66.
14. Neuluración 2015 [updated 23-04-2015; cited 2018]. Available from: <http://www.neurocirugiacontemporanea.com/doku.php?id=neurulacion>.
15. Nakatsu T, Uwabe C, Shiota K. Neural tube closure in humans initiates at multiple sites: evidence from human embryos and implications for the pathogenesis of neural tube defects. *Anatomy and embryology*. 2000;201(6):455-66.
16. O'Rahilly R, Muller F. The two sites of fusion of the neural folds and the two neuropores in the human embryo. *Teratology*. 2002;65(4):162-70.
17. Sulik KK, Zucker, RM, Dehart DB. Normal patterns of neural tube closure differ in the human and mouse. *Proc Greenwood Genet Ctr*. 1998(18):129-30.
18. Copp AJ, Greene ND. Genetics and development of neural tube defects. *The Journal of pathology*. 2010;220(2):217-30.
19. Copp AJ, Adzick NS, Chitty LS, Fletcher JM, Holmbeck GN, Shaw GM. Spina bifida. *Nature reviews Disease primers*. 2015;1:15007.

20. Juriloff DM, Harris MJ. A consideration of the evidence that genetic defects in planar cell polarity contribute to the etiology of human neural tube defects. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology*. 2012;94(10):824-40.
21. Murdoch JN, Rachel RA, Shah S, Beermann F, Stanier P, Mason CA, et al. Circletail, a new mouse mutant with severe neural tube defects: chromosomal localization and interaction with the loop-tail mutation. *Genomics*. 2001;78(1-2):55-63.
22. Lu X, Borchers AG, Jolicoeur C, Rayburn H, Baker JC, Tessier-Lavigne M. PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature*. 2004;430(6995):93-8.
23. Merte J, Jensen D, Wright K, Sarsfield S, Wang Y, Schekman R, et al. Sec24b selectively sorts Vangl2 to regulate planar cell polarity during neural tube closure. *Nature cell biology*. 2010;12(1):41-6; sup pp 1-8.
24. Copp AJ, Checiu I, Henson JN. Developmental basis of severe neural tube defects in the loop-tail (Lp) mutant mouse: use of microsatellite DNA markers to identify embryonic genotype. *Developmental biology*. 1994;165(1):20-9.
25. Escobedo N, Contreras O, Munoz R, Farias M, Carrasco H, Hill C, et al. Syndecan 4 interacts genetically with Vangl2 to regulate neural tube closure and planar cell polarity. *Development*. 2013;140(14):3008-17.
26. Gray JD, Kholmanskikh S, Castaldo BS, Hansler A, Chung H, Klotz B, et al. LRP6 exerts non-canonical effects on Wnt signaling during neural tube closure. *Human molecular genetics*. 2013;22(21):4267-81.
27. Shum AS, Copp AJ. Regional differences in morphogenesis of the neuroepithelium suggest multiple mechanisms of spinal neurulation in the mouse. *Anatomy and embryology*. 1996;194(1):65-73.
28. Schoenwolf GC. Epithelial cell wedging: a fundamental cell behavior contributing to hinge point formation during epithelial morphogenesis. *Control of Morphogenesis*. 1990;1:325-34.
29. Smith JL, Schoenwolf GC. Notochordal induction of cell wedging in the chick neural plate and its role in neural tube formation. *The Journal of experimental zoology*. 1989;250(1):49-62.
30. Ybot-Gonzalez P, Cogram P, Gerrelli D, Copp AJ. Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure. *Development*. 2002;129(10):2507-17.
31. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, et al. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*. 1996;383(6599):407-13.
32. Placzek M, Briscoe J. The floor plate: multiple cells, multiple signals. *Nature reviews Neuroscience*. 2005;6(3):230-40.
33. Ybot-Gonzalez P, Gaston-Massuet C, Girdler G, Klingensmith J, Arkell R, Greene ND, et al. Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling. *Development*. 2007;134(17):3203-11.
34. Miller KA, Ah-Cann CJ, Welfare MF, Tan TY, Pope K, Caruana G, et al. Cauli: a mouse strain with an *Ift140* mutation that results in a skeletal ciliopathy modelling Jeune syndrome. *PLoS genetics*. 2013;9(8):e1003746.

35. Murdoch JN, Copp AJ. The relationship between sonic Hedgehog signaling, cilia, and neural tube defects. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology*. 2010;88(8):633-52.
36. Hildebrand JD, Soriano P. Shroom, a PDZ domain-containing actin-binding protein, is required for neural tube morphogenesis in mice. *Cell*. 1999;99(5):485-97.
37. Xu W, Baribault H, Adamson ED. Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development*. 1998;125(2):327-37.
38. Haigo SL, Hildebrand JD, Harland RM, Wallingford JB. Shroom induces apical constriction and is required for hinge point formation during neural tube closure. *Current biology : CB*. 2003;13(24):2125-37.
39. Geelen JA, Langman J, Lowdon JD. The influence of excess vitamin A on neural tube closure in the mouse embryo. *Anat Embryol (Berl)*. 1980;159(2):223-34.
40. Pyrgaki C, Liu A, Niswander L. Grainyhead-like 2 regulates neural tube closure and adhesion molecule expression during neural fold fusion. *Dev Biol*. 2011;353(1):38-49.
41. Holmberg J, Clarke DL, Frisen J. Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature*. 2000;408(6809):203-6.
42. Abdul-Aziz NM, Turmaine M, Greene ND, Copp AJ. EphrinA-EphA receptor interactions in mouse spinal neurulation: implications for neural fold fusion. *Int J Dev Biol*. 2009;53(4):559-68.
43. Harris MJ, Juriloff DM. Mouse mutants with neural tube closure defects and their role in understanding human neural tube defects. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*. 2007;79(3):187-210.
44. Harris MJ, Juriloff DM. An update to the list of mouse mutants with neural tube closure defects and advances toward a complete genetic perspective of neural tube closure. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*. 2010;88(8):653-69.
45. Rodríguez. Malformaciones craneoencefálicas y raquimedulares: Universidad Complutense de Madrid; 2009. Available from: https://http://www.ucm.es/data/cont/docs/420-2014-02-26-12_Malformaciones_craneoencefalicas.pdf.
46. McComb JG. A practical clinical classification of spinal neural tube defects. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 2015;31(10):1641-57.
47. Salih MA, Murshid WR, Seidahmed MZ. Classification, clinical features, and genetics of neural tube defects. *Saudi medical journal*. 2014;35 Suppl 1:S5-S14.
48. Adzick NS, Thom EA, Spong CY, Brock lii JW, Burrows PK, Johnson MP, et al. A randomized trial of prenatal versus postnatal repair of myelomeningocele. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(11):993-1004.
49. McLone DG, Knepper PA. The cause of Chiari II malformation: a unified theory. *Pediatr Neurosci*. 1989;15(1):1-12.
50. Pang D, Zovickian J, Wong ST, Hou YJ, Moes GS. Limited dorsal myeloschisis: a not-so-rare form of primary neurulation defect. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 2013;29(9):1459-84.
51. Steinbok P, Cochrane DD. Cervical meningoceles and myelocystoceles: a unifying hypothesis. *Pediatr Neurosurg*. 1995;23(6):317-22.

52. Dias MS, Azizkhan RG. A novel embryogenetic mechanism for Currarino's triad: inadequate dorsoventral separation of the caudal eminence from hindgut endoderm. *Pediatric neurosurgery*. 1998;28(5):223-9.
53. Stedman's medical dictionary. 28th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
54. Gupta DK, Mahapatra AK. Terminal myelocystoceles: a series of 17 cases. *Journal of neurosurgery*. 2005;103(4 Suppl):344-52.
55. Mishra SS, Panigrahi S. Thoracic congenital dermal sinus associated with intramedullary spinal dermoid cyst. *Journal of pediatric neurosciences*. 2014;9(1):30-2.
56. Fenichel G. Paraplejia y cuadruplejia. *Clinical Pediatric Neurology: A Signs and Symptoms Approach*. 6th ed: Saunders; 2009. p. 267-84.
57. Rilliet B, Memet, Özek., Cinalli, Giuseppe., Maixner, Virginia. Diastematomyelia. *The spina bifida: Management and outcome* 2008. p. 487-513.
58. Lituania M, Tonni G, Araujo Junior E. First trimester diagnosis of cervico-thoracic diastematomyelia and diplomyelia using three-dimensional ultrasound. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 2015;31(12):2245-8.
59. Savage JJ, Casey JN, McNeill IT, Sherman JH. Neurenteric cysts of the spine. *Journal of craniovertebral junction & spine*. 2010;1(1):58-63.
60. Jeelani Y, Mosich GM, McComb JG. Closed neural tube defects in children with caudal regression. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 2013;29(9):1451-7.
61. Rampersaud E, Melvin, E.C., Speer, M.C. Nonsyndromic neural tube defects: genetic basis and genetic investigations. *Neural tube defects: from origin to treatment*. New York: Oxford University Press; 2006. p. 165-75.
62. Leck I. Causation of neural tube defects: clues from epidemiology. *British medical bulletin*. 1974;30(2):158-63.
63. Copp AJ, Greene ND. Neural tube defects--disorders of neurulation and related embryonic processes. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology*. 2013;2(2):213-27.
64. Wlodarczyk BJ, Palacios AM, George TM, Finnell RH. Antiepileptic drugs and pregnancy outcomes. *American journal of medical genetics Part A*. 2012;158A(8):2071-90.
65. Kondo A, Matsuo T, Morota N, Kondo AS, Okai I, Fukuda H. Neural tube defects: Risk factors and preventive measures. *Congenital anomalies*. 2017;57(5):150-6.
66. Tung EW, Winn LM. Epigenetic modifications in valproic acid-induced teratogenesis. *Toxicology and applied pharmacology*. 2010;248(3):201-9.
67. Missmer SA, Suarez L, Felkner M, Wang E, Merrill AH, Jr., Rothman KJ, et al. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. *Environmental health perspectives*. 2006;114(2):237-41.
68. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Archives of disease in childhood*. 1976;51(12):944-50.
69. Schorah C. Dick Smithells, folic acid, and the prevention of neural tube defects. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology*. 2009;85(4):254-9.

70. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ, Seller MJ, Nevin NC, Harris R, et al. Possible prevention of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Lancet*. 1980;1(8164):339-40.
71. Wald N, Sneddon, J., Densem, J., Frost, C., Stone, R. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. *Lancet*. 1991;338(8760):131-7.
72. Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, et al. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. *The New England journal of medicine*. 1999;341(20):1485-90.
73. Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *The New England journal of medicine*. 1992;327(26):1832-5.
74. Centers for Disease C, Prevention. Racial/ethnic differences in the birth prevalence of spina bifida - United States, 1995-2005. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2009;57(53):1409-13.
75. Burren KA, Savery D, Massa V, Kok RM, Scott JM, Blom HJ, et al. Gene-environment interactions in the causation of neural tube defects: folate deficiency increases susceptibility conferred by loss of Pax3 function. *Human molecular genetics*. 2008;17(23):3675-85.
76. Schmidt RJ, Romitti PA, Burns TL, Browne ML, Druschel CM, Olney RS, et al. Maternal caffeine consumption and risk of neural tube defects. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology*. 2009;85(11):879-89.
77. van Straaten HW, Copp AJ. Curly tail: a 50-year history of the mouse spina bifida model. *Anatomy and embryology*. 2001;203(4):225-37.
78. Correa A, Botto L, Liu Y, Mulinare J, Erickson JD. Do multivitamin supplements attenuate the risk for diabetes-associated birth defects? *Pediatrics*. 2003;111(5 Pt 2):1146-51.
79. Fine EL, Horal M, Chang TI, Fortin G, Loeken MR. Evidence that elevated glucose causes altered gene expression, apoptosis, and neural tube defects in a mouse model of diabetic pregnancy. *Diabetes*. 1999;48(12):2454-62.
80. Reece EA. Diabetes-induced birth defects: what do we know? What can we do? *Current diabetes reports*. 2012;12(1):24-32.
81. Yang P, Li X, Xu C, Eckert RL, Reece EA, Zielke HR, et al. Maternal hyperglycemia activates an ASK1-FoxO3a-caspase 8 pathway that leads to embryonic neural tube defects. *Science signaling*. 2013;6(290):ra74.
82. Moretti ME, Bar-Oz B, Fried S, Koren G. Maternal hyperthermia and the risk for neural tube defects in offspring: systematic review and meta-analysis. *Epidemiology*. 2005;16(2):216-9.
83. Golalipour MJ, Vakili MA, Mansourian AR, Mobasheri E. Maternal serum zinc deficiency in cases of neural tube defect in Gorgan, north Islamic Republic of Iran. *Eastern Mediterranean health journal = La revue de sante de la Mediterranee orientale = al-Majallah al-sihhiyah li-sharq al-mutawassit*. 2009;15(2):337-44.
84. Vieira AR, Castillo Taucher S. Maternal age and neural tube defects: evidence for a greater effect in spina bifida than in anencephaly. *Revista medica de Chile*. 2005;133(1):62-70.

85. Grewal J, Carmichael SL, Song J, Shaw GM. Neural tube defects: an analysis of neighbourhood- and individual-level socio-economic characteristics. *Paediatric and perinatal epidemiology*. 2009;23(2):116-24.
86. Canfield MA, Marengo L, Ramadhani TA, Suarez L, Brender JD, Scheuerle A. The prevalence and predictors of anencephaly and spina bifida in Texas. *Paediatric and perinatal epidemiology*. 2009;23(1):41-50.
87. Amorim MR, Lima MA, Castilla EE, Orioli IM. Non-Latin European descent could be a requirement for association of NTDs and MTHFR variant 677C > T: a meta-analysis. *American journal of medical genetics Part A*. 2007;143A(15):1726-32.
88. Greene ND, Stanier P, Copp AJ. Genetics of human neural tube defects. *Human molecular genetics*. 2009;18(R2):R113-29.
89. Juriloff DM, Harris MJ. Mouse models for neural tube closure defects. *Human molecular genetics*. 2000;9(6):993-1000.
90. Miner JH, Cunningham J, Sanes JR. Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin alpha5 chain. *The Journal of cell biology*. 1998;143(6):1713-23.
91. Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, Hassell JR, Yamada Y. Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nature genetics*. 1999;23(3):354-8.
92. De Arcangelis A, Mark M, Kreidberg J, Sorokin L, Georges-Labouesse E. Synergistic activities of alpha3 and alpha6 integrins are required during apical ectodermal ridge formation and organogenesis in the mouse. *Development*. 1999;126(17):3957-68.
93. Wald N SJ, Densem J, Frost C, Stone R. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. *Lancet*. 1991;338(8760):131-7.
94. Harris MJ. Insights into prevention of human neural tube defects by folic acid arising from consideration of mouse mutants. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology*. 2009;85(4):331-9.
95. Greene ND, Copp AJ. Mouse models of neural tube defects: investigating preventive mechanisms. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics*. 2005;135C(1):31-41.
96. Groenen PM, Peer PG, Wevers RA, Swinkels DW, Franke B, Mariman EC, et al. Maternal myo-inositol, glucose, and zinc status is associated with the risk of offspring with spina bifida. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2003;189(6):1713-9.
97. Kibar Z, Vogan KJ, Groulx N, Justice MJ, Underhill DA, Gros P. Ltap, a mammalian homolog of *Drosophila* Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. *Nat Genet*. 2001;28(3):251-5.
98. Murdoch JN, Doudney K, Paternotte C, Copp AJ, Stanier P. Severe neural tube defects in the loop-tail mouse result from mutation of *Lpp1*, a novel gene involved in floor plate specification. *Human molecular genetics*. 2001;10(22):2593-601.
99. Murdoch JN, Henderson DJ, Doudney K, Gaston-Massuet C, Phillips HM, Paternotte C, et al. Disruption of scribble (*Scrb1*) causes severe neural tube defects in the circletail mouse. *Human molecular genetics*. 2003;12(2):87-98.

100. Curtin JA, Quint E, Tshipouri V, Arkell RM, Cattanach B, Copp AJ, et al. Mutation of *Celsr1* disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse. *Current biology : CB*. 2003;13(13):1129-33.
101. Zhang XM, Ramalho-Santos M, McMahon AP. Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R symmetry by the mouse node. *Cell*. 2001;106(2):781-92.
102. Niederreither K, Vermot J, Messaddeq N, Schuhbaur B, Chambon P, Dolle P. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development*. 2001;128(7):1019-31.
103. Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, Dolle P, Dierich A, Gorry P, et al. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development*. 1994;120(10):2723-48.
104. Yang J, Benyamin B, McEvoy BP, Gordon S, Henders AK, Nyholt DR, et al. Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nature genetics*. 2010;42(7):565-9.
105. Saint Pierre A, Genin E. How important are rare variants in common disease? *Briefings in functional genomics*. 2014;13(5):353-61.
106. Gurniak CB, Perlas E, Witke W. The actin depolymerizing factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration. *Developmental biology*. 2005;278(1):231-41.
107. Bellenchi GC, Gurniak CB, Perlas E, Middei S, Ammassari-Teule M, Witke W. N-cofilin is associated with neuronal migration disorders and cell cycle control in the cerebral cortex. *Genes & development*. 2007;21(18):2347-57.
108. Zhu H, Enaw JO, Ma C, Shaw GM, Lammer EJ, Finnell RH. Association between CFL1 gene polymorphisms and spina bifida risk in a California population. *BMC medical genetics*. 2007;8:12.
109. Cohen FL. Neural tube defects: epidemiology, detection, and prevention. *Journal of obstetric, gynecologic, and neonatal nursing : JOGNN*. 1987;16(2):105-15.
110. Zlotogora J, Amitai Y, Kaluski DN, Leventhal A. Surveillance of neural tube defects in Israel. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*. 2002;4(12):1111-4.
111. Dominguez-Monzon G, Benitez JA, Vergara P, Lorenzana R, Segovia J. Gas1 inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human primary gliomas in the absence of Shh. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2009;27(4):305-13.
112. Pineda-Alvarez DE, Roessler E, Hu P, Srivastava K, Solomon BD, Siple CE, et al. Missense substitutions in the GAS1 protein present in holoprosencephaly patients reduce the affinity for its ligand, SHH. *Human genetics*. 2012;131(2):301-10.
113. Serneels L, Dejaegere T, Craessaerts K, Horre K, Jorissen E, Tousseyn T, et al. Differential contribution of the three Aph1 genes to gamma-secretase activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(5):1719-24.
114. Chang SL, Chou RH, Zeng HJ, Lin YH, Chiu TY, Yang DM, et al. Downregulation of DAB2IP promotes mesenchymal-to-neuroepithelial transition and

neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells. PloS one. 2013;8(9):e75884.

115. Vied CM, Freudenberg F, Wang Y, Raposo AA, Feng D, Nowakowski RS. A multi-resource data integration approach: identification of candidate genes regulating cell proliferation during neocortical development. *Frontiers in neuroscience*. 2014;8:257.

116. Chen CT, Hehnlly H, Yu Q, Farkas D, Zheng G, Redick SD, et al. A unique set of centrosome proteins requires pericentrin for spindle-pole localization and spindle orientation. *Current biology : CB*. 2014;24(19):2327-34.

117. Chen X, Wang L, Fazlieva R, Kruger WD. Contrasting behaviors of mutant cystathionine beta-synthase enzymes associated with pyridoxine response. *Human mutation*. 2006;27(5):474-82.

118. Martinez CA, Northrup H, Lin JI, Morrison AC, Fletcher JM, Tyerman GH, et al. Genetic association study of putative functional single nucleotide polymorphisms of genes in folate metabolism and spina bifida. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2009;201(4):394 e1-11.

ANEXOS:

Lista de las 161 variantes con frecuencia del AMF <10% y las frecuencias alélicas de las variantes en casos, madres, padres y el grupo control.

No.	Cr	Variante	Gen	SNV	alelo 1	f MAF caso	f MAF ctl	f MAF mamá	f MAF papá
1	6	rs324136	AARS2	unknown	A	0.037	0.040	0.040	0.034
2	22	rs11703124	ADSL	coding-synon	A	0.000	0.000	0.000	0.001
3	22	rs5757921	ADSL	missense	0	0.000	0.000	0.000	0.000
4	1	rs12134870	ADSS	missense	A	0.004	0.000	0.004	0.007
5	3	rs1127717	ALDH1L1	missense	G	0.103	0.085	0.082	0.102
6	19	rs79867031	AP2A1/FUZ	UTR-3	A	0.016	0.021	0.019	0.021
7	14	rs2307486	APEX1	missense	G	0.029	0.037	0.025	0.039
8	15	rs117618017	APH1B	missense	A	0.058	0.036	0.051	0.061
9	22	rs80142785	ATF4	intron	A	0.002	0.004	0.001	0.004
10	22	rs9626460	ATXN10	UTR-3	A	0.040	0.035	0.043	0.040
11	16	rs214252	AXIN1	coding-synon	G	0.082	0.078	0.077	0.080
12	16	rs393521	AXIN1	UTR-3	C	0.098	0.096	0.095	0.098
13	3	rs13094203	BOC	coding-synon	A	0.066	0.057	0.065	0.060
14	3	rs9822391	BOC	UTR-5	C	0.073	0.085	0.086	0.076
15	1	rs12085417	BTG2	UTR-3	A	0.079	0.081	0.084	0.081
16	12	rs2280424	C12orf65	coding-synon	A	0.061	0.060	0.064	0.061
17	2	rs1045494	CASP8	UTR-3	G	0.023	0.024	0.026	0.037
18	21	rs4920037	CBS	intron	A	0.073	0.069	0.083	0.073
19	21	rs5742905	CBS	missense	G	0.022	0.025	0.017	0.024

No.	Cr	Variante	Gen	SNV	alelo 1	f MAF caso	f MAF ctl	f MAF mamá	f MAF papá
20	21	rs12613	<i>CBS</i>	UTR-3	A	0.041	0.042	0.034	0.035
21	17	rs2857657	<i>CCL2</i>	intron	G	0.076	0.071	0.072	0.083
22	7	rs2107732	<i>CCM2</i>	missense	A	0.038	0.028	0.032	0.039
23	7	rs11552377	<i>CCM2</i>	missense	A	0.108	0.094	0.104	0.109
24	16	rs34763945	<i>CD19</i>	missense	A	0.019	0.014	0.011	0.021
25	19	rs2227289	<i>CD320</i>	coding-synon	C	0.032	0.040	0.038	0.036
26	5	rs989316	<i>CDH18</i>	UTR-5	A	0.008	0.006	0.005	0.008
27	9	rs3731249	<i>CDKN2A</i>	missense	A	0.007	0.011	0.006	0.016
28	22	rs12165943	<i>CELSR1</i>	missense	C	0.092	0.093	0.096	0.111
29	22	rs4044210	<i>CELSR1</i>	missense	G	0.078	0.072	0.075	0.087
30	1	rs413380	<i>CELSR2</i>	coding-synon	A	0.023	0.027	0.029	0.021
31	1	rs653635	<i>CELSR2</i>	missense	G	0.042	0.057	0.045	0.044
32	11	rs11227332	<i>CFL1</i>	intron	G	0.146	0.090	0.133	0.137
33	6	rs1131431	<i>CITED2</i>	UTR-3	A	0.094	0.090	0.084	0.094
34	7	rs10230120	<i>COBL</i>	missense	A	0.034	0.063	0.035	0.039
35	15	rs2229729	<i>CSK</i>	coding-synon	A	0.001	0.006	0.002	0.003
36	15	rs3743110	<i>CSNK1G1</i>	UTR-3	G	0.066	0.058	0.070	0.062
37	8	rs3098233	<i>CTHRC1</i>	coding-synon	A	0.001	0.003	0.002	0.001
38	10	rs2631217	<i>CTNNA3</i>	intron	A	0.092	0.085	0.099	0.095
39	3	rs3856748	<i>CTNNB1</i>	coding-synon	A	0.006	0.001	0.004	0.006
40	3	rs116875446	<i>CTNNB1</i>	intron	0	0.000	0.000	0.000	0.000
41	14	rs17833769	<i>DAAM1</i>	UTR-5	A	0.051	0.060	0.061	0.057
42	9	rs10985372	<i>DAB2IP</i>	UTR-3	A	0.065	0.044	0.057	0.058
43	3	rs7623786	<i>DCUN1D1</i>	UTR-3	A	0.008	0.010	0.015	0.012
44	11	rs2510091	<i>DCUN1D5</i>	UTR-5	G	0.064	0.054	0.055	0.061
45	5	rs11951910	<i>DHFR</i>	intron	G	0.043	0.039	0.042	0.047
46	8	rs2073664	<i>DKK4</i>	coding-synon	A	0.060	0.058	0.054	0.058
47	6	rs75652420	<i>DLL1</i>	coding-synon	A	0.001	0.001	0.001	0.002
48	12	rs10844318	<i>DNM1L</i>	coding-synon	G	0.063	0.058	0.065	0.064
49	12	rs2272238	<i>DNM1L</i>	coding-synon	A	0.063	0.059	0.067	0.064
50	12	rs10844308	<i>DNM1L</i>	coding-synon	C	0.062	0.060	0.065	0.067
51	12	rs1020670	<i>DNM1L</i>	UTR-3	G	0.062	0.057	0.066	0.063
52	2	rs114783583	<i>DNMT3A</i>	intron	C	0.003	0.006	0.002	0.006
53	21	rs140994399	<i>DNMT3L</i>	coding-synon	A	0.002	0.001	0.000	0.005
54	1	rs2228321	<i>ECE1</i>	coding-synon	G	0.079	0.071	0.054	0.070
55	1	rs3026912	<i>ECE1</i>	UTR-3	A	0.077	0.074	0.087	0.088
56	13	rs12716722	<i>EDNRB</i>	intron	G	0.053	0.045	0.046	0.060
57	22	rs7285319	<i>EP300</i>	missense	0	0.000	0.000	0.000	0.000

No.	Cr	Variante	Gen	SNV	alelo 1	f MAF caso	f MAF ctl	f MAF mamá	f MAF papá
58	1	rs1803527	<i>EPHA2</i>	UTR-3	G	0.026	0.025	0.023	0.028
59	X	rs6048	<i>F9</i>	missense	G	0.062	0.057	0.076	0.000
60	X	rs440051	<i>F9</i>	UTR-3	A	0.082	0.055	0.058	0.000
61	6	rs9504370	<i>FARS2</i>	UTR-5	G	0.000	0.000	0.000	0.005
62	11	rs7109250	<i>FOLR1</i>	intron	A	0.011	0.015	0.014	0.019
63	11	rs2071010	<i>FOLR1</i>	intron	A	0.118	0.096	0.108	0.123
64	11	rs141864268	<i>FOLR2</i>	intron	A	0.001	0.004	0.004	0.004
65	20	rs1055080	<i>FOXA2</i>	UTR-3	A	0.030	0.044	0.043	0.035
66	19	rs3810327	<i>FOXA3</i>	coding-synon	A	0.047	0.045	0.040	0.065
67	1	rs3738316	<i>FOXD2</i>	UTR-5	A	0.090	0.080	0.071	0.108
68	22	rs2281085	<i>FOXRED2</i>	UTR-3	G	0.033	0.057	0.032	0.048
69	2	rs288326	<i>FRZB</i>	missense	A	0.052	0.044	0.050	0.051
70	21	rs2277821	<i>FTCD</i>	UTR-5	A	0.041	0.043	0.032	0.041
71	7	rs3750146	<i>FZD1</i>	missense	A	0.000	0.000	0.000	0.001
72	9	rs12342165	<i>GAS1</i>	UTR-5	G	0.052	0.027	0.031	0.053
73	1	rs275139	<i>GPR161</i>	UTR-3	A	0.012	0.011	0.009	0.008
74	8	rs3779617	<i>GRHL2</i>	missense	A	0.015	0.009	0.017	0.015
75	1	rs72644658	<i>HES5</i>	UTR-3	G	0.048	0.055	0.058	0.051
76	4	rs11727676	<i>HHIP</i>	coding-synon	G	0.036	0.028	0.024	0.039
77	2	rs10593	<i>ITGB1BP1</i>	UTR-3	G	0.081	0.078	0.085	0.085
78	17	rs5919	<i>ITGB3</i>	coding-synon	G	0.043	0.054	0.051	0.044
79	17	rs5918	<i>ITGB3</i>	missense	G	0.052	0.067	0.064	0.063
80	20	rs35761929	<i>JAG1</i>	missense	C	0.014	0.013	0.024	0.013
81	20	rs6040067	<i>JAG1</i>	missense	A	0.000	0.001	0.001	0.001
82	17	rs3736306	<i>KDM6B</i>	coding-synon	A	0.047	0.037	0.058	0.052
83	17	rs3744247	<i>KDM6B</i>	coding-synon	A	0.038	0.025	0.031	0.040
84	17	rs3744248	<i>KDM6B</i>	coding-synon	A	0.037	0.030	0.032	0.042
85	4	rs1870377	<i>KDR</i>	missense	T	0.084	0.082	0.078	0.094
86	22	rs9625721	<i>KREMEN1</i>	coding-synon	A	0.006	0.011	0.005	0.005
87	18	rs671871	<i>LAMA1</i>	missense	G	0.004	0.006	0.004	0.014
88	2	rs2229268	<i>LRP2</i>	coding-synon	G	0.082	0.083	0.081	0.089
89	2	rs11886219	<i>LRP2</i>	coding-synon	G	0.043	0.049	0.042	0.046
90	10	rs2308327	<i>MGMT</i>	missense	G	0.039	0.038	0.042	0.041
91	10	rs2308321	<i>MGMT</i>	missense	G	0.039	0.038	0.042	0.045
92	4	rs2270655	<i>MMAA</i>	missense	G	0.053	0.054	0.057	0.056
93	6	rs1047662	<i>MTHFD1L</i>	UTR-3	G	0.042	0.039	0.030	0.048
94	2	rs114602496	<i>MTHFD2</i>	UTR-3	G	0.001	0.000	0.000	0.001
95	6	rs2229385	<i>MUT</i>	missense	A	0.032	0.044	0.041	0.040

No.	Cr	Variante	Gen	SNV	alelo 1	f MAF caso	f MAF ctl	f MAF mamá	f MAF papá
96	X	rs5902718	<i>NAP1L2</i>	frameshift	D	0.000	0.000	0.000	0.000
97	11	rs56107970	<i>NCAM1</i>	nonsense	0	0.000	0.000	0.000	0.000
98	4	rs182633951	<i>NDST3</i>	missense	C	0.000	0.000	0.000	0.001
99	4	rs78467282	<i>NEUROG2</i>	UTR-3	A	0.002	0.003	0.003	0.003
100	4	rs57336627	<i>NEUROG2</i>	UTR-5	A	0.041	0.026	0.035	0.042
101	17	rs2297518	<i>NOS2</i>	missense	A	0.118	0.099	0.123	0.103
102	10	rs75076093	<i>PARD3</i>	missense	G	0.000	0.001	0.000	0.001
103	21	rs35940413	<i>PCNT</i>	missense	G	0.074	0.072	0.060	0.059
104	3	rs3087896	<i>PCYT1A</i>	UTR-3	A	0.041	0.055	0.035	0.048
105	4	rs77524207	<i>PDGFRA</i>	missense	A	0.001	0.002	0.001	0.002
106	1	rs1539114	<i>PDPN</i>	UTR-3	C	0.053	0.049	0.063	0.059
107	4	rs6533526	<i>PITX2</i>	UTR-3	A	0.009	0.006	0.008	0.009
108	16	rs3209986	<i>PKD1</i>	missense	A	0.033	0.040	0.044	0.035
109	20	rs16994453	<i>PLCB1</i>	coding-synon	A	0.084	0.083	0.071	0.085
110	3	rs9857730	<i>PLCD1</i>	coding-synon	G	0.090	0.082	0.093	0.099
111	16	rs1143687	<i>PLCG2</i>	missense	A	0.024	0.026	0.026	0.031
112	7	rs1546840	<i>PLOD3</i>	coding-synon	A	0.000	0.000	0.000	0.001
113	7	rs3212298	<i>PODXL</i>	missense	A	0.020	0.030	0.029	0.018
114	12	rs74081707	<i>PRICKLE1</i>	coding-synon	A	0.006	0.003	0.004	0.007
115	3	rs2230493	<i>PRKCD</i>	coding-synon	G	0.060	0.058	0.061	0.064
116	3	rs35891605	<i>PRKCD</i>	missense	A	0.000	0.000	0.000	0.001
117	2	rs55698418	<i>PRKD3</i>	coding-synon	G	0.017	0.017	0.021	0.024
118	2	rs117204682	<i>PRKD3</i>	UTR-3	A	0.010	0.010	0.012	0.010
119	17	rs228274	<i>PSMB3</i>	unknown	A	0.109	0.098	0.105	0.112
120	17	rs7468	<i>PSMB6</i>	coding-synon	A	0.020	0.014	0.019	0.023
121	17	rs9916279	<i>PSMD3</i>	coding-synon	G	0.077	0.058	0.077	0.076
122	17	rs2012	<i>PSMD3</i>	UTR-3	G	0.078	0.059	0.079	0.079
123	19	rs640794	<i>RASIP1</i>	coding-synon	G	0.015	0.028	0.031	0.027
124	16	rs76818213	<i>RBL2</i>	missense	G	0.004	0.005	0.005	0.006
125	10	rs34288963	<i>RET</i>	missense	G	0.000	0.000	0.000	0.002
126	13	rs10976	<i>RFXAP</i>	UTR-3	A	0.061	0.065	0.069	0.060
127	3	rs3448	<i>RHOA</i>	UTR-3	A	0.098	0.097	0.104	0.105
128	6	rs11550103	<i>RMND1</i>	missense	A	0.000	0.002	0.002	0.001
129	1	rs2797436	<i>RYR2</i>	coding-synon	A	0.003	0.002	0.004	0.003
130	14	rs2242527	<i>SALL2</i>	missense	C	0.048	0.054	0.038	0.047
131	14	rs1263810	<i>SALL2</i>	missense	C	0.000	0.007	0.001	0.005
132	9	rs35013479	<i>SARDH</i>	coding-synon	A	0.004	0.005	0.002	0.009
133	9	rs77400867	<i>SARDH</i>	coding-synon	0	0.000	0.000	0.000	0.000

No.	Cr	Variante	Gen	SNV	alelo 1	f MAF caso	f MAF ctl	f MAF mamá	f MAF papá
134	9	rs79196288	<i>SARDH</i>	missense	A	0.030	0.019	0.018	0.040
135	9	rs35218200	<i>SARDH</i>	missense	A	0.006	0.009	0.007	0.005
136	4	rs17030428	<i>SFRP2</i>	UTR-3	C	0.021	0.013	0.021	0.018
137	16	rs1054722	<i>SHCBP1</i>	UTR-3	A	0.011	0.015	0.008	0.017
138	7	rs1233556	<i>SHH</i>	intron	A	0.108	0.089	0.102	0.113
139	12	rs28365862	<i>SHMT2</i>	UTR-5	G	0.037	0.061	0.045	0.042
140	1	rs2173049	<i>SKI</i>	UTR-3	A	0.072	0.070	0.061	0.085
141	8	rs17803441	<i>SLC25A32</i>	missense	A	0.024	0.029	0.032	0.019
142	3	rs5400	<i>SLC2A2</i>	missense	A	0.098	0.099	0.096	0.100
143	21	rs17880487	<i>SOD1</i>	UTR-3	A	0.041	0.043	0.040	0.046
144	3	rs11915160	<i>SOX2</i>	intron	A	0.009	0.014	0.016	0.019
145	17	rs2229989	<i>SOX9</i>	coding-synon	A	0.113	0.100	0.104	0.110
146	1	rs10789505	<i>STIL</i>	coding-synon	C	0.039	0.040	0.035	0.043
147	6	rs3816304	<i>T</i>	UTR-3	G	0.058	0.050	0.064	0.052
148	8	rs3134031	<i>TMEM67</i>	missense	G	0.100	0.087	0.093	0.093
149	17	rs56184981	<i>TP53</i>	missense	G	0.000	0.000	0.000	0.004
150	9	rs1073123	<i>TSC1</i>	missense	G	0.082	0.069	0.080	0.078
151	6	rs2076486	<i>UBD</i>	missense	G	0.083	0.065	0.080	0.087
152	6	rs7757931	<i>UBD</i>	missense	A	0.082	0.066	0.080	0.085
153	6	rs2272991	<i>UBD</i>	UTR-5	G	0.081	0.065	0.080	0.085
154	1	rs121918219	<i>VANGL1</i>	missense	A	0.000	0.003	0.000	0.001
155	1	rs3811010	<i>VANGL1</i>	UTR-3	A	0.021	0.026	0.023	0.022
156	1	rs75064936	<i>VANGL1</i>	UTR-3	A	0.000	0.002	0.000	0.000
157	1	rs75277108	<i>VANGL1</i>	UTR-3	0	0.000	0.000	0.000	0.000
158	12	rs1026024	<i>WIF1</i>	coding-synon	A	0.088	0.092	0.088	0.086
159	7	rs2228946	<i>WNT2</i>	UTR-3	A	0.087	0.084	0.089	0.073
160	13	rs1831992	<i>ZIC2</i>	coding-synon	A	0.056	0.051	0.043	0.063
161	X	rs28753954	<i>ZIC3</i>	missense	0	0.000	0.000	0.000	0.000

No.: número de variante de la tabla, Cr: cromosoma, SNV: variante de un solo nucleótido, A1: alelo variante, f MAF: frecuencia del alelo de menor frecuencia, ctl: grupo control.