



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

**“ESTUDIO DE GENES RELACIONADOS CON LA CILIOGÉNESIS Y
FUNCIÓN CILIAR EN PROCESOS DEL NEURODESARROLLO,
COMO FACTORES DE RIESGO PARA MIELOMENINGOCELE EN
FAMILIAS MEXICANAS MESTIZAS”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

GABRIELA ORTIZ CRUZ

TUTOR

DR. OSVALDO MÁXIMO MUTCHINICK BARINGOLTZ

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ADRIANA DÍAZ ANZALDÚA

INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑÍZ

DRA. MARGARITA VALDÉZ FLORES

INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN

DR. OSVALDO MÁXIMO MUTCHINICK BARINGOLTZ

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Enero, 2022.



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.



TÍTULO

**ESTUDIO DE GENES RELACIONADOS CON LA CILIOGÉNESIS Y FUNCIÓN CILIAR
EN PROCESOS DEL NEURODESARROLLO, COMO FACTORES DE RIESGO PARA
MIELOMENINGOCELE EN FAMILIAS MEXICANAS MESTIZAS**

PRESENTA:

GABRIELA ORTIZ CRUZ

DR. OSVALDO MÁXIMO MUTCHINICK BARINGOLTZ

TUTOR DE TESIS

**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN**

DR. CARLOS ALBERTO AGUILAR SALINAS

RESPONSABLE ACADÉMICO DE SEDE

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR
ZUBIRÁN**

DRA. ADRIANA DÍAZ ANZALDÚA

MIEMBRO DEL COMITÉ TUTORAL

INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ

DRA. MARGARITA VALDÉZ FLORES

MIEMBRO DEL COMITÉ TUTORAL

INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN

RESUMEN

El mielomeningocele (MMC) es una malformación congénita frecuente a nivel mundial, causante de discapacidad grave y crónica en la mayoría de los afectados. En México su prevalencia al nacimiento es de 1/1000⁴. Su etiología es poco conocida y de naturaleza multifactorial. Las vías de señalización de polaridad celular planar, Hedgehog y Wnt, son esenciales para el cierre normal del tubo neural y comparten la característica de requerir un cilio estructural y funcionalmente íntegro para su adecuada función. El objetivo de este trabajo fue investigar la asociación de genes candidato relacionados con la estructura, función y transducción ciliar de procesos del neurodesarrollo como factores de riesgo para el MMC en nuestra población mexicana mestiza, así como la posible interacción gen-gen y posible correlación genotipo-fenotipo.

En una muestra de 500 tríos (caso con MMC y ambos progenitores) y 500 controles (recién nacidos vivos no malformados), de 16 centros Teletón de 16 estados Mexicanos, se estudiaron 48 variantes génicas (VG): 16 en 13 genes relacionados con la morfogénesis y función del cilio primario, 8 en 7 genes de la vía de señalización Hedgehog, 26 en 20 genes de las vías de señalización canónica y no canónica Wnt (PCP). Se genotipificaron 6 VG mediante PCR y 42 VG con la plataforma Golden Gate de Illumina ®. Información del contexto clínico-genético familiar se obtuvo de las madres de casos y controles. La muestra se estratificó en 2 fenotipos: MMC-alto (97 casos) y MMC-bajo (403 casos) si afectaba vértebras torácicas o no, respectivamente. Se utilizaron los programas estadísticos STATA/SE-12.1 y PLINK para el análisis de asociación alélica, de desequilibrio de transmisión (TDT) y de interacción gen-gen, considerando un valor de $p < 0.01$ como significativo estadísticamente.

Nuestros resultados confirman lo previamente reportado para un mayor riesgo de tener un hijo(a) con MMC en madres obesas. El análisis de asociación mostró diferencias estadísticas significativas para las VG *COBL*-rs10230120, *DVL2*-rs2074216, y *PLCB4*-rs6077510 para el MMC-total y el MMC-bajo, y *VANGL2*-rs120886448 para el MMC-total y el MMC-alto, e *INVS*-rs7024375 exclusivamente para el MMC-bajo. El análisis de TDT mostró transmisión preferencial de *C2CD3*-rs826058 en el MMC-alto, y de *LRP5*-rs3736228, y *BBS2*-rs1373 en el MMC-bajo. Cuatro IGG significativas se observaron en el MMC-total, cuatro completamente diferentes en el MMC-bajo, y una en el MMC-alto. Interesantemente, ninguna se repitió entre subfenotipos.

Nuestros resultados apoyan la existencia de una asociación entre variantes génicas de vías de señalización Hh, Wnt, PCP, y ciliar, con la ocurrencia de la localización del MMC, aunque se requieren estudios futuros de validación. Además, estos resultados muestran un panel distintivo de variantes génicas que difiere entre subfenotipos de MMC-alto y MMC-bajo, sugiriendo una muy factible correlación genotipo-fenotipo. Estudios como el presente representan una estrategia de análisis para estimar el riesgo de ocurrencia del MMC y otros defectos congénitos aislados.

INDICE

RESUMEN.....	2
1. ANTECEDENTES	
1.1. INTRODUCCIÓN	5
1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL	5
1.3. EMBRIOGÉNESIS DEL TUBO NEURAL	8
1.3.1. <i>Morfogénesis de la placa y tubo neurales</i>	8
1.3.2. <i>Biología celular y molecular del proceso de neurulación</i>	12
1.4. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS	14
1.5. ETIOLOGÍA DEL MIELOMENINGOCELE Y FACTORES DE RIESGO RECONOCIDOS	15
1.5.1. <i>Factores no genéticos en la etiología del mielomeningocele</i>	16
1.5.2. <i>Factores genéticos en la etiología del mielomeningocele</i>	17
1.6. TRANSDUCCIÓN CILIAR DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN HEDGEHOG, PCP Y WNT, Y SU RELACIÓN CON LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL	
1.6.1. <i>Cilios y función ciliar en procesos del neurodesarrollo</i>	19
1.6.2. <i>Vía de señalización Hedgehog, transducción ciliar y su relación con DTN</i>	21
1.6.3. <i>Vía de polaridad celular planar, transducción ciliar y su relación con DTN</i>	23
1.6.4. <i>Vía de señalización canónica Wnt, transducción ciliar y su relación con DTN</i>	27
1.7. ASPECTOS CLÍNICOS DEL MIELOMENINGOCELE	
1.7.1. <i>Diagnóstico</i>	28
1.7.2. <i>Valoración y tratamiento integrales de los individuos afectados con mielomeningocele</i>	29
1.7.3. <i>Morbilidad, mortalidad y pronóstico</i>	30
1.8. PREVENCIÓN	31
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	32
2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	33
2.2. JUSTIFICACIÓN	34
2.3. HIPÓTESIS.....	34
2.4. OBJETIVOS	
2.4.1. <i>Objetivo general</i>	35
2.4.2. <i>Objetivos específicos</i>	35
3. MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	35
3.2. DISEÑO DE LA MUESTRA	36
3.2.1. <i>Cálculo del tamaño de muestra</i>	37
3.2.2. <i>Criterios de inclusión</i>	37
3.2.3. <i>Criterios de no inclusión</i>	38
3.2.4. <i>Criterios de eliminación</i>	38
3.3. METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE GENOTIPIFICACIÓN	
3.3.1. <i>Toma de muestras biológicas para extracción de ADN</i>	38
3.3.2. <i>Obtención de células para extracción de ADN</i>	39
3.3.3. <i>Extracción de ADN</i>	39
3.3.4. <i>Selección de variantes génicas</i>	39
3.3.5. <i>Proceso de genotipificación mediante microarreglo</i>	42
3.3.6. <i>Discriminación alélica por PCR en tiempo real con el uso de sondas Taqman</i>	42
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	
3.4.1. <i>Análisis general</i>	43
3.4.2. <i>Análisis de casos y controles</i>	43

3.4.3. Análisis de tríos.....	44
3.4.4. Correlación genotipo-fenotipo.....	44
4. RESULTADOS.....	44
5. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN	51
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
7. ANEXOS	
Tabla suplementaria 1. Interacciones gen-gen con DES para MMC-total, MMC-alto y MMC-bajo.....	68
Imagen suplementaria 1. Imágenes representativas del proceso de estandarización para las 8 sondas genotipificadas por Taqman	69

1. ANTECEDENTES.

1.1. INTRODUCCIÓN.

Las malformaciones congénitas (MC) afectan a 1 de cada 33 nacimientos aproximadamente, incluyendo nacidos vivos y nacidos muertos⁵. Según la Organización Mundial de la Salud resultan en 3.2 millones de discapacidades por año. En la mayoría de las poblaciones estudiadas los defectos del tubo neural (DTN) representan una de las MC más frecuentes, con una prevalencia al nacimiento que varía de 1 a 10 por cada 1,000 recién nacidos entre poblaciones de distintos países, así como dentro de un mismo país. En nuestra población la prevalencia de DTN es de 2.89 por 1,000 recién nacidos, es decir 1 de cada 346 nacimientos, y la de mielomeningocele (MMC) es de 1 por cada 1000 nacimientos.^{4 6}

Los DTN constituyen un grupo heterogéneo, complejo y frecuente de MC del sistema nervioso central resultado de una falla en el proceso morfogénico de cierre del tubo neural (TN) durante la tercera a sexta semanas de gestación. La anencefalia y la espina bífida (EB) en sus diversas variedades representan más del 90% de los tipos de DTN. La variedad más frecuente de EB es el mielomeningocele (MMC), representando el 80% aproximadamente.

La etiología del MMC no sindrómico es de tipo multifactorial, resultado de una predisposición genética poco conocida y en interacción con factores ambientales muy diversos⁷⁻¹⁰. Las causas primarias no han sido identificadas a pesar de los numerosos estudios epidemiológicos y experimentales realizados a la fecha. En humanos la identificación de factores de riesgo genéticos para DTN se ve complicada por la multiplicidad de genes que participan en la neurulación, así como por la pobre caracterización en humanos de este proceso, y por la importancia de las potenciales interacciones gen-gen y gen-ambiente.

Ciertas vías de señalización son esenciales para el cierre del tubo neural e incluyen, entre otras, la vía de polaridad celular planar (PCP), la vía de señalización Hedgehog (Hh) y la vía de señalización canónica Wnt.¹¹⁻¹⁴ Los cilios se encuentran presentes en la mayoría, si no es que todas, las células epiteliales del cuerpo humano. Evidencia reciente señala que los cilios representan un potencial factor clave para el proceso de neurulación al ser un requisito para la adecuada función de vías de señalización que participan durante la formación y cierre del tubo neural.¹⁵⁻¹⁷ Los DTN son fenotipos frecuentes tanto en modelos animales mutantes con disfunción ciliar primaria como ante la disfunción experimental de componentes de las vías de señalización Hh, Wnt y PCP. La compleja interacción durante el proceso de neurulación entre las vías de señalización Hh, Wnt y PCP, y considerando el requerimiento de estas de un cilio estructural y funcionalmente íntegro para ejercer su adecuada señalización, hace necesaria su consideración de manera integral en el campo de la investigación de los DTN en humanos.

1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL.

Los defectos del tubo neural constituyen un grupo de malformaciones frecuentes que en general pueden dividirse en presentaciones craneales y espinales. Las presentaciones craneales incluyen: anencefalia, encefalocele, craneoraquisquisis y seno dérmico congénito. Las espinales

incluyen: espina bífida abierta (quística) y cerrada. El término **disrafismo** (del Griego $\delta\nu\sigma$ = mal y $\rho\alpha\phi\eta$ = sutura) se refiere a un cierre defectuoso del tubo neural, y por tanto solo debe aplicarse a anomalías de la neurulación primaria. Sin embargo su uso se ha ampliado para incluir todo trastorno espinal congénito en el que haya diferenciación anómala y/o cierre incompleto de las estructuras dorsales de la línea media: piel, músculos, vertebras, meninges y sistema nervioso.¹⁸

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

- *Defectos espinales **abiertos***: resultan de una falla de fusión de los pliegues neurales entre los días 18 y 28 de desarrollo embrionario (4.5-6 semanas de gestación). El tejido neural y/o meninges están expuestos al ambiente externo a través de un defecto óseo congénito. Las lesiones pueden ocurrir en cualquier sitio a lo largo de la columna vertebral, pero son más frecuentes en la región lumbosacra. En general se acepta que son a causa de una falla en el proceso de neurulación primaria. El tipo más frecuente de EB abierta, y por mucho, es el MMC y se caracteriza por una placoda neural central cubierta por una membrana que contiene líquido cefalorraquídeo.
- *Defectos espinales **cerrados***: se localizan y confinan a la médula y clásicamente se acepta que son el resultado de una falla en la neurulación secundaria. El tejido neural no está expuesto y se observa completamente epitelizado, aunque la piel que le recubre puede ser displásica. Pueden haber estigmas cutáneos de su presencia como: un nevo vellosos, hemangiomas capilares, hoyuelos, manchas hipocrómicas, distrofia y masas subcutáneas. Este tipo de defecto, como hallazgo radiológico único y en ausencia de manifestaciones cutáneas o neurológicas, es muy común (5% de la población).

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

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

Categoría	Defecto	Definición / Origen (*)
Neurulación primaria	Craneoraquisquisis	Cordón espinal abierto / Falla en la elevación y fusión de los pliegues neurales, desde la región del cerebro posterior y a lo largo de toda la columna.
	Anencefalia	Ausencia de bóveda craneal y de tejido cerebral / Falla en la elevación y fusión de los pliegues neurales craneales.
	Mielomeningocele	Segmento de cordón espinal abierto que protruye a través de un defecto óseo posterior en la línea media / Falla en elevación y fusión de los pliegues neurales en un segmento.

	Lipoma	Masa dorsal en la línea media cubierta por un tejido que contiene células grasas y que protruye a través de un defecto óseo / Disyunción prematura del ectodermo cutáneo del neuroectodermo y dispersión de células mesenquimatosas hacia el interior del tubo neural donde se vuelven células grasas.
	Lipo-mielomeningocele	Un lipoma cuya conexión con el cordón espinal está por fuera del canal espinal (en un meningocele).
	Lipomielocele	Un lipoma cuya conexión con el cordón espinal está dentro o en el borde del cordón espinal.
	Lipoma intradural	Un lipoma contenido dentro de las meninges (sin masa subcutánea).
	Hemi-mielomeningocele o hemimielocele	Un MMC o un meningocele en un cordón espinal caudal dividido / Falla en la neurulación de uno de los dos cordones. Se consideran anomalías de gastrulación y de neurulación primaria
Neurulación secundaria	Filum terminal estrecho	Filum terminal corto y grueso / Falta de diferenciación retrogresiva del tubo neural secundario.
	Lipoma del filum terminal	Engrosamiento fibrolipomatoso del filum terminal / Células totipotenciales residuales de la eminencia caudal y que se diferencian hacia tejido graso.
	Mielocistocele lumbar	Dilatación quística del tubo neural caudal, sin conexión abierta hacia el canal central más rostral / Regresión incompleta del ventrículo terminal.
Gastrulación y formación de notocorda	Regresión caudal; agenesia caudal	Síndrome de anomalías caudales: agenesia de la columna espinal, ano imperforado, agenesia de ductos urogenitales, displasia o aplasia renal e hipoplasia pulmonar / Defecto de las células notocordales para formar el notocordo.
	Diastematomelia	Cordón espinal caudal duplicado / Falla en los dos primordios del notocordo para integrarse en la línea media durante la gastrulación. Puede haber anomalía de segmentación vertebral, espina bífida y escoliosis.
	Otros trastornos de la integración notocordal	Fístula entérica dorsal, Quistes neuroentéricos, Seno dérmico.

(*) Ver sección de Embriogénesis del tubo neural para correlación.
Tomada y modificada de Tortori-Donati ¹⁸.

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

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

1.3. EMBRIOGÉNESIS DEL TUBO NEURAL.

Los defectos del tubo neural resultan de una interrupción en la cascada embriogénica normal que ocurre durante un período limitado y específico de tiempo, entre las semanas 2 y 4 del desarrollo embrionario humano para los defectos espinales abiertos y entre las semanas 5 y 6 para los defectos espinales cerrados. El proceso incluye la gastrulación (semanas 2 a 3), la neurulación primaria (semanas 3 a 4), la neurulación secundaria y la diferenciación retrogresiva (semanas 5 a 6).^{1 19}

1.3.1. Morfogénesis de la placa y tubo neurales.

Tras la fecundación y durante las primeras dos semanas del desarrollo embrionario el cigoto se convertirá en un organismo multicelular mediante un proceso de segmentación; hacia el tercer día post-fecundación (PF) se distinguirá como una mórula dentro de la cual se diferenciarán dos grupos celulares: el de células internas y el de células externas.

Hacia los 4-5 días PF el embrión se denomina blástocisto y contiene dos capas suspendidas entre los sacos amniótico y de Yolk. La primera segregación dentro de la masa celular interna forma el hipoblasto que contiene las células que generarán al embrión y el epiblasto dentro del cual se forma el amnios que encerrará a la cavidad amniótica. Estos eventos tempranos son importantes para la formación de la *placa procordal* (día 13 PF) que constituye la primera característica morfológica de la orientación craneocaudal (Figura 1).

Durante la tercera y cuarta semanas de gestación (SDG) el embrión es conocido como néurula, caracterizado por el desarrollo del TN a partir de la placa neural. La néurula es la primera manifestación del sistema nervioso y de la etapa de neurulación (3 SDG), la cual se describe a continuación.

A la vez que se forma la placa procordal, en el extremo caudal del embrión aparece en la línea media la *estría primitiva* la cual se elongará durante los siguientes tres días hasta alcanzar su longitud final (16 día PF). Mientras la estría se desarrolla, las células de su zona profunda migran y forman el mesénquima. Una parte del tejido mesenquimatoso origina el mesoblasto que formará el mesodermo intraembrionario. Algunas células del epiblasto desplazan al hipoblasto, formando el endodermo intraembrionario en el techo del saco vitelino. Las células restantes del epiblasto dan lugar al ectodermo intraembrionario. Es así como mediante el proceso de gastrulación, las células del epiblasto originan tres capas germinativas en el embrión (Figura 2).

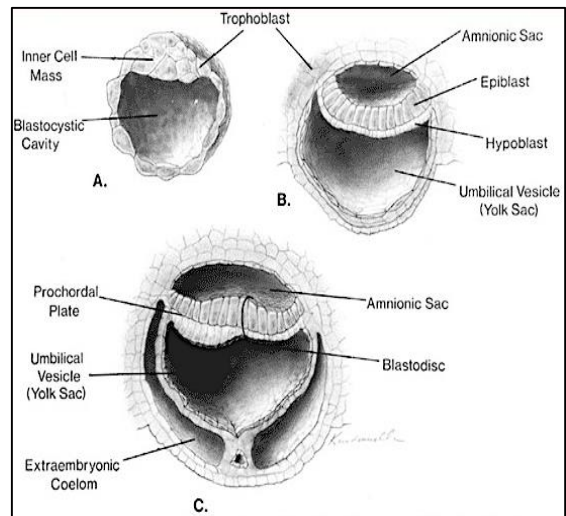


Figura 1. Desarrollo embrionario temprano. A. Formación de la masa celular interna y trofoblasto; B. Formación del epiblasto, hipoblasto y saco amniótico; C. Formación de la placa procordal.²

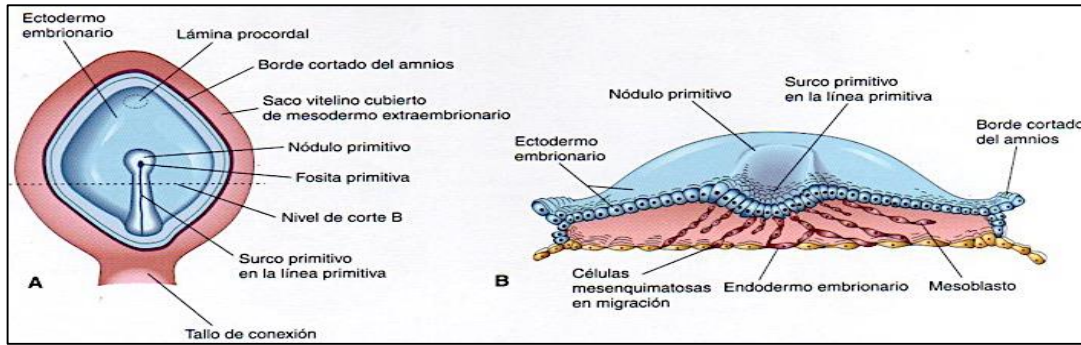


Figura 2. Gastrulación. A. Embrión de 16 días de edad, con amnios extraído para visualizar disco embrionario. B. Mitad craneal del disco embrionario; migración de células mesenquimatosas desde la línea primitiva para formar el mesoblasto que da origen al mesodermo embrionario; la mayoría del endodermo embrionario surge también del epiblasto.¹

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

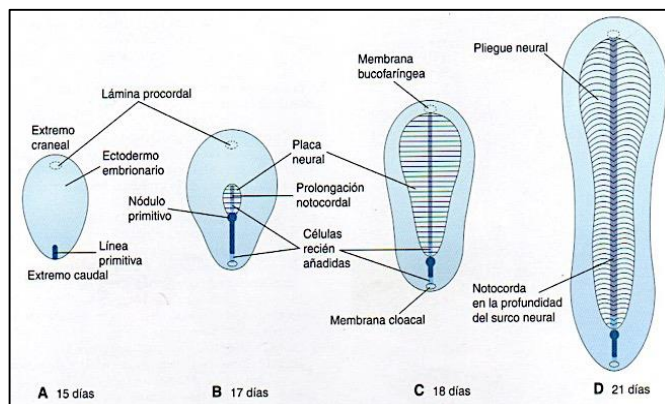


Figura 3. Superficie dorsal del disco embrionario en 3ª SDG. La prolongación notocordal y el mesodermo vecino inducen la formación de la placa neural en el ectodermo suprayacente. A finales de la 3 SDG, la prolongación notocordal se transforma en notocorda.¹

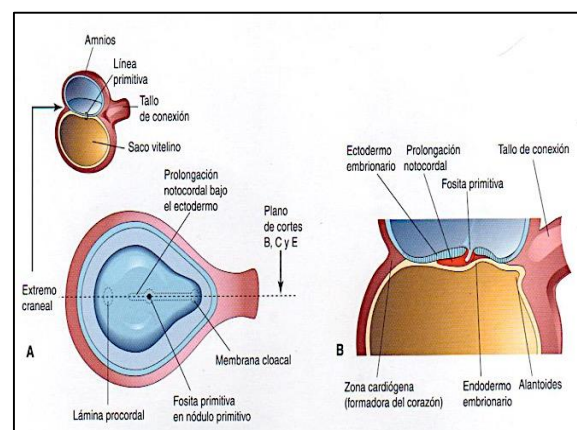


Figura 4. Prolongación notocordal. A. Vista dorsal disco embrionario, 16 día PF. B. Corte medial que ilustra el desarrollo del proceso y canal notocordales en etapas iniciales.¹

El suelo de la prolongación notocordal se fusiona con el endodermo embrionario subyacente alrededor de los días 18 a 20 PF. Tras procesos degenerativos graduales este suelo desaparece comunicando el canal notocordal con el saco vitelino. El resto de la prolongación notocordal forma una **lámina ó placa notocordal**. Cuando la prolongación notocordal alcanza la lámina procordal las células notocordales comienzan a proliferar y la lámina notocordal se invagina para originar la **notocorda**, la cual se extiende desde la membrana bucofaríngea hasta el nódulo primitivo.

La notocorda induce el engrosamiento del ectodermo embrionario suprayacente y forma la placa neural, el origen del SNC. La notocorda degenera y desaparece a medida que se forman los cuerpos vertebrales, y persiste posteriormente como núcleo pulposo de cada disco intervertebral. El ectodermo de la placa neural (neuroectodermo) dará origen al SNC: encéfalo y médula espinal, además de otras estructuras como la retina. El neuroectodermo humano es visible hacia el 16 día PF como un epitelio columnar pseudoestratificado sobre la línea media de la notocorda. Al inicio la placa neural tiene una longitud similar a la de la notocorda subyacente. A medida que la notocorda se alarga, la placa neural se ensancha y finalmente se prolonga hasta la membrana bucofaríngea, más allá de la notocorda (Figura 5).

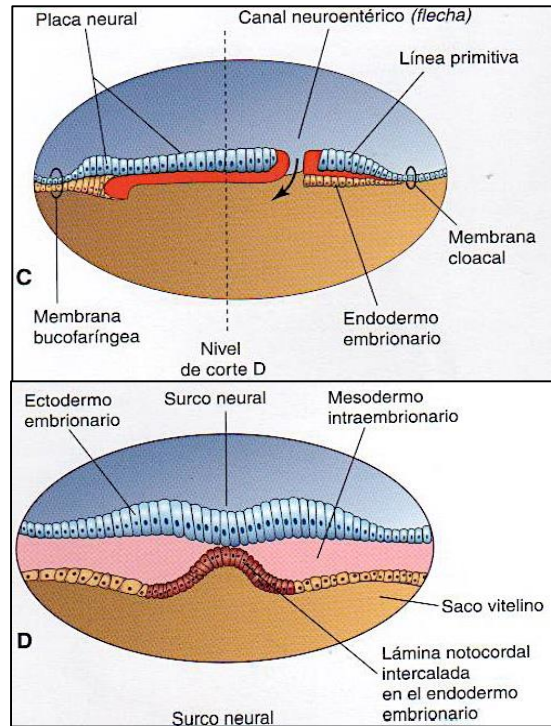


Figura 5. Desarrollo de la placa neural.¹

Alrededor del día 18, la placa neural se invagina a lo largo de su eje central para formar un surco neural medio longitudinal, los pliegues neurales laterales a este surco continúan elevándose para converger hacia la línea media, formando un tubo neural cerrado (Figura 6).

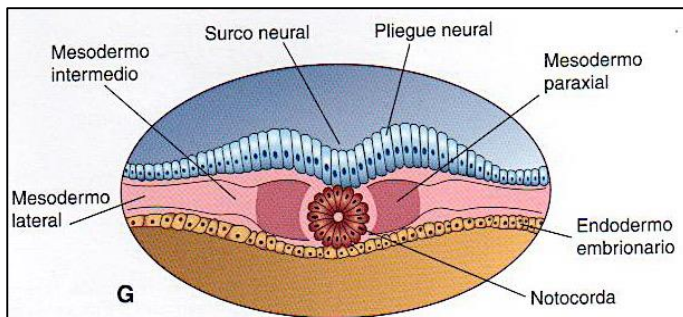


Figura 6. Desarrollo de placa, surco y pliegues neurales.¹

El cierre del TN implica la aposición y fusión primero del ectodermo cutáneo y luego del neuroectodermo. El ectodermo cutáneo se separa del neuroectodermo (proceso llamado disyunción) mientras el TN se cierra, posteriormente el ectodermo de superficie se diferencia hacia la epidermis. Durante los días 19 a 21 PF las células de la cresta neural migran en sentido dorsolateral a cada lado formando la cresta neural. Estas células también migran en distintas direcciones y se dispersan dentro del mesénquima, diferenciándose terminalmente en una gran variedad de tipos celulares (melanocitos, células de Schwann, ganglios raquídeos y los del sistema nervioso autónomo, las cubiertas meníngeas del SNC, y la médula suprarrenal). La cresta neural continúa su desarrollo hasta el 32 día PF, después de que los pliegues neurales se han fusionado.

Conforme se forman la notocorda y el TN, el mesodermo embrionario prolifera lateralmente formando el mesodermo paraxial. Hacia el final de la 3 SDG este mesodermo se diferencia e inicia su división en pares de somitas, alcanzando un número de 38 pares hacia los días 20-30

PF. Las somitas originarán vértebras y músculos esqueléticos, así como la dermis adyacente de la piel.

Lo mencionado hasta este punto corresponde al proceso de **neurulación primaria** (Figura 7) que en síntesis se define como un complejo proceso morfogenético caracterizado por varios eventos relacionados, que son: 1) La organización del neuroepitelio para formar la placa neural; 2) La invaginación de la placa neural, primero en el surco neural y luego a lo largo de los bordes laterales del tubo neural, resultando en elevación y aposición en la línea media de los pliegues neurales y 3) Fusión de los pliegues neurales laterales para cerrar el TN.

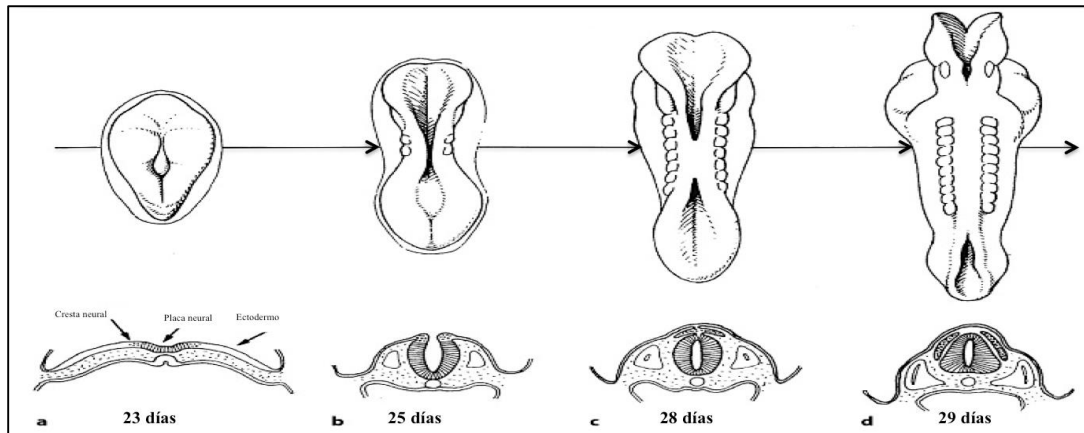


Figura 7. Neurulación primaria. Vistas dorsales y secciones transversales de embriones humanos mostrando la elongación de placa neural (a), canalización de la misma (a y b), elevación de los pliegues neurales laterales (b) así como su fusión (c) y el cierre del tubo neural (d).

El cierre del TN en el humano ocurre durante un período de 4 a 6 días, en forma de oleadas de cierre a lo largo del neuroeje craneocaudal. En el humano, la primer parte del TN en cerrar es la región del rombencéfalo caudal o **cordón espinal craneal**, usualmente cuando existen cinco pares de somitas. El *neuroporo anterior* o cefálico se cierra entre los días 24-25 PF y el *neuroporo posterior* o caudal (cuando existen 25 pares de somitas) entre los días 26-27 PF. Posteriormente el TN se diferenciará en encéfalo y médula espinal mientras que las crestas neurales formarán el sistema nervioso periférico y parte del sistema nervioso autónomo. Paralelo al proceso de la neurulación primaria, el mesodermo lateral para-axial formará los *arcos vertebrales posteriores*. Con el cierre del neuroporo caudal el sistema nervioso es cubierto en su totalidad con piel. Se ha estimado que el sitio de cierre del neuroporo caudal es opuesto a las somitas 30/31²⁰, correspondientes al nivel de la segunda vértebra sacra, y en general se acepta que el neuroporo caudal se cierra entre las vértebras torácica 11 y segunda sacra.

El desarrollo de los metámeros sacrocóccigeos del cordón espinal y filum terminal ocurre por **neurulación secundaria** y diferenciación retrogresiva, procesos que continúan hasta el día 48 aproximadamente. La neurulación secundaria se da principalmente por medio de condensación y epitelización, sin invaginación neural. *Se puede concluir que en el humano, la mayoría del cordón espinal (al menos hasta Sacra-2) se forma por neurulación primaria y el filum terminal y el cordón espinal sacro inferior se forman por neurulación secundaria.*

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

1.3.2. Biología celular y molecular del proceso de neurulación.

En los últimos años se ha logrado un mayor conocimiento del control molecular y genético del desarrollo embrionario neural y vertebral, en particular a partir de modelos murinos. Momentos críticos en el desarrollo neuroembrionario son la inducción del neuroepitelio y la especificación de la notocorda por medio de factores de transcripción. Durante la inducción del neuroepitelio para desarrollar la placa neural ocurren cambios en la forma celular como consecuencia de una reorganización de los microtúbulos así como por eventos de adhesión-interacción intercelulares. El evento final de la neurulación primaria es la convergencia medial y fusión de los pliegues neurales. La aposición y fusión de los pliegues neurales laterales es la fase menos conocida de la neurulación. El comportamiento de las células neuroepiteliales en aposición implica potenciales interacciones molécula-molécula, molécula-célula o célula-célula.

En general, la neurulación suele referirse como el equivalente a la invaginación de la placa neural; tal proceso ha sido estudiado exhaustivamente en embriones de pollo e involucra varios eventos (Figura 8).

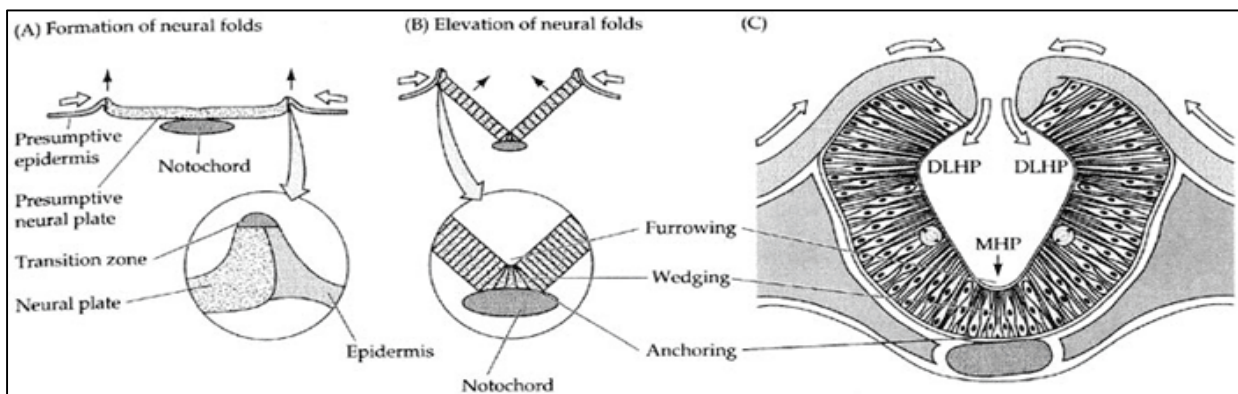


Figura 8. Morfogénesis y biomecánica del proceso de flexión de la placa neural. **A.** Formación de los pliegues neurales del neuroepitelio y del ectodermo cutáneo adyacente; la zona de transición dará lugar a las células de la cresta neural y sus derivados. **B.** Formación del MHP o surco neural, y elevación de los pliegues neurales. **C.** Formación de los DLHPs y convergencia de los pliegues neurales al prepararse para la fusión neural.²

El primero se refiere a cambios en la forma celular en la línea media de la placa neural; estas células cambian de una forma columnar a una en cuña para formar el surco neural medio o MHP (por sus siglas en inglés: Midline Hinge Point). Después, cambios similares ocurren en la forma celular de regiones discretas del TN dorsolateral, originando los DLHPs (por sus siglas en inglés: dorsolateral hinge points), a partir de los cuales los pliegues neurales laterales se elevan para aproximarse y fusionarse en la línea media. En embriones de mamíferos se han observado cambios morfológicos similares a los descritos.

A partir de diversa evidencia experimental se sugiere que fuerzas extrínsecas al neuroepitelio promueven en parte el proceso de plegamiento del TN. La convergencia media del ectodermo cutáneo adyacente empujaría los pliegues neurales hacia la línea media; la expansión de la matriz extracelular mesodérmica o la acumulación de células mesodérmicas debajo del neuroepitelio elevarían los pliegues neurales suprayacentes; finalmente, la elongación del notocordo y/o del notoplato (es decir, el notocordo y las células del MHP suprayacentes) elongarían craneocaudalmente al TN y por simple deformación mecánica, dirigirían los pliegues neurales uno con otro (proceso referido como bamboleo o pandeo Euleriano).²¹

Existe otro concepto tradicional en el que el proceso de plegamiento de la placa neural se conduce por cambios en la forma celular neuroepitelial, sugiriendo en principio que las células sobre una superficie plana al cambiar a una forma en cuña, sea por constricción apical o expansión basal, ocasionarían invaginación de la superficie.²² El acuñamiento parece restringirse a regiones correspondientes a los puntos de angulación medio (MHP) y dorso-lateral (DLHP); consecuentemente, la placa neural se invagina en estos puntos específicos.

Un tercer concepto tradicional es que el acuñamiento celular es causado por la contracción de microfilamentos apicales orientados en forma circunferencial. La actina y la miosina se localizan en los apices de las células neuroepiteliales, y los microfilamentos apicales se unen fuertemente a la meromiosina pesada, un componente del complejo actina-miosina. Sin embargo, existe evidencia experimental en modelos murinos que indica que a diferencia de la neurulación craneal la neurulación espinal es independiente de microfilamentos de actina.²³

Uno de los eventos tempranos que distinguen a la región ventral de la región dorsal del TN es el establecimiento del patrón neural, el cual se da por gradientes contrarrestantes de morfógenos de largo alcance. Los morfógenos Wnt y BMP (Bone morphogenetic protein) liberados de la placa del techo del TN y tejidos adyacentes promueven las identidades dorsales. El morfógeno Shh, inicialmente liberado por el notocordo y después por el piso de la placa, tiene un papel crítico en el patrón ventral.²⁴ La señalización Shh y BMP inhibien la formación de los puntos de angulación dorso-laterales, mientras que el antagonismo BMP por medio de Noggin induce la angulación dorsolateral.²⁵ ²⁶ La señalización BMP puede regular la vía de polaridad apicobasal al modular las uniones apicales en las células neuroepiteliales en una manera dependiente de ciclo celular, resultando en cambios en la forma celular y tisular.²⁷

La falta de señalización Shh no resulta en DTN, a diferencia de lo observado con una incrementada señalización Shh que resulta en DTN acompañado de una expansión de los dominios ventrales hacia regiones dorsales (ventralización), e inhibición de los puntos de angulación dorsolaterales²⁸ Además, tanto la señalización Shh como BMP regulan el balance entre proliferación celular neuroepitelial, apoptosis, y morfogénesis para generar la típica morfología del TN.²⁸ La fusión de los pliegues neurales para cerrar el tubo neural inicia con protrusiones de membrana que simulan lamelipodios y filopodios emanando de las células de superficie ectodérmica, seguido de adhesión epitelial y posterior remodelado para establecer continuidad.²⁹ ³⁰ Las GTPasas Rho son críticas para la formación de protrusiones membranales; en particular, Cdc42 y Rac1 son necesarias para el predominio de filopodios durante la

neurulación temprana, y para la formación de ruffles (extensiones de membrana plasmática generadas por la remodelación del citoesqueleto de actina) en estadios tardíos del cierre.³⁰ La vía PCP podría regular la constricción apical a lo largo del eje mediolateral del TN, induciendo un doblamiento polarizado.³¹

Al menos tres mecanismos celulares podrían contribuir, por si solos o en combinación, con la fusión de los pliegues neurales: 1) Interacciones de glucoproteínas de superficie celular como glucosaminoglucanos y/o moléculas de adhesión celular (CAMs); 2) Interdigitación de filopodos o gemaciones de superficie celular; y 3) Formación de uniones intercelulares. El reconocimiento de superficie celular podría ser el evento inicial que lleve a los pliegues neurales a una aposición entre cuyas superficies celulares neuroepiteliales adyacentes se establecerían conexiones mediante procesos de interdigitación y de uniones intercelulares. Las moléculas de adhesión celular NCAM y ECAM, y la cadherina parecen ser importantes para la separación del neuroectodermo del ectodermo cutáneo. Antes de la neurulación, tanto las células epidérmicas como las neuroectodérmicas expresan ECAM. Mientras la neurulación procede, las células neuroepiteliales dejan de expresar ECAM y comienzan a expresar NCAM y cadherina; como resultado, los dos tipos de tejido cesan su adhesión y se disocian.³²

1.4. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL.

A nivel mundial se asume una prevalencia anual de 300,000 nacimientos con un defecto del tubo neural³³. Esto representa millones de individuos y sus familias viviendo en condiciones de discapacidad ocasionadas, en su gran mayoría, por espina bífida. La prevalencia al nacimiento de los DTN varía de 1 a 10 por 1,000 recién nacidos⁴ entre poblaciones de distintos países, así como dentro de un mismo país.³⁴ En Estados Unidos y en muchos países europeos la prevalencia se estima en 0.5-0.8 casos por cada 1,000 nacimientos⁴, mientras que en algunas regiones de China se ha reportado hasta 20 veces mayor. Históricamente la Provincia de Shanxi ha mostrado una alta prevalencia, reportándose en $\approx 14-20/1,000$ nacimientos.³⁵ En México, EB y anencefalia han mostrado una prevalencia de 2.1 por cada 1,000 recién nacidos, es decir 1 de cada 467 nacimientos.^{4 6 36} En nuestra población la frecuencia del MMC es de 1 por cada 1000 nacimientos.⁴ El MMC representa el 50% de los tipos de DTN y el 90% de los tipos de espina bífida.³⁴ Excluyendo anencefalia, otros tipos de DTN son relativamente poco frecuentes.^{4 37}

En Norte América, la prevalencia de EB es mayor en la población hispana (4/10,000NV) respecto a la población blanca (3/10,000NV) y negra (2.7/10,000NV) no hispana.³⁸ Estudios de migración en población blanca migrante muestran que la prevalencia de DTN corresponde al lugar a donde han migrado en comparación con su lugar de origen, lo cual resalta la importancia de los factores ambientales en la patogénesis de estas MC. En contraste, estudios similares en descendientes de poblaciones negras y migrantes asiáticos en Europa y América del Norte no mostraron prevalencias substancialmente mayores que las de sus lugares de origen. En cuanto a razón de géneros, los DTN craneales, específicamente la anencefalia, muestran una preferencia por el género femenino, especialmente entre productos prematuros, observándose una proporción femenino:masculino de 3:1. Esta diferencia de géneros no se ha observado para otras variedades de DTN.³⁹ A pesar de la fortificación con ácido fólico, la incidencia de mielomeningocele se ha estabilizado en un 3.4/10,000 NV en los EU.⁴⁰

1.5. ETIOLOGÍA DEL MIELOMENINGOCELE Y FACTORES DE RIESGO RECONOCIDOS.

La etiología de los DTN en el ser humano es básicamente desconocida. Se acepta que tanto factores genéticos como ambientales contribuyen al desarrollo de estas MC. Debido a la alta prevalencia al nacimiento del MMC (1-1.5/1000), al impacto psicosocial, el alto costo del tratamiento y la morbi-mortalidad que representa se han realizado durante las últimas dos décadas numerosas investigaciones con el propósito de identificar los factores de riesgo, sean genéticos o ambientales, asociados con los DTN. Si bien estudios exitosos han permitido identificar ciertos genes relacionados, se estima que aproximadamente el 80% del riesgo genético para los DTN en general, y para el MMC en particular, continúa siendo desconocido.

En principio, los DTN pueden resultar de insuficiencia en una o más de las fuerzas conductoras (es decir, propiedades celulares y/o movimientos morfogenéticos) que son necesarios para lograr el cierre. De manera alternativa, una lesión genética o exposición ambiental pudieran alterar el proceso del cierre incluso cuando la maquinaria subyacente está intacta, por ejemplo a través de la inducción de comportamiento celulares aberrantes como lo es el exceso de apoptosis.⁷ Ya que la embriogénesis neural en general, y la neurulación en particular involucran una red compleja de múltiples procesos celulares, de morfogénesis tisular, y de la expresión temporal de múltiples factores de transcripción y de señalización celular, no es sorprendente que el MMC sea el resultado de múltiples interacciones entre factores genéticos y ambientales. Los DTN son etiológicamente heterogéneos en su origen y representan el resultado final de diversas alteraciones durante el desarrollo embrionario.

Un factor muy importante es la predisposición genética, fundamentada en hallazgos epidemiológicos de agregación familiar. Así, el riesgo de recurrencia de un DTN, en particular anencefalia y MMC para hermanos del afectado es 20 a 50 veces mayor que el riesgo de la población general, más aun para una pareja que haya tenidos dos o más hijos previos afectados o que existan en la familia antecedentes de otros casos con MMC, aunque sea de parentesco no tan cercano.^{41 42} La concordancia en gemelos monocigotos es considerablemente mayor que en gemelos dicigotos. El riesgo de recurrencia para los hermanos de gemelos monocigotos afectados es del 20%. Esta y otras líneas de evidencia epidemiológica han llevado a la conclusión de que más de 70% de la varianza fenotípica de los DTN es atribuible a factores genéticos.⁴³

Siendo el MMC una afección de etiología multifactorial como la mayoría de la patología compleja común del niño y el adulto, debe descartarse el efecto de un gen mayor y mejor explorar el efecto pequeño de múltiples genes que en interacción entre sí y con factores ambientales diversos, en particular nutricionales, permita estimar el riesgo de ocurrencia y recurrencia para el MMC y otros DTN.

1.5.1. Factores no genéticos en la etiología del mielomeningocele.

Reportes de casos y estudios epidemiológicos han identificado cierto número de factores no genéticos asociados, siendo los de mayor importancia la deficiencia de folatos y de vitamina B12, la hiperglicemia en relación a diabetes materna⁴⁴, la obesidad materna preconcepcional⁴⁵ y ciertos anticonvulsivos como el valproato de sodio⁴⁷. La exposición a este último compuesto durante el período periconcepcional aumenta el riesgo para EB en ≈ 12 veces.⁴⁸ La descendencia de madres con obesidad preconcepcional y la de madres diabéticas, tienen un riesgo relativo de 4.08⁴⁶ y de 11.5⁴⁷ respectivamente, de gestar un producto con EB.

La suplementación con 2-4 mg de ácido fólico (AF) durante el periodo periconcepcional, 8 semanas previas a la fecundación y un periodo similar posterior a esta, reduce el riesgo de recurrencia del MMC en un 70% y 0.4 mg administrados durante el mismo período, el de ocurrencia de casos nuevos en un 50%.^{41 49} En ratones con dieta deficiente en folatos se puede observar un retraso significativo del crecimiento, pero que no ocasiona *per se* DTN. No se sabe exactamente por que mecanismo la suplementación o fortificación con AF tiene un efecto preventivo sobre esta MC, aunque una serie de teorías existen al respecto.⁵⁰ Unos proponen que niveles apropiados o elevados de AF o folatos favorecen diversos procesos relacionados con la proliferación celular coadyuvando a la síntesis de nucleótidos y la expresión génica. También niveles séricos e intracelulares de folatos favorecen el buen funcionamiento de determinados sistemas metabólicos dependientes de metilación del ADN y control de los niveles de homocisteína que es un tóxico endotelial.

Dentro del mismo conjunto de vitaminas del grupo B, la B2 actúa como cofactor de la enzima metilenoetrahidrofolato reductasa (MTHFR), la B6 como cofactor de la cistationin-beta-sintetasa (CBS), otro mecanismo de degradación de la homocisteína, y la B12 que es cofactor para la metionina sintetasa (MTR), importante paso en la síntesis de metionina, aminoácido esencial para la iniciación de la síntesis de proteínas en el ribosoma y base de la S-adenosil-metionina, reservorio principal de grupos metilos que participan en la regulación de la expresión génica a nivel del ADN e histonas. Por tanto, niveles séricos y celulares en una mujer, y el suplemento apropiado para el producto que se está gestando, favorecen considerablemente la prevención del MMC y otros DTN. Los niveles apropiados de 5,10-metilenetrahidrofolato, un genotipo homocigoto silvestre de la variante 677CC e incluso heterocigoto C677T del gen *MTHFR* y niveles normales de vitamina B2 garantiza niveles también normales de 5-MTHF y disponibilidad de grupos metilo para satisfacer las necesidades del organismo.

Se ha propuesto que una reducción del inositol sérico materno incrementa el riesgo de DTN en 2.6 veces.^{51 52} En un estudio piloto con inositol para la prevención de recurrencia de DTN se mostró su efectividad preventiva en humanos.⁵²

Aún suplementando durante el periodo periconcepcional con la dosis recomendada de AF, aproximadamente 50% de los DTN escapan a la prevención esperada, pudiendo deberse a procesos y mecanismos independientes de la suplementación con esta vitamina del grupo B y deberse a una variación del genoma de los no respondedores que aún no ha sido suficientemente estudiada.⁵³

1.5.2. Factores genéticos en la etiología del mielomeningocele.

Mutaciones en más de 240 genes en ratones causan DTN⁵⁴, indicando los complejos requerimientos para un proceso de neurulación normal. Si bien los estudios de mutaciones en series de genes ortólogos que causan DTN en el ratón aportan al conocimiento de la etiología de estas MC, en general poco contribuyen al conocimiento de la etiología de los DTN en el humano.^{55 56} Los modelos experimentales proveen sistemas para el análisis de los eventos del desarrollo del cierre del tubo neural, y actualmente continúan por definirse a mayor detalle los procesos celular y morfológico fundamentales.

En principio, los DTN pueden resultar de insuficiencia en una o más de las fuerzas conductoras (es decir, propiedades celulares y/o movimientos morfogenéticos) que son necesarios para lograr el cierre. De manera alternativa, una lesión genética o exposición ambiental pudieran alterar el proceso del cierre incluso cuando la maquinaria subyacente está intacta, por ejemplo a través de la inducción de comportamiento celulares aberrantes como lo es el exceso de apoptosis. El estudio de modelos experimentales requiere de un análisis cuidadoso para diseccionar estas posibilidades. Un reto clave será entender como los determinantes moleculares y celulares de la neurulación se relacionan con las fuerzas bioquímicas requeridas para plegar el neuroepitelio y lograr el cierre final del tubo neural.⁷

Con el objetivo de tener un conocimiento integral de los genes expresados durante la neurulación normal en humanos, Krupp *et al*⁵⁷ estableció los transcriptomas durante y tras la neurulación en fragmentos rostrales y caudales de tubos neurales de embriones normales de 26 a 32 días de gestación (estadios de Carnegie 12 y 13). Encontraron cientos de genes significativamente regulados a la alta o a la baja en el estadio C12 versus C13, muchos de los cuales tenían un patrón similar de regulación entre regiones, sugiriendo que las mayores diferencias en la expresión génica en el desarrollo del tubo neural en humanos ocurre entre diversos periodos de tiempo más que por su patrón de localización espacial. Adicionalmente identificaron genes con expresión de isoformas alternas por región o por estadio del desarrollo así como ciertos microRNAs asociados con DTN.⁵⁷

Los genes candidato más frecuentemente estudiados pueden ser clasificados en tres categorías funcionales: 1) Genes relacionados a la metilación (*Por ej.: BHMT, CBS, DNMT3B, MTRR, MTR*), 2) Genes que codifican para enzimas del ciclo de folatos (*Por ej.: MTHFR, MTHFD1, DHFR, TYMS, TCNII, ALDH1L1, ATIC, GART, SARDH*) y 3) Genes relacionados al transporte de folatos (*Por ej.: SLC19A1, CUBN, FOLR2*). Existen otros grupos de genes cuyos productos participan en diferentes funciones celulares y síntesis de proteínas que colaboran en algunos de los procesos críticos para el cierre normal del tubo neural. Estos productos proteicos incluyen aquellos del citoesqueleto, los relacionados al ciclo celular y neurogénesis, los relacionados a viabilidad celular y los relacionados con interacciones superficie celular/matriz extracelular.^{34 56 58}

Durante los últimos 10 años un gran número de estudios se han enfocado en la investigación de genes que participan en el metabolismo de los folatos, de la vitamina B12 y de la homocisteína y su relación con los DTN.⁵⁹⁻⁶¹ Estudios de variantes genéticas de genes del

metabolismo de folatos⁶¹⁻⁶³ en pacientes de razas diferentes han mostrado en diversas poblaciones, incluyendo la nuestra^{36 64}, ser factores de riesgo asociado a los DTN. El hallazgo más robusto obtenido ha sido el relacionado a dos variantes genéticas (C677T y A1298C) en el gen *MTHFR* las cuales se han asociado en general con un riesgo incrementado para DTN, 50% más de riesgo para el homocigoto 677TT en población caucásica⁶⁵. La variante C677T del gen *MTHFR*, que porta la sustitución de un residuo de alanina por uno de valina, codifica para una variante termolábil que en un individuo con un genotipo TT reduce la actividad de la enzima *MTHFR* en un 70%, incrementando el riesgo para DTN así como los niveles de homocisteína, y condicionando alteraciones de la metilación global y específica del ADN. Lo anterior sobre todo en el caso de una dieta deficiente en folatos.

Nuestras investigaciones en genes del metabolismo de los folatos en población mestiza mexicana muestran que la prevalencia en sujetos normales de las variantes C677T y A1298C del gen *MTHFR* son muy diferentes a los de otras poblaciones, siendo la frecuencia del alelo T (58.6%) la más alta en numerosos estudios a la fecha.^{36 66-68} En cambio la variante A1298C en nuestra población muestra una frecuencia considerablemente menor (14.7%) a la observada en población caucásica y anglosajona.⁶⁸ Estos hallazgos pueden explicar en parte la alta prevalencia de DTN observados en nuestra población. Diferencias similares observamos en variantes de otros genes como rs1805087 del gen *MTR*; rs1801394 de *MTRR*; rs2236225 de *MTHFD1*; rs1801198 de *TCN2*; del19pb de *DHFR*; rep28pb de *TYMS* y rs2424913 de *DNMT3b*. Ha sido demostrado que la variante C776G en el gen del transportador de la cobalamina (*TCN2*) disminuye la concentración celular y plasmática de la transcobalamina y por tanto, influye en la disponibilidad celular de vitamina B12. En población mexicana se ha observado una asociación entre este polimorfismo y los niveles de homocisteína.⁶⁶ Las interacciones gen-ambiente contribuyen muy probablemente a la predisposición a los DTN, con ejemplos que incluyen las interacciones de *MTHFR* con el uso de multivitamínicos⁶⁹, *MTRR* con el uso de vitamina B12⁷⁰ y *PDGFRA* con el inositol y el zinc.⁷¹

Avances en la secuenciación de exoma y de genoma completo, y en el análisis de deleciones genómicas y variantes en el número de copias permitirán ampliar la investigación de la base genética de los DTN en humanos. La complejidad multifactorial de los DTN significa que el análisis de datos de tales estudios representa un reto mayor. Con el advenimiento de la tecnología con microarreglos cromosómicos, la detección de variantes en el número de copias (CNV) pudiera revelar genes candidato y vías asociadas con DTN.

Con un mayor uso de plataformas de secuenciación de siguiente generación para la identificación de genes mutados en los DTN, es crítico determinar si mutaciones nuevas contribuyen a su patogénesis. Es posible probar el papel de las nuevas mutaciones en la patogénesis de los DTN usando enfoques *knock* en ratones. Nuevos desarrollos en metodología CRIPS-Cas9 hará más fácil generar ratones genéticamente modificados. Además, es importante desarrollar modelos *ex vivo* de DTN. Avances recientes en cultivos tridimensionales y

en el cerebro pueden causar hidrocefalia. Defectos en la función sensorial ciliar en el riñón llevan a enfermedad renal poliquística y nefronoptosis. Defectos en los cilios primarios en otros tejidos pueden causar anosmia, degeneración retiniana y obesidad, por mencionar algunos^{167 172}. El creciente interés en las enfermedades relacionadas con los cilios ha promovido el análisis sistemático de la composición proteica de los cilios; sin embargo, aunque cientos de proteínas ciliares se han descubierto en los últimos años, en una gran proporción sus funciones permanecen desconocidas.⁷⁹

Evidencia reciente con uso de tecnología de microarreglos en el estudio de DTN en humanos apoya el papel de los cilios en su etiología. Mediante un estudio de análisis genómico de variantes en el número de copias (CNV) Chen *et al*⁸⁰ encontró una mayor cantidad de genes ciliares, no reportados en bases de variantes genómicas, en pacientes con DTN que en controles (24,7% vs 9.3%, $p < 0.05$), correspondiendo a un incremento del riesgo para DTN de 3.19 veces (IC 95%; 1.27-8.01). Finalmente el análisis sugirió que dos vías ciliogénicas, las de uniones estrechas y de señalización de la proteína cinasa A, eran las principales vías canónicas implicadas con los CNVs específicos de DTN, y que estas dos vías interactúan con vías conocidas para DTN.⁸⁰ Los genes *PARD3-PARD6* se conocen esenciales para la polaridad epitelial durante la embriogénesis y la neurulación. Este complejo de polaridad también se localiza en los cilios y regula la ciliogénesis, así como las uniones estrechas durante la morfogénesis renal. Los modelos de pez cebra han revelado que *PARD3* tiene un papel importante al dirigir el entrecruzamiento en la línea media durante la neurulación. La depleción de *PARD3* en pez cebra resulta en cilios intracelulares e hidrocefalia. En humanos, el knock-out *PARD3/PARD6* en células MDCK resulta en defectos morfogénicos graves en las tres dimensiones del cultivo, formando múltiples lúmenes, lo cual es similar al fenotipo renal en humanos.

Los cilios representan un factor clave en la regulación de la transducción de señales de diversas vías del neurodesarrollo, y por tanto representan un potencial requisito para un proceso normal de neurulación. En relación a lo anterior, se ha demostrado que los cilios son requeridos para la función de la vía de polaridad celular planar (PCP).^{3 81} En vertebrados, la vía de señalización Hedgehog requiere del cilio primario.²⁸ También se ha propuesto que los cilios se requieren para la señalización canónica Wnt, la cual es importante en la regulación del patrón dorso ventral del tubo neural.⁷⁶ En modelos experimentales un fenotipo observado para mutantes ciliares es la presencia de DTN, por ejemplo el 14% de los ratones *Bbs4*^{-/-} muestran un tubo neural cefálico abierto.⁷⁴

Por lo mencionado, nace la posibilidad de que organismos con alteraciones ciliares muestren DTN como resultado de una mal-regulación de otras vías de señalización. La compleja interacción entre las vías Hh, Wnt, y PCP, y posiblemente otras vías de señalización, con el cilio primario durante el desarrollo embrionario del tubo neural, tienen que ser considerada de manera integral en la investigación de los DTN, tanto en modelos experimentales como en estudios epidemiológicos y de asociación en humanos.

1.6.2. Vía de señalización Hedgehog, transducción ciliar y su relación con DTN.

La cascada de señalización Hedgehog (Hh) es esencial para muchos aspectos del desarrollo embrionario normal. El cilio primario es crítico para la señalización Hh durante el establecimiento del patrón dorso ventral del tubo neural.^{82 28}

El ligando polipeptídico para esta vía es una molécula de señalización intracelular denominada Hedgehog y descrita en *Drosophila*. Los mamíferos tienen tres homólogos: Desert Hedgehog, Indian Hedgehog y Sonic Hedgehog (Shh), de los cuales Shh es el mejor estudiado. El ligando Shh se expresa primero en el notocordo subyacente al tubo neural ventral induciendo la expresión de *Foxa2*, que por sí misma inicia la expresión de Shh dentro de la línea media ventral, el futuro piso de la placa neural. La señal Shh del notocordo y del piso de la placa actúa para especificar los dominios ventrales, en forma dependiente de concentración y tiempo. La señalización Shh culmina con el procesamiento de factores de transcripción Gli para generar activadores o represores Gli, proceso dependiente del cilio.

Varios componentes de la vía Hedgehog se localizan dentro del cilio. Smoothened (Smo) se localiza en la parte distal del cilio primario tras la estimulación de la vía y es un requerimiento esencial, aunque no suficiente, para la activación de la cascada de señalización río abajo.²⁸ La adición de Shh resulta en remoción de su receptor ciliar Patched (Ptch1) y en acumulación de Smo en el compartimento. Smo determina la activación de la vía al promover la generación del activador Gli2.⁸³ Además del activador Gli, los represores Gli (principalmente Gli3R) son generados tras procesamiento proteolítico en una manera dependiente de cilio-proteína quinasa A(PKA)-Sufu,⁸⁴ referido como la maquinaria basal de represión de la señalización Shh.

Tras la activación de la vía Shh, Gpr161 es removido del cilio primario en un proceso de dos pasos dependiente de Smo y β -arrestina.⁸⁵ Las β -arrestinas son reclutadas a la región proximal de C-terminal por el receptor competente de señalización en una manera dependiente de Grk2. Los dobles *knockout* para β -arrestina1/2 o la inhibición de la cinasa GPCR Grk2 previenen la pérdida de Gpr161 del cilio primario tras la señalización Shh. El tráfico Smo hacia el cilio primario promueve mayor unión de β -arrestina y que se requiere para la salida de Gpr161 del cilio primario. La cola C distal de Gpr161 tiene una hélice anfipática que se une directamente a las subunidades tipo I PKA reguladoras (RI α)⁸⁶ y las cuales se localizan en el cilio⁸⁷; la unión directa a PKA en este compartimento podría potenciar la habilidad de Gpr161 para activar PKA por medio de una señalización cAMP constitutiva.

Factores río abajo de Gpr161 incluyen la subunidad G α_s de proteína G y a PKA. La cinasa de serina-treonina PKA es activada por cAMP e inhibe a la vía de señalización Shh al procesar a las proteínas Gli2 y Gli3 hacia sus formas reprimidas. La holoenzima PKA consiste de dos unidades catalíticas C α y C β (codificadas por *Prkaca* y *Prkacb*) y dos subunidades reguladoras, subunidades tipo I (RI α y RI β , codificadas por *Prkar1a* y *Prkar1b*, respectivamente) y subunidades tipo II (RII α y RII β , codificadas por *Prkar2a* y *Prkar2b*) en el ratón.⁸⁸ La subunidad reguladora RI α se localiza en el cilio, mientras que las otras subunidades PKA reguladoras y catalíticas se han reportado asociadas con el proteoma ciliar y el cuerpo basal.⁸⁷

Existe una gran cantidad de mutaciones genéticas que afectan la señalización de Hedgehog en ratones, ya sea de forma directa o mediante sus efectos sobre la función ciliar. Algunas de estas mutaciones alteran el cierre del tubo neural en el cerebro, cordón espinal, o ambos, conduciendo a DTN. Estas mutaciones, que tienen efectos directos sobre la vía Hedgehog se pueden dividir en 2 grupos distintos: aquellas que disminuyen la señalización causan holoprosencefalia y ciclopía pero no DTN, y aquellas que muestran activación incrementada de la vía producen DTN como exencefalia y EB en la mayoría de los casos. Un tercer grupo de mutaciones, principalmente aquellas que afectan la señalización de manera indirecta por medio de efectos sobre la función ciliar, tienen consecuencias variables en el cierre del tubo neural.²⁸

El requerimiento del cilio en la señalización de Hedgehog se identificó al observar en ratones mutantes con alteraciones en proteínas de transporte intraflagelar (IFT88 e IFT172) defectos morfológicos y evidencia de alteraciones en el patrón regulado por el ligando Hedgehog. Desde entonces, un número de reguladores del transporte intra-flagelar han mostrado ser requerimiento para la señalización Hh.²⁸

En ratón, el alelo hipomórfico Gpr161 (conocido como vaculated lens; *vl*) con un c-terminal truncado muestra letalidad embrionaria con EB lumbosacra en $\approx 50\%$.⁹⁰ Este fenotipo es modificable dependiendo del background genético de la cepa,⁹¹ y la razón subyacente para estos fenotipos de EB con penetrancia limitada en GPR161^{vl/vl} es incierta a la fecha. El C-terminal truncado en el alelo *vl* es distal al sitio de unión proximal a β -arrestina. En comparación con su forma silvestre la β -arrestina se une significativamente mejor en el *vl* truncado, aun así el Gpr161^{vl} truncado no es removido del cilio tras la señalización Shh.⁸⁵ Sin embargo, la retención ciliar del Gpr161^{vl} truncado no resulta en defectos de la señalización Shh.⁸⁵ Perturbaciones locales de otras vías morfogenéticas, incluyendo la Wnt canónica podrían contribuir con los DTN caudales.⁹¹ Mientras que el directo acoplamiento de PKA por la hélice anfipática podría funcionar al restringir un incremento de señalización Shh, el mutante Gpr161^{vl} no causa defectos globales de la señalización Shh en contraste con el alelo nulo.^{92 91} Por tanto, la actividad Gpr161 puede persistir en ausencia de acoplamiento directo de PKA por la hélice anfipática. En general, Gpr161 es un factor crítico en la maquinaria basal de supresión de señalización Shh, la morfogénesis y el cierre del TN. Factores que regulan el tráfico Gpr161 en el cilio primario incluyen a la proteína 3 tipo-tubby (Tulp3) y al complejo A intraflagelar (IFT-A).⁹³ Cualquiera de estos knockouts resulta en señalización Shh incrementada, fenocopias de mutantes nulos Gpr161 que exhiben ventralización del TN caudal y DTN como exencefalia y EB.^{94 95 96 97}

Mutaciones del gen que codifica $G\alpha_s$ en embriones *Gnas*^{-/-} resultan en TN abierto y letalidad embrionaria hacia el E9.5.⁹⁸ Los embriones *Gnas*^{-/-} tienen una regulación a la alta de la señalización Shh y muestran ventralización del TN.^{98 89} Además, el knockout *Gnas* mesodermo-específico (*Dermo1-Cre; Gnas*^{fl/-}) muestra exencefalia hacia el E14.5 ($\approx 20\%$).⁹⁸

Todas las isoformas PKA reguladoras se expresan en el TN en desarrollo pero solo los knockouts *Prkar1a* muestran un TN abierto en las regiones del cerebro anterior y medio con un grave arresto del crecimiento.⁹⁹ En ratones con pérdida parcial de las subunidades catalíticas (*Ca*^{+/-}; *C β* ^{-/-}; ratón PKA deficiente), el 100% de embriones muestran EB y el 25% exencefalia

hacia el E12.5.¹⁰⁰ La pérdida completa de PKA ($C\alpha^{-/-}$; $C\beta^{-/-}$; ratón PKA nulo) resulta en DTN y letalidad embrionaria hacia el E9.¹⁰¹ Los embriones PKA deficientes o nulos muestran ventralización del TN en una manera dependiente de Gli2.¹⁰¹

Los embriones knockout Sufu muestran ventralización del TN.¹⁰² La pérdida de factores que regulan la maquinaria basal de represión de la vía de señalización Shh (Tulp3-IFT-A-Gpr161-Gas-PKA-Sufu) pueden todos resultar en una incrementada señalización Shh en el TN y por tanto en DTN.

La mayoría de los homólogos de la vía HH no se han asociado con enfermedad en humanos, sin embargo polimorfismos en algunos de estos genes se asocian a un conjunto común de trastornos. Mutaciones en *SHH*, similar a lo que ocurre en ratones, se asocian con holoprosencefalia (HPE), tanto en casos familiares como en esporádicos. Mutaciones con pérdida de función de *DISP1* se asocian a fenotipos tipo HPE, al igual que ocurre con mutaciones en *GLI2* o *PTCH1*. Se predice que mutaciones en *PTCH1* potencian la acción de PTCH1 sobre la represión de la vía Hedgehog. La formación de tumores es una afección aparentemente común en pacientes con disrupción en genes de la vía Hedgehog. Polimorfismos en *SUFU* se asocian con meduloblastoma, mientras que mutaciones en *GLI1* se asocian con gliomas. Estas asociaciones son de esperarse, dada la interacción entre la señalización Hedgehog y la regulación de la proliferación celular y apoptosis.

1.6.3. Vía de polaridad celular planar, transducción ciliar y su relación con DTN.

La vía de polaridad celular planar (PCP) es una cascada de señalización no canónica Wnt-Frizzled-Dishevelled, altamente conservada (Figura 8), que controla la polarización de las células epiteliales en el plano de un epitelio. En vertebrados, esta vía tiene un papel clave en el establecimiento y mantenimiento de una coordinada orientación polarizada de las células, necesaria para numerosos procesos del desarrollo, incluyendo movimientos direccionales durante la gastrulación y neurulación en vertebrados.

La vía Wnt no canónica, a diferencia de la canónica, es independiente de beta-catenina y funciona a través de calmodulina quinasa (CamK) y JNK, reordenando el citoesqueleto

para regular la morfología y orientación celulares en el campo planar. Durante la neurulación, la señalización PCP organiza protrusiones celulares basadas en actina (lamelipodios) en las células de la placa neural, permitiendo a las células moverse medio-lateralmente e intercalarse una con otra. Este movimiento celular direccional causa la extensión de la placa neural a lo largo

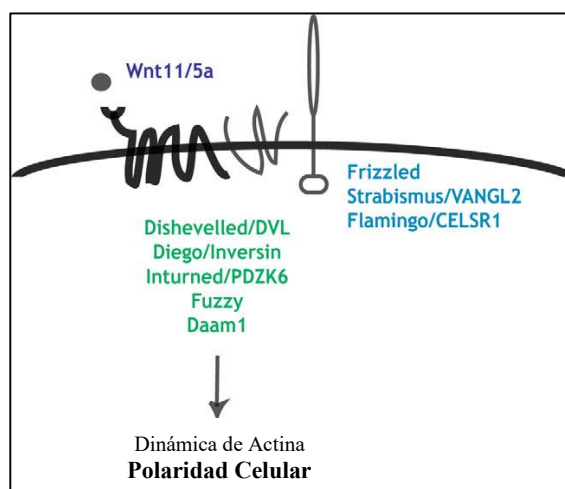


Figura 8. Cascada de señalización PCP. La vía PCP inicia señales extracelulares (morado) a través de la membrana (componentes azules) e influye sobre la dinámica de actina del citoesqueleto (componentes verdes), controlando la polaridad celular.³

del eje antero-posterior con el concomitante estrechamiento en dirección perpendicular, proceso conocido como extensión convergente.¹⁰³ El estrechamiento de la placa neural permite que los pliegues neurales laterales se opongan y fusionen.

Los componentes PCP claves incluyen a la proteína Van Gogh/Strabismus (*Vangl1/2* en vertebrados) de cuatro pasos transmembrana, dos proteínas Frizzled (*Fz*) de siete pasos transmembrana, una cadherina atípica Flamingo (*Fmn*, o *Starry Night*, *Celsr* en vertebrados) y a las proteínas citoplasmáticas Prickle (*Pk*), *Dishevelled* (*Dsh/Dvl*), y *Diego* (*Dgo* o *Diversin* en vertebrados). Estas proteínas PCP forman un complejo de señalización asociado a la membrana donde su localización subcelular, cantidad y distribución son cruciales para una señalización PCP normal. Efectores río debajo de esta vía incluyen pequeñas GTPasas de la familia RhoA y JNK que tras la activación conducen a una variedad de respuestas celulares incluyendo el reordenamiento del citoesqueleto.¹¹

Una función apropiada de la vía PCP en la neurulación podría asegurar una polarización global normal, lo que no solo significa que las células en el plano se coordinan una a otra, si no también que los tejidos corporales se desarrollen en armonía. El orden específico, altamente controlado y asimétrico de estos componentes diana PCP, que parece ser altamente sensible a la orientación de los lados celulares con respecto al eje global del epitelio, permite que la polaridad de la célula se establezca dentro del plano del epitelio y promueve el reordenamiento de los componentes del citoesqueleto. Aunque la localización asimétrica de algunos de estos factores PCP ha sido documentada en algunos tejidos de vertebrados, por ejemplo durante la gastrulación y neurulación en el pez cebra, no existe aún un conjunto completo de datos y por tanto un modelo equivalente al de *Drosophila*. Recientemente se ha demostrado que la distribución asimétrica de los componentes diana PCP como *Pk1* en la placa neural es esencial para el cierre del tubo neural. Otro ejemplo es la localización asimétrica de *Pk* y *Dsh* durante el proceso de extensión convergente en el pez cebra.

DVL es esencial para el proceso de extensión convergente. En el modelo experimental de *Xenopus* que carece de función del ortólogo de *DVL* (*Dvl*) se forman lamelipodios pero no se logra la polarización celular; su orientación es al azar, teniendo como resultado falla en la extensión convergente. La disrupción de la vía de señalización PCP en ratones causa DTN graves. Componentes PCP, como *Dvl*, *Celsr1* y *Fz3/Fz6* son esenciales para el cierre caudal del tubo neural en ratones.

La disrupción experimental de componentes clave de la vía PCP, específicamente la pérdida de función de genes clave de la vía como son *Vangl2*, *Celsr1* y *Dishevelled*, resultan en craneoraquisquisis, a causa de falla en la iniciación de la formación del tubo neural en el sitio de cierre 1. Este fenómeno es distinto a la exencefalia y EB observados en los mutantes ciliares, sin embargo una disrupción parcial de la actividad de la vía PCP puede resultar en EB, tal como se observa en algunos mutantes heterocigotos *Vangl2* o en los mutantes heterocigotos compuestos entre *Vangl2* y *cordon bleu* (*Cobl*).^{14 81 104}

El ratón mutante, Looptail (Lp), muestra craneoraquisquisis, fenotipo resultante de mutación en *Vangl2*, el ortólogo en vertebrados del gen diana PCP *Strabismus*. Para determinar los fenotipos producidos en dobles heterocigotos Murdoch *et al*¹⁰⁴ generó ratones con combinaciones de tres pares de mutaciones: *Vangl*^{2Lp}, *Scrib*^{Crc} y *Celsr1*^{Crsh}, los mutantes PCP más estudiados. La mayoría de los embriones doble-mutantes tuvieron DTN abiertos, con un rango de fenotipos que incluía de anencefalia a espina bífida, reflejando los defectos observados en humanos. Se observó, incluso con una base genética uniforme, variabilidad en la penetrancia y gravedad de los fenotipos mutantes entre las diferentes combinaciones de dobles heterocigotos. Fenotípicamente, los triples heterocigotos *Celsr1*^{Crsh}; *Vangl*^{2Lp}; *Scrib*^{Crc} no eran más graves que los dobles heterocigotos o que los homocigotos mutantes. En base a lo anterior se propone que parte de la variación entre los fenotipos doble-mutantes puede atribuirse a la naturaleza de la disrupción proteica en cada alelo: mientras *Scrib*^{Crc} es un mutante nulo y no produce proteína Scrib, ambos homocigotos *Celsr1*^{Crsh} y *Vangl*^{2Lp} expresan proteínas mutantes, lo cual es consistente con efectos dominantes.

Los resultados variables de estas interacciones génicas son de relevancia directa para los DTN en humanos y enfatizan la importancia de realizar tamizajes genéticos integrales al investigar defectos congénitos. Aunque mutaciones heterocigotas en un solo gen podría no tener efecto, la disrupción de múltiples genes podría combinarse en un individuo para tener consecuencias devastadoras sobre el desarrollo embrionario. No se debe subestimar el potencial efecto de variantes genéticas incluso si se detectan en individuos no afectados, ya que la combinación de múltiples mutaciones es muy probablemente un factor crítico para los DTN en humanos.

Los receptores 1 a 3 de CELSR pertenecen a la familia B de GPCRs (receptores acoplados a proteína G)¹⁰⁵, en su porción N-terminal presentan dominios repetidos de cadherina siendo moléculas de adhesión celular dependientes de calcio. La adhesión célula-célula participa en la activación de los CELSRs.¹⁰⁶ El ratón *Crash* (*Crsh*^{-/-}) tiene una mutación de sentido erróneo en la región codificante de *Celsr1* y muestra craneoraquisquisis hacia el E38.5 y exencefalia hacia el E12.5.¹⁰⁷ CELSR1 se concentra en las uniones adherentes orientadas hacia los ejes mediolaterales de las placas neurales, recluta a Frizzled y Dishevelled, resultando en una activación localizada de PDZ-RhoGEF y cinasa Rho (ROCK), lo que induce contracción de actomiosina a lo largo del eje medio-lateral y doblamiento de la placa neural.³¹ Los embriones *Celsr2*^{-/-} y *Celsr3*^{-/-} no muestran DTN.¹⁰⁸

Conociendo la importancia en vertebrados de los cilios primarios en la recepción de señales extracelulares, no es sorprendente que estén implicados en la regulación de la vía PCP. Además componentes claves de la vía PCP, *Vangl2* y *Dvl*, se localizan dentro de los cilios o en su cuerpo basal. El gen *Fuzzy* de la vía PCP participa en la polaridad planar en moscas y en la formación del tubo neural en vertebrados; en ratones knockout Fuzzy se observan DTN y cilios primarios defectuosos.

En ratones se ha observado que la disrupción de la vía de señalización PCP causa DTN, así como se observa en la disrupción de genes BBS necesarios para el ensamblaje y mantenimiento

ciliar.⁷⁴ Ratones mutantes ciliares muestran defectos PCP en el oído interno y en modelos de pez cebra knockdown para proteínas ciliares se observan fenotipos PCP incluyendo extensión convergente defectuosa y malformaciones de la cola.¹⁰⁹ Existe una conexión funcional y estructural entre componentes ciliares y PCP: la proteína inversina, que ha sido estudiada en la función ciliar, es también una proteína clave en la vía PCP.¹¹⁰ La inversina se une y bloquea a Dvl mediante la activación de la vía canónica Wnt, y funciona como un interruptor entre las vías canónica y no canónica Wnt. La conexión entre señalización PCP y proteínas ciliares se evidencia con el hallazgo de que las proteínas PCP Vangl2 y Dvl se localizan en la base de los cilios en las células de vertebrados. Otro vínculo entre PCP y cilios proviene de experimentos con embriones de *Xenopus*, en los que la disrupción de *Inturned* o *Fuzzy* ocasiona defectos de cierre del tubo neural, prominentemente rostrales. En estos modelos de *Xenopus* se demostró que los DTN se originan por falla tanto en la señalización PCP como en la de Hedgehog. Esto sugiere que *Inturned* y *Fuzzy* tienen un papel en la estructura o función ciliar.¹¹⁰ En ratones knockout *Fuzzy* se observan tanto DTN como cilios primarios defectuosos.

Dado que el gen *FUZ* se expresa en el tubo neural emergente y que en ratones *knockout* se observan DTN, se ha estudiado en humanos con DTN y se han identificado cambios no sinónimos, demostrando que varias de estas mutaciones afectan la formación de los cilios primarios, la longitud ciliar o el movimiento celular direccional.⁷²

De Marco *et al* muestra una revisión de los genes de la vía PCP en la etiología de los DTN en humanos, actualizando la lista de las mutaciones raras y deletéreas identificadas hasta la fecha.⁷³ Se han reportado 50 mutaciones no sinónimas en genes PCP en 54 pacientes con DTN, que tienen un efecto patogénico sobre la función proteica. Las mutaciones en genes PCP asociadas con DTN en humanos son poco frecuentes, la mayoría de sentido erróneo, en estado heterocigoto y transmitidas por un progenitor sano.⁷⁴ Se han encontrado mutaciones en las regiones codificantes de genes centrales de la vía PCP: *CELSRI*, *FZD6*, *PRICKLE1*, *DVL2*, *VANGL1* y *VANGL2*, así como de genes asociados a la vía PCP: *SEC24B*, *DACT1*, *FUZ* y *SCRIB*. Las mutaciones en genes *VANGL* se estima contribuyen a un 0.4-2.5% de los DTN en humanos.^{78 111} Además el rango de fenotipos DTN asociado a mutaciones PCP es mucho mayor al observado en ratones mutantes y no ha sido posible identificar alguna correlación genotipo-fenotipo,⁷³ observándose ya sea defectos abiertos como craneoraquisquisis, anencefalia y mielomeningocele, o defectos cerrados como lipomielomeningocele, mielocistocele terminal y agenesia sacra, e incluso diastematomelia y trastornos del filum terminal.⁷⁴

En humanos, es posible que estas variantes PCP actúen como mutaciones dominantes con penetrancia variable, aunque también se sugiere podrían interactuar de manera digénica o poligénica con otros, aún no identificados, factores genéticos de riesgo generando la diversidad observada en los fenotipos DTN. Además, en ratones se sabe que el gen *Vangl2* interactúa con genes no-PCP resultando en espina bífida abierta o exencefalia, proveyendo de un paradigma sobre la participación de estas interacciones génicas en la causalidad de los DTN.¹⁰⁴ En humanos con EB, craneoraquisquisis y agenesia caudal también se han identificados mutaciones *CELSRI* de sentido erróneo.^{75 112 113}

1.6.4. Vía de señalización canónica Wnt, transducción ciliar y su relación con DTN.

La señalización de la vía canónica Wnt/beta-catenina tienen un papel crítico en una amplia gama de procesos biológicos, incluyendo la proliferación celular, la migración, el establecimiento de la polaridad, la auto-renovación de células madre y el destino celular durante el desarrollo. La señalización Wnt es importante para la regulación del patrón dorso ventral del tubo neural, ya que las señales Wnt y BMP desde el techo de la placa neural y la superficie del ectodermo son importantes para la regulación de la identidad neuronal dorsal.

El ligando Wnt se une a los receptores Frizzled (Fz) y Lrp5/6 tras lo cual Dishevelled (Dvl) es reclutado a Fz. Posteriormente Dvl se une y desestabiliza el complejo de destrucción de beta-catenina que consiste de Axina/Conductina, la proteína supresora de tumores poliposis adenomatosa familiar y la glucógeno sintetasa-quinasa 3. Este complejo se une constitutivamente a beta-catenina dirigiéndola para su poli-ubiquitinación y degradación en el proteosoma. Cuando el complejo de destrucción de beta-catenina es desestabilizado, la beta-catenina se acumula en el núcleo donde se une a miembros de la familia de factores de transcripción LEF/TCF, previniendo su represión de transcripción génica y funcionando como un co-activador de transcripción.¹⁰⁹

Ankrd6, un homólogo en vertebrados del mediador PCP *diego*, actúa como un interruptor entre ambas vías Wnt; su localización centrosómica es crucial para la función de la vía. Promueve la señalización de la vía PCP y simultáneamente inhibe la transcripción génica a través de la vía canónica Wnt/beta-catenina. La Diversina, codificada por *Ankrd6*, es una proteína citoplásmica con ocho dominios repetidos anquirina N-terminales, un dominio central conservado y un dominio C-terminal. En vertebrados, la Diversina interactúa directamente con Dvl a través de sus repetidos anquirina y ambas proteínas median de manera mútua la señalización Wnt/PCP en cultivos celulares y en embriones de pez cebra. La Diversina también se une a CK1ε y a Conductina o Axina a través de sus dominios centrales y C-terminal, respectivamente. Esto lleva a reclutamiento de CK1ε hacia el complejo de degradación de beta-catenina con la subsecuente inhibición de la señalización beta-catenina/TCF.¹¹

Wnt5 y *Wnt11* son miembros clave de la vía Wnt y también se asocian a la vía de señalización PCP. Recientemente se ha reportado que *wnt5a/pipetail* y *wnt11/silberblick* controlan el movimiento celular durante la embriogénesis del pez cebra por medio de la vía PCP.¹¹⁰ El componente PCP *Wnt11* podría estar involucrado en el movimiento de extensión convergente que tiene lugar durante la gastrulación y tal vez, de forma más amplia, durante la organogénesis. Dishevelled es un componente diana en ambas vías PCP y Wnt. La inversina participa en el control del balance entre la vía de señalización Wnt canónica y no canónica. Una mayor actividad de Inversina favorece a la señalización no canónica (vía PCP) y una menor actividad favorece a la vía de señalización canónica Wnt.¹¹⁰

La vía canónica Wnt/beta-catenina requiere de los cilios para la transducción de señales. En ratones, la proteína asociada al cuerpo basal ciliar Chibby (Cby), regula la señalización Wnt mediada por beta-catenina. Estudios en *Xenopus laevis* apoyan el papel de Cby en la mediación de la red de interacciones entre la ciliogénesis, los sistemas de señalización y el patrón tisular.¹¹⁴

La disrupción experimental de algunas moléculas involucradas en la señalización canónica Wnt también conduce a DTN, incluyendo *Axin1* y *Lrp6*. La disrupción de las proteínas *Frizzled* o *Dishevelled* resulta en DTN aunque en estos mutantes tanto la vía canónica como la no canónica de Wnt se ven afectadas. En el ratón knockout condicional para beta-catenina en los pliegues neurales dorsales se ha demostrado la importancia de la vía canónica Wnt en el cierre del tubo neural en la región caudal. En este ratón knockout una expresión disminuida de Pax3 y Cdx2 en el neuroporo posterior dorsal y de genes diana de la señalización Wnt/beta-catenina, Tbx6 y Fgf8 en la eminencia caudal, conduce a espina bífida abierta y doblamiento del eje caudal.¹¹⁵ En estudios en humanos se ha demostrado asociación entre DTN y mutaciones *LRP6* raras, las cuales reducen la actividad de la vía canónica Wnt y potencian la señalización PCP.¹¹⁶

1.7. ASPECTOS CLÍNICOS DEL MIELOMENINGOCELE

1.7.1. Diagnóstico.

La mayoría de los DTN son aparentes al momento del nacimiento. Los DTN cerrados tienen una presentación variable, lo más común es una masa quística y algún estigma cutáneo (ya sea un área de hipo o hiperpigmentación, aplasia cutis, seno dérmico congénito, teleangiectasia/hemangioma capilar, hipertrichosis, apéndices cutáneos, o una hendidura glútea asimétrica).¹¹⁷ La segunda razón de búsqueda de atención médica es por asimetría en longitud y/o volumen de los miembros pélvicos. Otras presentaciones incluyen: escoliosis progresiva, dolor lumbar con o sin déficit neurológico dependiendo de su asociación con una médula anclada.

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

En los casos con MMC es común encontrar defectos congénitos asociados, sobre todo del mismo sistema nervioso central. La hidrocefalia es el defecto más comúnmente asociado; se presenta en el 90% de los casos con MMC lumbosacro. La malformación de Arnold-Chiari tipo II se presenta en más del 70% de los casos con MMC y se refiere a una constelación de anomalías que incluye herniación cerebral posterior (desplazamiento inferior de la médula, el cuarto ventrículo y el cerebelo hacia el canal espinal), anomalías del tronco encefálico, senos venosos bajos, y una fosa posterior pequeña. La malformación de Chiari II puede tener efectos en las

funciones motora, cognitiva y de nervios craneales, lo cual se complica por los efectos adversos de la hidrocefalia y la derivación de la hidrocefalia.¹¹⁸ En un 10-15% de los pacientes con MMC se presenta retraso mental grave.

1.7.2. Valoración y tratamiento integrales de los individuos afectados con mielomeningocele.

En el recién nacido con MMC la resonancia magnética nuclear es el estudio de elección para valorar el tejido neural y para identificar el contenido del defecto. La tomografía computarizada permite la visualización directa de la anatomía y el defecto óseo. Este último también se usa para determinar la presencia o ausencia de hidrocefalia u otras anomalías intracraneales. El estudio urodinámico permite valorar el involucro del sistema urinario en los afectados. Para el tamizaje prenatal se utiliza la ultrasonografía (USG) y los niveles séricos maternos de alfa-feto proteína (AFP). En la etapa postnatal el USG es de utilidad para la búsqueda rápida de hidrocefalia.

La observación mediante imágenes ultrasonográficas secuenciales en fetos con MMC llevo a sugerir que las alteraciones en los sistemas nerviosos centrales y periféricos podrían ser progresivas, perdiéndose el movimiento de extremidades inferiores y empeorando la herniación cerebral posterior y la hidrocefalia durante la gestación fetal.¹¹⁹ Posteriormente estudios en animales mostraron que el cubrimiento prenatal de lesiones tipo-EB preservaba la función neurológica y mejoraba la herniación cerebral posterior.¹²⁰ Así es como surgió la hipótesis del “doble-hit” en el que el déficit neurológico final se da por la combinación de una falla en la formación del tubo neural y de lesión al cordón espinal resultado de la exposición prolongada de los elementos neurales al ambiente intrauterino.

Hacia 1997 se realizó la primera reparación prenatal de MMC mediante histerotomía. El ensayo clínico aleatorizado MOMS (Management of Myelomeningocele Study), demostró que la cirugía prenatal para el MMC reducía la necesidad de derivación ventriculoperitoneal en comparación con la cirugía postnatal (RR 0.48, $p < 0.001$), mejoraba el desarrollo mental y la función motora ($p = 0.007$) así como la herniación cerebral posterior y la ambulación.¹²¹

Dentro de los riesgos maternos reportados se encuentran: parto pretérmino, desprendimiento de placenta y adelgazamiento uterino o dehiscencia para el embarazo índice; dehiscencia y ruptura uterinas en embarazos subsecuentes (14%). Respecto a la técnica quirúrgica de elección para la reparación prenatal existe controversia entre la cirugía abierta y la fetoscópica. Se ha reportado que la técnica endoscopia resulta en mayores tasas de muerte fetal, ruptura prematura de membranas, corioamnionitis, oligohidramnios, parto prematuro y herniación cerebral posterior persistente.^{122 123} Recientemente en un ensayo clínico de reparación endoscopia prenatal en pacientes con EB abierta se utilizó una técnica que implica liberación de la neuroplacoda, colocación de un parche de biocelulosa sobre la lesión y cierre cutáneo simple, a diferencia de la técnica clásica en el que la duramadre se disecciona y el defecto se cierra en múltiples capas.¹²⁴ En los resultados de fase I para este ensayo se observó reversión de la herniación cerebral, mejor función motora, sin morbilidad materna significativa, adelgazamiento o dehiscencia miometrial; sin embargo las limitaciones reportadas fueron ruptura prematura de

membranas y prematuridad, requiriendo de ensayos fase II para prevenir tales complicaciones y analizar los riesgos y beneficios para esta técnica quirúrgica.¹²⁴

El cierre quirúrgico del MMC neonatal debe realizarse a la brevedad y su objetivo primario es detener la pérdida de LCR y prevenir la infección del tejido nervioso expuesto. Para hacerlo la placa neural es liberada, la dura madre cerrada de manera hermética, y los músculos paravertebrales aproximados, la piel es cerrada. Aproximadamente 52-91% de los pacientes requerirá de una derivación ventriculoperitoneal para tratar la hidrocefalia. Las complicaciones que pueden ocurrir tras la reparación quirúrgica y la derivación ventriculoperitoneal: obstrucción, infección, síndrome de médula anclada. Para tales complicaciones se requiere nuevamente de neurocirugía, que puede ocasionar mayor pérdida de función neurológica. En caso de hidrocefalia se indica la derivación ventriculoperitoneal al momento del cierre y que posteriormente requerirá de monitorización de por vida, siendo susceptibles de falla de la derivación o infección¹²⁵. Los pacientes con malformación de Chiari sintomática deben ser sometidos a una craneotomía suboccipital y descompresión de la fosa posterior y de las amígdalas. En general los afectados con estas MC requieren de valoración inicial multidisciplinaria integrada por un equipo de Neurocirugía, Urología, Ortopedia y Terapia Física. Para su seguimiento requerirán de un equipo compuesto por Neonatología, Neurología Pediátrica, Ortopedia Pediátrica, Urología, Medicina Física, Cirugía Ortopédica y Psicología.

1.7.3. Morbilidad, mortalidad y pronóstico.

Dentro de los DTN más comunes se encuentran el MMC y la anencefalia, esta última incompatible con la vida; la supervivencia de los recién nacidos afectados por anencefalia se limita a unas pocas horas (<2 días). El DTN más común y compatible con la vida es el mielomeningocele. La parálisis, la disfunción vesical e intestinal, y la hidrocefalia son las complicaciones clínicas más comunes en el MMC. El daño al cordón espinal y nervios periféricos usualmente es evidente al nacimiento e irreversible a pesar de una temprana reparación quirúrgica postnatal. La gravedad de la discapacidad neurológica en las extremidades inferiores se correlaciona con el nivel de lesión en el cordón espinal.¹¹⁸ La tasa de mortalidad para los nacidos con mielomeningocele se ha reportado en un 10% aproximadamente.¹²⁶

El avance en el cuidado del paciente con EB en las últimas décadas ha resultado en una ganancia en longevidad y calidad de vida para los afectados y sus cuidadores. La disfunción vesical es muy común en pacientes con EB y puede resultar en infección, cicatrización renal y enfermedad renal crónica.¹²⁷ Se ha observado que los pacientes con EB desarrollan falla renal a una edad mucho más temprana en comparación con quienes no padecen EB.¹²⁸ Por tal motivo los centros para el control de enfermedades (CDC) dirigieron el diseño de un plan de tratamiento que determinara un estándar de cuidado para los pacientes con EB, cuyos tópicos de investigación incluyen el manejo de las infecciones del tracto urinario, el número ideal de ultrasonidos necesarios durante el primer año de vida y las características descriptivas de los afectados durante el primer año de vida.¹²⁷

A pesar de un cuidado médico intensivo, un 10-15% de los afectados fallecen durante la infancia temprana. La mayoría de los afectados con MMC aislado y tratados oportunamente sobreviven hacia la etapa adulta, y su expectativa de vida es cercana a la de la población general, sin embargo, invariablemente presentan algún grado de discapacidad multisistémica.¹²⁹ Un 65% tienen inteligencia normal, aunque de estos, un 60% muestran algún grado de trastorno intelectual (particularmente dificultades en matemáticas y en la solución de problemas). En estos niños también se ha descrito trastorno por déficit de atención sin hiperactividad. En un 85% de los casos se presenta hidrocefalia, pero no guarda relación con el grado de inteligencia; alrededor de un 80% presentan suficiencia social (aunque muchos suelen requerir cateterización vesical intermitente). Las complicaciones a mediano y largo plazos suelen ser infecciosas y de disfunción vesical.

Para el MMC, y en ausencia de MC adicionales, la tasa de mortalidad en 1990 era del 21%. Previamente las principales causas de muerte durante la infancia eran la ventriculitis y las complicaciones relacionadas a la derivación ventricular por hidrocefalia; actualmente es la disfunción del tronco cerebral a causa de la malformación de Chiari, que lleva a disfunción respiratoria y disfunción para deglutir. En la mayoría de los estudios a largo plazo, son las complicaciones renales la causa más común de muerte en pacientes que sobreviven hacia la edad adulta. La hidrocefalia se ha considerado como una secuela casi inevitable del mielomeningocele, requiriendo derivación neuroquirúrgica hasta en el 80-90% de los casos. Las tasas de infección del shunt de derivación son mayores en pacientes con MMC que en otros grupos de hidrocefalia. La tendencia en las últimas décadas hacia un manejo más conservador, evitando en lo posible el uso de shunts de derivación, permitiendo incluso una ventriculomegalia moderada, ha disminuido las complicaciones relacionadas a este.¹³⁰ La malformación de Chiari tipo II se presenta en casi todos los pacientes con MMC y es causa de sintomatología en aproximadamente 1/3 de los pacientes afectados.

Respecto a la ambulación, en ausencia de retraso del desarrollo (que se observa en 13% de pacientes con MMC) los niveles de movilidad independiente se relacionan de forma estrecha con el nivel de lesión neurológica. Para lesiones lumbares bajas y sacras, la movilidad independiente se da en casi todos los casos. Para lesiones por encima de L2, la pérdida de función de los músculos cuádriceps e ileo-psoas traducen una muy baja probabilidad de movilidad independiente.¹³¹

1.8. PREVENCIÓN.

Al momento no existe un tratamiento efectivo para el MMC una vez que el TN ha fallado en su cierre, y dado que el cierre normalmente se completa hacia el día 28 de gestación aproximadamente, la terapia preventiva debe administrarse periconcepcionalmente, definiéndose esta entre 8 semanas antes y 8 semanas después de la concepción. Diversos ensayos clínicos en humanos han mostrado que la suplementación materna con AF previo al embarazo y durante etapas tempranas del mismo, puede prevenir tanto la ocurrencia como la recurrencia de los DTN.^{132 133} La suplementación periconcepcional con 0.4mg/día de ácido fólico reduce la ocurrencia de DTN en un 50% o más, y la suplementación periconcepcional con 4mg/día de

ácido fólico reduce la recurrencia de DTN hasta en un 75%.⁴¹ Lo anterior ha llevado a la recomendación generalizada de que toda mujer en edad fértil o que planea un embarazo debe recibir un suplemento de 0.4mg de AF diario, y aquella mujer que haya tenido previamente un hijo con DTN debe recibir 2 a 4mg/día de forma periconcepcional. Sin embargo, existe un subgrupo de MMC que no son prevenibles con las estrategias actuales, ya que la incidencia de casos resistentes a AF es de 0.5-0.7 por 1000 embarazos aproximadamente.

En 1992 en Estados Unidos se recomendó el consumo diario de 400 microgramos de AF para toda mujer en edad reproductiva, para reducir el riesgo de tener un embarazo afectado por DTN.⁴⁹ En 1996 la FDA ordenó que hacia enero de 1998 todo producto marcado como “enriquecido” (pan, cereal, arroz) tuviera adición de ácido fólico para ayudar en la reducción del riesgo de DTN, acción conocida como fortificación de ácido fólico. El cambio estimado en la prevalencia de DTN antes y después de la introducción de la fortificación con AF ha sido de una reducción del 28% para anencefalia y espina bífida. Una mayor reducción (35%) se observa para programas de vigilancia de MC que activamente consideran el diagnóstico prenatal para los DTN respecto a los programas que no lo consideran (21%).¹³⁴ En EU se estima que a partir de la fortificación con AF cada año alrededor de 1,300 bebés nacen sin un DTN (específicamente 600-700 sin EB) que de no haber ocurrido la fortificación habrían presentado un DTN.¹³⁴ Además se ha estimado que la cantidad de dinero ahorrado como resultado de la política de fortificación es de 400 millones a 600 millones de dólares cada año en EU.¹³⁵

Respecto al inositol, recientemente se realizó un estudio piloto para evaluar su papel en la prevención de recurrencia de DTN, mostrando efectividad preventiva en humanos y sirviendo como un estudio preliminar para un futuro ensayo clínico a gran escala.⁵² En ensayos clínicos para el tratamiento de trastornos psiquiátricos, el inositol ha sido bien tolerado en dosis relativamente altas, y en ratones no se han observado efectos teratógenos en los fetos tratados.¹³⁶

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

El MMC es causa frecuente de mortalidad en el periodo perinatal, y en los sobrevivientes afectados es causa de discapacidad sea por el defecto *per se* o por las complicaciones asociadas a esta MC. Además del problema médico que representa el MMC, también afectan emocionalmente al paciente y su familia, y constituyen un considerable costo económico para las familias de los afectados y para los diferentes sistemas de salud del país. Reconociendo el problema de salud que representan los DTN, en especial el MMC, es necesario obtener el mayor grado de conocimiento posible sobre sus causas y mecanismos de desarrollo, para así poder establecer estrategias de prevención y/o tratamiento que permitan reducir su frecuencia y complicaciones asociadas. Al respecto, nuestro equipo de trabajo ha establecido una línea de investigación para la identificación de factores de riesgo para el desarrollo de MMC en nuestra población mestizo-mexicana. Hemos estudiado diversos factores genéticos y ambientales en un diseño combinado de familias nucleares, así como de casos y controles, con un especial énfasis en los genes que participan en el metabolismo de los folatos. Reconocemos la necesidad de

evaluar genes relacionados con diversas vías de señalización y procesos celulares con el objetivo de detectar posibles efectos compuestos o combinaciones de alelos de riesgo que, individualmente, pueden no mostrar significancia estadística.

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los defectos del tubo neural son la segunda causa más frecuente de malformaciones congénitas en la gran mayoría de las poblaciones estudiadas. Son defectos graves, de mal pronóstico y frecuentemente letales. De estos, su prevalencia al nacimiento varía (0.5-5/1000) en diversos grupos étnicos y poblaciones de distintos países así como dentro de un mismo país.⁴
³⁴ En México la anencefalia y el MMC, los tipos más frecuentes de DTN (70-80% de los casos), presentan una muy elevada prevalencia al nacimiento: 1/467 recién nacidos.⁴

Debido a la alta prevalencia al nacimiento del MMC, al impacto psicosocial, el alto costo del tratamiento y la morbi-mortalidad que representa se han realizado durante las últimas dos décadas numerosas investigaciones con el propósito de identificar factores de riesgo genéticos y ambientales asociados a esta MC. Si bien estudios exitosos han permitido identificar ciertos genes relacionados, se estima que aproximadamente el 80% del riesgo genético para los DTN en general, y para el MMC en particular, continúa siendo desconocido. Además la investigación de la varianza genotípica de esta MC se complica aún más por la heterogeneidad del riesgo de ocurrencia observado en diversos grupos culturales y étnicos. La dificultad mayor en el estudio de la mayoría de las MC es su etiología multifactorial, resultado de la predisposición genética basada en un sistema poligénico en interacción con factores nutricionales y ambientales diversos, pudiendo esta interacción tener un efecto aditivo y/o multiplicativo de predisposición a la presentación del MMC.

Se conoce que ciertas vías de señalización son esenciales para el cierre del tubo neural e incluyen la vía de polaridad celular planar (PCP), la vía de señalización Hedgehog (Hh) y la vía de señalización Wnt (canónica). Los cilios se encuentran presentes en la mayoría, si no es que todas, las células epiteliales del cuerpo humano. Recientemente se ha propuesto que el cilio es necesario para la transducción de señales de ciertas vías del neurodesarrollo entre las que resaltan la vía de señalización Hedgehog, así como las vías canónica y no canónica de Wnt.²⁸

76 77

Se requieren estudios que evalúen de manera integral genes relacionados con diversas vías de señalización y procesos celulares, tales como las mencionadas previamente, con el objetivo de detectar posibles efectos compuestos o combinaciones de alelos de riesgo que, individualmente, pueden no mostrar significancia estadística. El poder identificar factores de riesgo genético asociados a estos defectos permitiría aportar conocimiento sobre la etiología de estas MC y así dirigir estrategias de prevención específicas.

2.2. JUSTIFICACIÓN.

Dada la alta frecuencia del MMC, la complejidad que implica su tratamiento, la cronicidad de la afección y el gran costo emocional y económico para el paciente, su familia y los sistemas de salud, esta malformación congénita representa un importante problema de salud pública, justificándose plenamente en costo y beneficio el esfuerzo de apoyar el desarrollo de investigaciones que permitan una mayor comprensión de su etiología, con especial énfasis en factores de riesgo genético, que permitan establecer estrategias adecuadas de prevención para la población en riesgo. Es importante también considerar la marcada diferencia en la frecuencia de presentación y riesgo de recurrencia del MMC en distintas poblaciones y grupos étnicos, muy probablemente explicable por la contrastante estructura genómica de estas y por las características ambientales en que las mismas se reproducen.

Consistente con lo mencionado, son necesarios estudios multicéntricos y multidisciplinarios que analicen las posibles interacciones gen-gen y gen-ambiente como etiológicamente relacionados a la presentación del MMC en nuestra población. Estos deberán incluir la investigación de múltiples genes, en relación a diversas vías o procesos celulares, que puedan contribuir al desarrollo de estas MC.

La compleja interacción entre las vías de señalización Hh, Wnt, y PCP durante el proceso de cierre del tubo neural tiene que ser considerada en la investigación de la etiología de los DTN. El hecho de que se requiera un cilio estructural y funcionalmente íntegro para la transducción de señales de vías del desarrollo conocidas esenciales para el cierre del tubo neural, así como la sobre posición de los fenotipos asociados ante la disfunción experimental de algún componente de esta compleja red de interacción, hacen evidente la necesidad de estudiar de manera integral la implicación de estos componentes en el desarrollo de MMC en humanos.

Consideramos que el estudio de factores genéticos asociados al MMC en diferentes grupos de la población mexicana permitirá conocer mejor el comportamiento de estos factores, entender mejor la etiología del MMC y de los DTN en general. Este conocimiento muy probablemente facilitará la elaboración de programas de prevención más acorde a las características genéticas de la familia y extrapolarlos de manera más personalizada a diferentes grupos de población genóticamente similares que comparte hábitos de vida semejantes.

2.3. HIPÓTESIS.

Ciertas variantes de genes relacionados con la estructura, función y transducción ciliar de procesos del neurodesarrollo, ya sea en forma aislada o por efecto de la interacción gen-gen, representan factores de riesgo para mielomeningocele en la población en estudio.

2.4. OBJETIVOS.

2.4.1. Objetivo general.

Estudiar la relación de determinadas variantes alélicas en genes candidato relacionados con la estructura, función y transducción ciliar de procesos del neurodesarrollo, como factores de riesgo para mielomeningocele en una muestra de familias nucleares mestizas mexicanas.

2.4.2. Objetivos específicos.

1. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de 16 variantes en 13 genes relacionados con la morfogénesis y función del cilio primario: *BBS1*, *BBS2*, *BBS4*, *C2CD3*, *CC2D2A*, *COBL*, *HNF1B*, *IFT52*, *KIF7*, *MKKS*, *PARD3*, *RPGR1PL1* y *TMEM67*.

2. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de 8 variantes en 7 genes de la vía de señalización Hedgehog cuyos productos proteicos requieren de la transducción de señales a través del cilio primario: *GLI3*, *INTU*, *LRP2*, *PTCH1*, *SHH*, *SMO* y *SUFU*.

3. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de 26 variantes en 20 genes cuyos productos requieren de la transducción de señales a través del cilio primario y que son componentes de la vía de señalización Wnt canónica y no canónica (PCP): *AXINI*, *CDH6*, *FZD6*, *FZD7*, *INVS*, *LRP5*, *LRP6*, *PLCB2* y *PLCB4*; así como *CELSR1*, *CELSR2*, *DVL1*, *DVL2*, *DVL3*, *FUZ*, *FZD1*, *ROCK2*, *VANGL1*, *VANGL2* y *WNT9B*, respectivamente.

4. Identificar factores de riesgo clínico-genéticos.

5. Determinar que variantes génicas, sea en forma individual o en interacción con variantes de otros genes, constituyen asociaciones de riesgo para MMC.

6. Determinar la posible correlación genotipo-fenotipo fundamentada en la localización del MMC como expresión de gravedad variable.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.

Se trata de un estudio colaborativo-multicéntrico, en el que participan 16 Centros de Rehabilitación Infantil Teletón (CRIT) de 16 diferentes estados del país (Figura 10). El estudio es transversal, observacional-analítico, retrospectivo y prolectivo. Es un estudio de asociación genética basado en un diseño combinado de familias así como de casos y controles.



Figura 10. Mapa de México mostrando la ubicación de los diferentes CRIT que participaron en el estudio.

3.2. DISEÑO DE LA MUESTRA.

El proyecto mayor fue aprobado por CONACYT (Sectorial de Salud-2013) con el título “*Identificación de Patrones de Riesgo Genético-Ambiental Asociados al Mielomeningocele en Familias Mexicanas Mestizas*”. Incluye familias reclutadas de 16 diferentes Centros de Rehabilitación Infantil Teletón (CRIT) que tuvieron un hijo o hija con MMC (tríos), así como familias en las cuales el o la paciente presenta parálisis cerebral infantil no asociada a ninguna malformación congénita. A las familias que aceptaron participar en el estudio se les solicitó la firma de consentimiento informado y se les realizó una encuesta clínico-genética (ver formato en apartado de anexos) y a cada integrante de los tríos se les tomó muestra de sangre periférica o saliva. Las muestras biológicas de más de 1,000 casos y sus progenitores, existen en el Departamento de Genética y consisten en un banco de ADN y de paquetes celulares (buffy coats) preservados en RNAlater.

Para el presente estudio se seleccionaron 500 familias nucleares o tríos (paciente con MMC y ambos progenitores), así como 500 controles sin antecedentes de MMC para la comparación de antecedentes clínico-genéticos.

La encuesta de antecedentes clínico-genéticos adaptada para la patología en estudio fue previamente diseñada por miembros del Departamento de Genética (INCMNSZ) para la recolección de datos correspondientes a antecedentes familiares y validada para otras investigaciones en el área de la genética de diferentes tipos de enfermedades. Con esta encuesta se recolectó información de casos y controles y sus respectivas familias de las siguientes variables:

1) Identificación de la persona, datos del paciente (fecha de nacimiento, peso, talla, perímetro cefálico, duración de la gestación en semanas, lugar de nacimiento, lugar donde

transcurrió el embarazo de su madre, momento de la detección del MMC, durante la gestación o al nacimiento).

2) Datos de la madre y del padre: edad, lugar de nacimiento, peso de la madre al inicio del embarazo, peso al final, talla materna (para IMC), edad inicio de la menarca, tipo de parto, gestaciones previas y posteriores al caso o al control, producto de cada una de las mismas, si son todas con el mismo padre del propósito, si los 4 abuelos nacieron en México, control prenatal, patología materna durante el embarazo, ingesta de sustancias medicinales durante el embarazo.

3) Ingesta de ácido fólico y otras vitaminas, en qué momento del embarazo, especificado en cuantas semanas antes y cuantas semanas después de la concepción.

4) Nivel de educación de los progenitores, ocupación y elaboración de genealogía.

La información recogida se codificó e incorporó en la base de datos del proyecto.

Como controles para la comparación de información genética se utilizaron muestras de sangre de 500 recién nacidos vivos, de ambos sexos, no malformados. El ADN de este grupo de controles se obtuvo a partir de gotas de sangre periférica preservadas en papel filtro. Personal especializado en tamiz neonatal realizó la toma de muestra de sangre periférica del talón de recién nacidos vivos de 12 estados de la República Mexicana (Aguascalientes, Baja California Sur, Campeche, Coahuila, Durango, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Quintana Roo y Sinaloa) como parte del “Programa de detección de hipotiroidismo congénito”.

Como parte del proyecto mayor, se diseñó una plataforma de microarreglos Golden Gate para el estudio de 768 variantes, de las cuales 656 fueron sobre genes candidato (391 genes candidato en total) y 112 marcadores de ancestría. Para el presente protocolo en una primera etapa de investigación fueron seleccionados los genes y variantes incluidos en el microarreglo que estuvieran relacionados con la morfogénesis y funcionalidad del cilio primario, así como con la transducción ciliar de vías de señalización asociadas al cierre del tubo neural (42 variantes que comprenden 32 genes). En una segunda etapa se realizó la genotipificación mediante PCR en tiempo real para un grupo de genes y variantes complementarias a la red de interacción en estudio (8 variantes en 8 genes) (Ver sección 3.3.4. Selección de variantes genéticas).

3.2.1. Cálculo del tamaño de muestra.

Se estimó una muestra de 500 tríos completos (caso-madre-padre) de acuerdo al cálculo realizado con el programa QUANTO v.1.2.4, 2009, de libre acceso, para un modelo aditivo de análisis de interacción gen-gen, una frecuencia del alelo menor del 10%, OR de 1.7, intervalo de confianza del 95% y $p < 0.01$, y un grupo de 500 controles.

3.2.2. Criterios de inclusión.

De los casos: 1) Pacientes con MMC confirmado después de los estudios de rutina clínicos y de gabinete por los respectivos especialistas, cuyos progenitores aceptarán voluntariamente

participar después de leer la carta de información y firmar el consentimiento informado; 2) Que los progenitores del paciente y los 4 abuelos hayan nacido en México; 3) Que los progenitores aceptaran se les tome una muestra de sangre periférica (o en su defecto de saliva) a cada uno de ellos y a su hija o hijo con MMC. 4) Que las madres aceptaran responder la encuesta de antecedentes clínico-genéticos.

Del grupo de comparación clínico-genética: 1) Pacientes con parálisis cerebral infantil idiopática y ninguna malformación congénita provenientes de los mismos CRIT que los casos y pareados uno a uno, cuyos progenitores aceptarán voluntariamente participar después de leer la carta de información y de firmar el consentimiento informado; 2) Que las madres acepten responder la encuesta de antecedentes clínico-genéticos.

Del grupo de comparación genética: Recién nacidos vivos, no malformados, pareados por región de nacimiento con los casos, y cuyos progenitores y cuatro abuelos hayan nacido en México.

3.2.3. Criterios de no inclusión.

De los casos: 1) Falta de un diagnóstico confirmado de MMC; 2) Que no fuera posible estudiar a ambos progenitores o alguno se negara a la toma de muestra de sangre o saliva o se nieguen a contestar la encuesta; 3) Que él (la) paciente sea adoptado; 4) Que él (la) paciente presentará MMC como parte de un síndrome o asociado a otras malformaciones que sugieran una posible relación etiológica establecida. *Del grupo de comparación clínico-genética:* 1) Que la madre del paciente con PCI no acepte contestar la encuesta; 2) Que el niño(a) sea adoptado.

Del grupo de comparación genética: Que el ADN obtenido de determinada muestra no cumpliera con los criterios de calidad y cantidad requeridos.

3.2.4. Criterios de eliminación.

Familias que aceptaron participar, que completaron la encuesta y se obtuviera muestra de sangre del paciente, pero los progenitores negarán donar muestra de sangre o saliva. Que el paciente haya sido dado de alta y no se haya completado la aplicación de las encuestas y/o la toma de muestras de sangre o saliva. Que la familia decidiera en cualquier momento del estudio que no se analice la información y muestras biológicas de su hijo(a) y/o de alguno de los progenitores.

3.3. METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE GENOTIPIFICACIÓN.

3.3.1. Toma de muestras biológicas para extracción de ADN.

A los miembros de las familias que aceptaron participar, previo consentimiento informado por escrito, se les tomó una muestra de sangre periférica (6ml) en un vacutainer con EDTA o de saliva la cual se depositó en un tubo con 10ml de enjuague bucal al 10%.

3.3.2. Obtención de células para extracción de ADN.

Se obtuvieron leucocitos a partir de los 6ml de sangre total mediante lisis de eritrocitos con una solución de sucrosa y tritón al 5% en Tris 0.1Mm (TTS). Se realizó un lavado de leucocitos con solución TTS en tubos plásticos de 50ml, centrifugándose la muestra a 3000 rpm durante 15 min, el botón obtenido se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 μ L, en donde se realizaron 2 lavados adicionales con TTS, centrifugándose a 14000 rpm durante 5 min. Se concluyó esta fase realizando 2 lavados con solución PBS 1X, después de lo cual el botón se recuperó en criotubos a los que se agregó RNAlater®(Ambion) y se congelaron a -70°C , constituyendo un biobanco para una posterior extracción de ADN.

El tubo con las células de mucosa oral (muestra de saliva) fue centrifugado durante 5 minutos con 30ml de solución PBS 1x, a 3000 rpm para eliminar el enjuague bucal. A continuación las células fueron recuperadas en criotubos con RNAlater® (Ambion) y congeladas a -70°C para una posterior extracción de ADN.

3.3.3. Extracción de ADN.

La extracción de ácidos nucleicos de las muestras sanguíneas y de saliva se realizó empleando el kit *QIAamp DNA mini* (QIAGEN®) usando el equipo de extracción automatizada QIAcube (QIAGEN®) que cuenta con programas específicos de purificación de acuerdo a la cantidad y tipo de muestra a ser procesada. Brevemente el proceso consiste en: 1) Se utilizó una alícuota de 200 μ L del concentrado celular en el equipo QIAcube, iniciándose el proceso de extracción con la lisis celular; 2) Se coloca la muestra en una columna con resina, se realizan lavados a la resina para eliminar restos de sales y proteínas y por último se eluye el ADN en un tubo limpio.

Una vez obtenido el ADN, se determinó la concentración de cada muestra por medio de espectrofotometría (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) a una longitud de onda de $\lambda=260\text{nm}$, la cuantificación se realizó usando como blanco la solución de elusión AE para las muestras de los controles, y agua para las muestras de las familias nucleares. Se obtuvieron de 5 a 15 microgramos de ADN por muestra, con una pureza por densidad óptica de ~ 2 en el cociente $260\text{nm}/280\text{nm}$ y $260\text{nm}/230\text{nm}$. Posteriormente el ADN se preservó a -70°C hasta su uso.

3.3.4. Selección de variantes génicas.

Los genes candidato y sus variantes genéticas se seleccionaron en base a cumplir con dos o más de los siguientes criterios de inclusión:

- 1) Existe evidencia biológica de que el producto del gen donde se localiza la variante, participa en alguno de los siguientes procesos celulares: morfogénesis del cilio primario, mantenimiento de la funcionalidad ciliar, transducción ciliar de vías de señalización Hedgehog o Wnt canónica o de polaridad celular planar.

- 2) Se ha reportado alguna asociación de riesgo estadísticamente significativa entre la variante del gen candidato con los DTN en general y con el MMC en particular.
- 3) Preferencialmente localizarse en regiones codificantes, o en la región promotora y además ser de sentido erróneo condicionando un cambio de aminoácido en el producto proteico del gen correspondiente o que su localización en regiones intrónicas sugiera una alteración en el proceso de corte y empalme alternativos.
- 4) Tener una frecuencia del alelo menor igual o mayor al 10%, ya sea en población mexicana, o tomando como referencia otras poblaciones (población con ancestría mexicana, población japonesa, población china, población europea) de diversas bases de datos (International HapMap Project: <http://www.hapmap.org/>) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

De acuerdo con los criterios expuestos se incluyeron 50 variantes genéticas que comprenden 40 genes candidato (Tabla 3):

- 16 variantes genéticas en 13 genes relacionados con la morfogénesis y función del cilio primario: *BBS1*, *BBS2*, *BBS4*, *C2CD3*, *CC2D2A*, *COBL*, *HNF1B*, *IFT52*, *KIF7*, *MKKS*, *PARD3*, *RPGR1PL1* y *TMEM67*.
- Ocho variantes genéticas en 7 genes de la vía de señalización Hedgehog: *GLI3*, *INTU*, *LRP2*, *PTCH1*, *SHH*, *SMO* y *SUFU*.
- 14 variantes genéticas en 11 genes que participan en la vía de señalización de polaridad celular planar (Wnt no canónica): *CELSR1*, *CELSR2*, *DVL1*, *DVL2*, *DVL3*, *FUZ*, *FZD1*, *ROCK2*, *VANGL1*, *VANGL2* y *WNT9B*
- 12 variantes genéticas de 9 genes que participan en la vía de señalización Wnt canónica: *AXINI*, *CDH6*, *FZD6*, *FZD7*, *INVS*, *LRP5*, *LRP6*, *PLCB2* y *PLCB4*.

Tabla 3. Detalle de las variantes seleccionadas en los genes candidatos.

Categoría	Gen	Cr	rs	Alelos [†]	Cambio alélico	Cambio residuo	Clasificación funcional
Morfogénesis / funcionamiento o ciliar	<i>BBS1</i>	11	rs2298806 (*)	G/A	CTG-CTA	Leu-Leu	Sinónima
	<i>BBS2</i>	16	rs11373 (*)	A/G	ATT-GTT	Ile-Val	Sentido erróneo; ncRNA
	<i>BBS4</i>	15	rs2277598	A/G	ATA-ACA	Ile-Thr	Sentido erróneo; ncRNA
	<i>C2CD3</i>	11	rs11235995	C/T	CGA-CAA	Arg-Gln	Sentido erróneo; ncRNA
	<i>C2CD3</i>	11	rs826058	G/A	CGG-CAG	Arg-Gln	Sentido erróneo; ncRNA
	<i>CC2D2A</i>	4	rs16892095	A/C	GAG-GCG	Glu-Ala	Sentido erróneo; ncRNA
	<i>COBL</i>	7	rs2240089	C/G	CAC-CAG	His-Gln	Sentido erróneo
	<i>COBL</i>	7	rs10230120	G/T	GAC-GCC	Asp-Ala	Sentido erróneo
	<i>HNF1B</i>	17	rs2689	T/A	NA	NA	3'UTR
	<i>IFT52</i>	20	rs2664519	A/G	GTG-GTA	Val-Val	Sinónima; 5'UTR
	<i>KIF7</i>	15	rs12900805	C/T	GGG-AGG	Gly-Arg	Sentido erróneo
	<i>MKKS</i>	20	rs17852625 (*)	G/A	ATC-ATT	Ile-Ile	Sinónima
	<i>PARD3</i>	10	rs12782862	G/A	NA	NA	Intrónica
	<i>PARD3</i>	10	rs3851068	C/T	NA	NA	Intrónica
	<i>RPGRIP1L</i>	16	rs1946155	C/T	NA	NA	3'UTR
<i>TMEM67</i>	8	rs3134031	G/A	ATT-GTT	Ile-Val	Sentido erróneo; ncRNA	
Vía de señalización Hedgehog	<i>GLI3</i>	7	rs846266	G/A	ACT-GCT	Thr-Ala	Sentido erróneo
	<i>INTU</i>	4	rs3749507 (*)	C/T	CGA-CGG	Arg-Arg	Sinónima; ncRNA
	<i>LRP2</i>	2	rs4667591	G/T	ATC-CTC	Ile-Leu	Sentido erróneo
	<i>LRP2</i>	2	rs830994	A/G	GTC-GTT	Val-Val	Sinónima
	<i>PTCH1</i>	9	rs2236405 (*)	T/A	ACA-TCA	Thr-Ser	Sentido erróneo
	<i>SHH</i>	7	rs1233556	C/T	NA	NA	Intrónica
	<i>SMO</i>	7	rs2228617 (*)	C/G	GGG-GGC	Gly-Gly	Sinónima
<i>SUFU</i>	10	rs17114803 (*)	T/C	ATT-ATC	Ile-Ile	Sinónima	
Vía de señalización PCP	<i>CELSR1</i>	22	rs4044210	T/C	ATC-GTC	Ile-Val	Sentido erróneo
	<i>CELSR2</i>	1	rs653635	A/G	TAC-CAC	Tyr-His	Sentido erróneo
	<i>DVL1</i>	1	rs61735963 (*)	C/T	GCC-ACC	Ala-Thr	Sentido erróneo
	<i>DVL2</i>	17	rs2074222	G/A	NA	NA	Intrónica
	<i>DVL2</i>	17	rs2074216	G/A	TCC-TCT	Ser-Ser	Sinónima; ncRNA
	<i>DVL3</i>	3	rs11919795	A/G	NA	NA	3'UTR
	<i>FUZ</i>	19	rs2305918	T/A	NA	NA	5'UTR
	<i>FZD1</i>	7	rs1052015	A/C	NA	NA	3'UTR
	<i>ROCK2</i>	2	rs978906	A/G	NA	NA	3'UTR
	<i>VANGL1</i>	1	rs41310108	C/T	NA	NA	3'UTR
	<i>VANGL1</i>	1	rs41299565	C/T	NA	NA	3'UTR
	<i>VANGL2</i>	1	rs17380127	A/C	GGA-GGC	Gly-Gly	Sinónima
<i>VANGL2</i>	1	rs12086448	G/A	AAA-AAG	Lys-Lys	Sinónima	
<i>WNT9B</i>	17	rs4968281	C/T	ATG-ACG	Met-Thr	Sentido erróneo	
Vía de señalización Wnt	<i>AXINI</i>	16	rs1805105	C/T	GAT-GAC	Asp-Asp	Sinónima; ncRNA
	<i>CDH6</i>	5	rs2229575	T/C	CAT-CAC	His-His	Sinónima; ncRNA
	<i>CDH6</i>	5	rs2287582	G/A	GAC-GAT	Asp-Asp	Sinónima; ncRNA
	<i>FZD6</i>	8	rs1053917	G/A	CCG-CCA	Pro-Pro	Sinónima; ncRNA
	<i>FZD6</i>	8	rs3808553	T/G	ATG-CTG	Met-Leu	Sentido erróneo; nctv
	<i>FZD7</i>	2	rs13034579	G/T	NA	NA	3'UTR
	<i>INVS</i>	9	rs7024375	T/G	NA	NA	5'UTR; ncRNA
	<i>LRP5</i>	11	rs3736228	C/T	GCG-GTG	Ala-Val	Sentido erróneo; ncRNA
	<i>LRP5</i>	11	rs556442	A/G	GTG-GTA	Val-Val	Sinónima; ncRNA
	<i>LRP6</i>	12	rs7978064	A/G	TGT-TGC	Cys-Cys	Sinónima; ncRNA
	<i>PLCB2</i>	15	rs2229691	T/C	ACT-ACC	Thr-Thr	Sinónima; ncRNA
<i>PLCB4</i>	20	rs6077510	A/G	GCA-ACA	Ala-Thr	Sentido erróneo	

(†) El segundo alelo corresponde al alelo menor. (*) Variantes analizadas por PCR tiempo real. ncRNA: ácido ribonucleico no codificante. nctv: variante de transcrito no codificante. NA: no aplica. Información acorde a GRCh38.p7

3.3.5. Proceso de genotipificación mediante microarreglo.

Como parte del proyecto mayor del que deriva el presente trabajo de investigación, se diseñó un microarreglo que incluyó 656 variantes génicas en 395 genes candidato, así como 112 marcadores informativos de ancestría recomendados para la población mestiza mexicana.¹³⁷

La genotipificación de las 1500 muestras de ADN de los 500 tríos así como de los 500 controles se realizó empleando la plataforma de microarreglos GoldenGate de Illumina (San Diego, CA USA). Para ello se utilizó aproximadamente 1.5 µg de ADN a una concentración de 50ng/µL en 30µL de agua libre de DNAsas y RNAsas, las cuales se depositaron en placas de 96 pozos.

Las muestras se genotipificaron en la Unidad de Genotipificación de Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) donde previo al proceso de las mismas se verificó la concentración, pureza e integridad del ADN. El formato del microarreglo mencionado permite el análisis de 32 muestras de ADN por chip. Los resultados del procesamiento de las muestras se leyeron con el escáner BeadArray. Con el uso del software GeneCall y GenomeStudio v.2011.1 se obtuvieron los resultados finales de la genotipificación.

3.3.6. Discriminación alélica por PCR en tiempo real con el uso de sondas Taqman

Los ensayos de genotipificación de las 8 variantes en los 8 genes complementarios a los seleccionados del microarreglo, se realizaron mediante discriminación alélica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real con uso de sondas Taqman® disponibles comercialmente (Tabla 4) y siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante (*Applied Biosystems*, Foster city, CA, USA).

Para este procedimiento las 2000 muestras de ADN, 1500 correspondientes a 500 familias nucleares (tríos de caso, padre y madre) además de 500 correspondientes a controles, fueron distribuidas en placas de 96 pozos: 92 muestras y 4 controles de genotipificación por placa. En cada pozo se colocaron 10-25 ng de ADN por reacción, cantidad definida para cada una de las 8 sondas previo proceso de estandarización (Imagen suplementaria 1). Preparadas las placas se permitió el secado del ADN mediante evaporación para después cubrir y sellar con adhesivo óptico y almacenar hasta su posterior utilización en el proceso PCR en tiempo real, para el que se añadieron 5ul por reacción de Master Mix (16,000 reacciones en total para las 8 sondas en las 2,000 muestras). Las placas fueron corridas en el Sistema StepOne™ Real Time PCR (Applied Biosystems). Las condiciones de los ciclos incluyeron una desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos a 92°C por 15 segundos y a 60°C por 1 minuto (992/1178). Los datos obtenidos fueron analizados con el Software TaqMan® Genotyper™.

Tabla 4. Detalle de los primers utilizados para genotipificación por PCR en tiempo real.

Gen	Rs	Primer ID*	Secuencia y fluorescencia de la sonda Taqman (VIC/FAM)
<i>BBS1</i>	rs2298806	C__16190768_20	TCAGACCCTACTTCAAGTTCAGCCT(A/G) CCCCAATTGCCTCCAATCCTCTGG
<i>BBS2</i>	rs11373	C__11718236_10	ATGTCTCCAATGTCCCCAGCACAA(C/T) TGCATTTGCCCCATCTGCTACCTAA
<i>MKKS</i>	rs17852625	C__25623408_20	GAATTGTAAGCAAAAAGGCTCTCAG(A/G) ATCAAAGCACTGACATGCTCTGTTT
<i>INTU</i>	rs3749507	C__1617938_1_	AGACAGGAGTCATTGTCCAACAGCG(A/G) TACAAAGATGTGAATGTTTATGTAA
<i>PTCH1</i>	rs2236405	C__15954310_10	CTGGGGGGTGGCTCAGGGGAGGGTG(A/T) GGGCAGGCGTTCAAGCCGTTGGCT
<i>SMO</i>	rs2228617	C__3208161_10	AGGTGGATGGGGACTCTGTGAGTGG(C/G) ATTTGTTTTGTGGGCTACAAGAACT
<i>SUFU</i>	rs17114803	C__25749597_10	AAGCCTGCCTTGTGCCTTCACAGAT(C/T) CTGTTGACCGAAGAGTTTGTAGAGA
<i>DVLI</i>	rs61735963	C__64625331_10	CCCCTTGGGTGCCATTGGTCCGGG(C/T) GGCTGTGGGGCAGCAGGTTGGGAA

* Sondas Taqman ® de Applied Biosystems.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

3.4.1. Análisis general.

Para el análisis de epidemiología descriptiva se utilizó el cálculo de proporciones, promedios y desvío estándar, estratificación por percentilas, cuartilas y porcentajes.

Para la estimación de diferencias se utilizaron pruebas de estadística inferencial aceptándose como estadísticamente significativo un valor de $P \leq 0.01$ e intervalos de confianza (IC) al 95%.

Para variables con distribución normal se utilizaron las pruebas de “*t*” de Student o ANOVA. Para variables no paramétricas se utilizó la prueba *U* de Mann-Whitney. Para variables categóricas se utilizaron pruebas de χ^2 o exacta de Fisher.

Para cada grupo estudiado (casos, madres, padres, controles) se calcularon frecuencias alélicas y genotípicas. En el grupo de controles se realizó la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg. Se utilizó el software STATA/SE 12.1.

3.4.2. Análisis de casos y controles

Se analizaron diferencias en las frecuencias alélicas de las variantes génicas mediante la prueba de χ^2 de Pearson y se estimaron razones de momios e IC al 95%. Para estudiar las posibles diferencias por ancestría entre casos y controles, se realizó un análisis de componentes principales con un panel de 112 marcadores informativos de ancestría que permitió discriminar los componentes nativo americano, europeo y africano. Éste análisis se realizó con el programa EIGENSTRAT¹³⁸.

El análisis de interacción gen-gen se realizó entre dos *loci* mediante el método de regresión logística múltiple con el programa Plink¹³⁹ v1.07.

3.4.3. Análisis de tríos

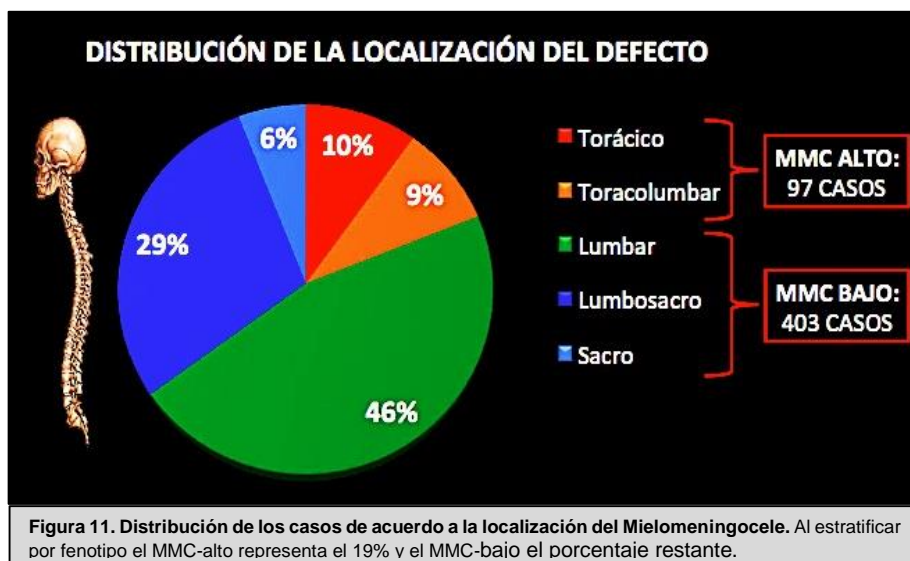
Para el estudio de familias nucleares (tríos) se utilizó la prueba de desequilibrio de transmisión alélica (TDT)¹⁴⁰ para evaluar la transmisión preferencial de alelos de riesgo con el programa STATA/SE v.12. Al analizar la variación genotípica en los tríos (caso, padre y madre) mediante este método se compara la distribución de genotipos observada en los casos para la esperada de acuerdo a los genotipos de los progenitores para una característica bialélica con modo de herencia mendeliano clásico, bajo la hipótesis nula de “no ligamiento y no asociación” o “no asociación en presencia de ligamiento”.¹⁴¹ Considerando como resultados significativos aquellas variantes génicas que muestren apartarse del 50% de transmisión esperada para cada alelo.

3.4.4. Correlación genotipo-fenotipo.

La muestra se estratificó en dos fenotipos de acuerdo a la localización del mielomeningocele: MMC-alto, para aquellos casos con defectos localizados en región torácica ó toracolumbar, y MMC-bajo, agrupando a los defectos localizados en el nivel lumbar, lumbosacro y sacro. Estratificada la muestra se realizaron las pruebas de asociación, TDT e interacción gen-gen.

4. RESULTADOS.

En la figura 10 se muestra la distribución de la localización del mielomeningocele en donde se puede observar que los defectos bajos sin afección de vértebras torácicas conforman el 81% de la muestra (403 casos), y los defectos altos representados por el mielomeningocele torácico y toracolumbar corresponden al 19% (97 casos) del total de la muestra.



En la tabla 5 se muestran los resultados del análisis de las 56 variables clínicas incluidas en la encuesta clínico-genética, en la que puede observarse que el índice de masa corporal (IMC) materno, el antecedente materno de ciclos menstruales irregulares así como el de cesáreas previas, y la hidrocefalia mostraron diferencias estadísticas significativas. Existe un número

significativamente mayor de madres de casos con sobrepeso y obesidad grados 1 y 2 que las madres control, con un riesgo 48% aumentado de tener un hijo(a) con MMC. El antecedente de irregularidades menstruales mostró un riesgo aumentado del 89% para MMC. El parto por cesárea y la hidrocefalia, ambas consecuencia lógica dependiente de la malformación, mostraron diferencias estadísticas significativas al comparar con controles. El resto de variables clínico-genéticas, incluidos el antecedente de suplementación con ácido fólico sea periconcepcional o durante la gestación, no mostraron diferencias estadísticamente significativas al comparar entre casos y controles.

Tabla 5. Resultados del análisis de factores de riesgo clínicos.

Variable	Casos	Controles	Resultados
Suplementación con AF	0.77	0.81	p=0.14
Ácido fólico periconcepcional	0.36	0.35	p=0.89
IMC periconcepcional	IMC >25: $\chi^2=7.37$, p=0.006, OR 1.48, IC 95% 1.10-1.99		
Ciclos menstruales irregulares	0.63	0.37	p=0.0001, OR 1.89, IC95 1.37-2.61
Cesáreas previas	0.71	0.60	$\chi^2(3)=8.21$, p=0.04 (*) RL p=0.005, OR 1.36, IC95 1.09-1.69 (**)
Hidrocefalia	0.44	0.01	p<0.001, OR=1.36, IC 95% 1.09-1.69

(*): Antecedente de cesáreas previas (hasta 4). (**): Valores correspondientes a análisis de regresión lineal.

En un análisis preliminar de las ocho variantes a genotipificar mediante PCR-TR, realizado en 110 tríos y 110 controles con el objetivo de conocer las frecuencias alélicas y genotípicas en nuestra muestra, dos mostraron frecuencias alélicas menores al 0.05 tanto en el grupo de controles como en el de casos. Por lo que, dada su muy baja frecuencia alélica en nuestra población, se excluyeron del estudio las variantes en los genes *PTCH1* y *DVLI* (Tabla 6).

Tabla 6. Frecuencias alélicas y genotípicas de dos variantes con frecuencia del alelo menor <0.05.

Genotipos Alelos	Casos		Controles		Valor p EHW	
	n	Proporción	n	Proporción	Casos	Controles
<i>PTCH1</i> A/T, rs2236405						
AA	0	0.00	0	0.00	NA	0.88
AT	0	0.00	3	0.03		
TT	108	1.00	101	0.97		
Frecuencia A	0	0.00	3	0.01		
Frecuencia T	216	1.00	205	0.99		
<i>DVLI</i> C/T, rs61735963						
CC	109	1.00	103	0.98	NA	0.92
CT	0	0.00	2	0.02		
TT	0	0.00	0	0.00		
Frecuencia C	218	1.00	208	0.99		
Frecuencia T	0	0.00	2	0.01		

Nota: EHW, Equilibrio Hardy-Weinberg; NA, no aplica por frecuencia nula para uno de los alelos.

Las frecuencias alélicas de las 48 variantes génicas y los resultados de la prueba de Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) se presentan en la tabla 7. Sólo tres VG (*CDH6*-rs2229575, *LRP5*-rs556442 y *SUFU*-rs17114803) mostraron un valor de $p < 0.01$ y por lo tanto se excluyeron de subsecuentes análisis estadísticos dado que los resultados obtenidos fueron considerados errores técnicos de genotipificación ya que todos los grupos del estudio casos, controles y progenitores, no se encontraban en EHW.

Tabla 7. Frecuencias del alelo menor en 500 casos y 500 controles para 48 variantes.

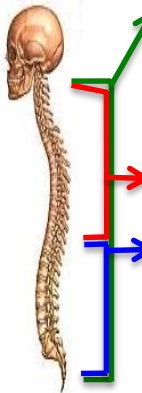
Categoría funcional	Gen	Rs	AM	MAF casos	MAF controles	Valor de p EHW	Observado (HET)	Esperado (HET)
Morfogénesis / funciones ciliares	<i>BBS1</i>	rs2298806	A	0.13	0.11	0.3654	0.19	0.20
	<i>BBS2</i>	rs11373	C	0.35	0.30	0.5827	0.43	0.42
	<i>BBS4</i>	rs2277598	G	0.48	0.46	0.2399	0.47	0.50
	<i>C2CD3</i>	rs11235995	A	0.12	0.13	0.3291	0.22	0.23
	<i>C2CD3</i>	rs826058	A	0.40	0.40	0.5149	0.50	0.48
	<i>CC2D2A</i>	rs16892095	C	0.30	0.33	0.5430	0.43	0.44
	<i>COBL</i>	rs2240089	C	0.15	0.16	0.8690	0.28	0.27
	<i>COBL</i>	rs10230120	A	0.03	0.06	0.7111	0.12	0.12
	<i>HNF1B</i>	rs2689	T	0.35	0.37	0.1814	0.50	0.47
	<i>IFT52</i>	rs2664519	G	0.23	0.27	0.3047	0.41	0.39
	<i>KIF7</i>	rs12900805	A	0.40	0.41	0.9266	0.48	0.49
	<i>MKKS</i>	rs17852625	A	0.09	0.09	0.7873	0.18	0.17
	<i>PARD3</i>	rs3851068	A	0.38	0.42	1.0000	0.49	0.49
	<i>PARD3</i>	rs12782862	A	0.38	0.42	0.3574	0.47	0.49
	<i>RPGRIPI1</i>	rs1946155	A	0.18	0.18	1.0000	0.30	0.30
<i>TMEM67</i>	rs3134031	G	0.10	0.09	0.0136	0.13	0.16	
Vía señalización Hh	<i>GLI3</i>	rs846266	G	0.29	0.31	0.0280	0.38	0.43
	<i>INTU</i>	rs3749507	A	0.43	0.43	0.3578	0.47	0.49
	<i>LRP2</i>	rs4667591	A	0.22	0.23	0.4547	0.37	0.36
	<i>LRP2</i>	rs830994	A	0.44	0.47	0.1508	0.47	0.50
	<i>SHH</i>	rs1233556	A	0.11	0.09	0.4092	0.17	0.16
	<i>SMO</i>	rs2228617	G	0.31	0.32	1.0000	0.43	0.43
<i>SUFU</i>	rs17114803	C	0.35	0.28	0.0079	0.35	0.40	
Vía señalización PCP	<i>CELSR1</i>	rs4044210	G	0.08	0.07	1.0000	0.14	0.13
	<i>CELSR2</i>	rs653635	G	0.04	0.06	0.0671	0.10	0.11
	<i>DVL2</i>	rs2074216	A	0.18	0.12	0.2966	0.21	0.22
	<i>DVL2</i>	rs2074222	G	0.49	0.45	0.4164	0.48	0.50
	<i>DVL3</i>	rs11919795	G	0.11	0.12	0.5206	0.22	0.21
	<i>FUZ</i>	rs2305918	T	0.28	0.27	0.7318	0.39	0.39
	<i>FZD1</i>	rs1052015	C	0.16	0.16	0.0605	0.24	0.26
	<i>ROCK2</i>	rs978906	A	0.41	0.44	0.5858	0.51	0.49
	<i>VANGL1</i>	rs41310108	A	0.15	0.15	0.0369	0.23	0.26
	<i>VANGL1</i>	rs41299565	A	0.15	0.15	0.0343	0.23	0.26
	<i>VANGL2</i>	rs12086448	G	0.34	0.40	0.9257	0.48	0.48
<i>VANGL2</i>	rs17380127	C	0.18	0.20	1.0000	0.32	0.32	
<i>WNT9B</i>	rs4968281	A	0.42	0.43	0.5240	0.48	0.49	
Vía señalización Wnt	<i>AXINI</i>	rs1805105	G	0.41	0.39	0.2589	0.45	0.47
	<i>CDH6</i>	rs2287582	G	0.51	0.47	0.8574	0.49	0.50
	<i>CDH6</i>	rs2229575	G	0.33	0.44	0.0005	0.57	0.49
	<i>FZD6</i>	rs1053917	G	0.36	0.37	0.2475	0.49	0.47
	<i>FZD6</i>	rs3808553	A	0.37	0.36	0.2087	0.49	0.46
	<i>FZD7</i>	rs13034579	A	0.25	0.27	0.5659	0.38	0.39

<i>INVS</i>	rs7024375	A	0.52	0.48	0.2097	0.47	0.50
<i>LRP5</i>	rs3736228	A	0.21	0.20	0.3260	0.30	0.32
<i>LRP5</i>	rs556442	A	0.36	0.30	0.0021	0.36	0.42
<i>LRP6</i>	rs7978064	G	0.15	0.14	0.8550	0.25	0.25
<i>PLCB2</i>	rs2229691	A	0.36	0.30	0.9158	0.42	0.42
<i>PLCB4</i>	rs6077510	G	0.39	0.45	0.6510	0.48	0.50

Nota: AM, alelo menor; MAF, frecuencia del alelo menor. EHW, equilibrio de Hardy-Weinberg en controles; Observado HET, heterocigosidad observada en controles. Esperado HET, Heterocigosidad esperada en controles.

Para los 37 genes y sus 45 variantes que continuaron en el estudio se obtuvieron las frecuencias alélicas, y al comparar entre casos y controles (Tabla 8) se encontraron diferencias estadísticas significativas (DES) para 5 variantes génicas (*COBL*-rs10230120, *DVL2*-rs2074216, *INVS*-rs7024375, *PLCB4*-rs6077510, y *VANGL2*-rs12086448), y que al estratificar por fenotipo difieren entre el MMC-bajo con cuatro variantes génicas, y el MMC-alto con 1 variante génica (*VANGL2*-rs12086448).

Tabla 8. Resultados del análisis de asociación de frecuencias alélicas para el MMC-total y por subfenotipo.

Fenotipo	Gen	Rs	AM	MAF casos	MAF controles	Valor de p^*	OR	IC 95%	
	MMC total (n = 500)								
	<i>COBL</i>	rs10230120	A	0.03	0.06	0.0025	0.52	0.33-0.82	
	<i>DVL2</i>	rs2074216	A	0.18	0.12	0.0004	1.56	1.21-2.02	
	<i>PLCB4</i>	rs6077510	G	0.39	0.45	0.0051	0.78	0.65-0.93	
	<i>VANGL2</i>	rs12086448	G	0.34	0.40	0.0032	0.76	0.63-0.92	
	MMC-alto (n = 97)								
<i>VANGL2</i>	rs12086448	G	0.35	0.50	0.0029	0.54	0.35-0.83		
MMC-bajo (n = 403)									
<i>COBL</i>	rs10230120	A	0.03	0.07	0.0003	0.41	0.24-0.69		
<i>DVL2</i>	rs2074216	A	0.18	0.12	0.0010	1.60	1.20-2.15		
<i>INVS</i>	rs7024375	A	0.54	0.47	0.0028	1.35	1.10-1.65		
<i>PLCB4</i>	rs6077510	G	0.38	0.46	0.0012	0.72	0.59-0.88		

Nota: IC 95%, intervalos de confianza superior e inferior al 95%; AM, alelo menor; MAF, frecuencia del alelo menor. * Sólo se muestran los valores de $p < 0.01$

La variante del gen *VANGL2* muestra diferencias significativas entre casos y controles para el MMC en general ($p=0.0032$) y al estratificar por fenotipos muestra una mayor significancia para el MMC-alto ($p=0.0029$) y no para el MMC-bajo ($p>0.01$). Una sola variante génica mostró diferencias significativas exclusivas para el grupo del MMC-bajo, y es la correspondiente al gen *INVS*. Se observa que cuatro variantes génicas (*COBL*-A, *SUFU*, *DVL2* y *PLCB4*) muestran resultados significativos tanto en el MMC total como en el MMC-bajo, lo cual podría ser por efecto del tamaño de muestra mayor en el MMC-bajo (403 casos) respecto al MMC-alto (97 casos).

Las mismas variantes del análisis de frecuencias alélicas con resultados estadísticos significativos o con tendencia a la significancia se incluyeron en el análisis de frecuencias genotípicas tanto para el total de la muestra (Tabla 9) como para los fenotipos MMC-alto y MMC-bajo (Tabla 10).

Tabla 9. Resultados del análisis de asociación de frecuencias genotípicas entre casos y controles para el MMC-total.

Gen	Rs	A1	A2	Modelo	Casos	Controles	GL	Valor p	OR	IC 95%
COBL	rs10230120	A	C	Tendencia	34/964	63/935	1	0.0024	0.52	0.33-0.82
				Tendencia	179/817	122/870	1	0.0006	1.56	1.21-2.02
DVL2	rs2074216	A	G	Dominante	160/338	112/384	1	0.0007	1.62	1.21-2.17
				Genotípico	19/141/338	10/102/384	2	0.0025	-	
PLCB4	rs6077510	G	A	Tendencia	391/607	451/543	1	0.0061	0.77	0.65-0.93
				Dominante	308/191	346/151	1	0.0087	0.70	0.54-0.92
SUFU	rs17114803	C	T	Dominante	273/198	175/210	1	0.0003	1.65	1.25-2.19
				Genotípico	56/217/198	41/134/210	2	0.0010	-	
				Tendencia	329/613	216/554	1	0.0031	1.38	1.11-1.70
VANGL2	rs12086448	G	A	Recesivo	50/450	79/419	1	0.0058	0.59	0.40-0.87
				Genotípico	50/237/213	79/241/178	2	0.0079	-	

Nota: A1, alelo 1 corresponde al alelo menor; A2, alelo 2 corresponde a silvestre; Modelo genético que mostró diferencias estadísticas significativas; GL, grados de libertad; IC95%, límites superior e inferior para intervalos de confianza al 95%.

Se pueden observar diferentes modelos genéticos con resultados significativos al comparar las frecuencias genotípicas entre casos y controles (Tablas 9 y 10), de los diferentes genes en estudio, tanto para el MMC-total como para el MMC-alto y el MMC-bajo, muy probablemente debido por un lado al número de genotipos disponibles para ciertas variantes con MAF y heterocigosidad reducidas, y por otro dado el posible efecto de la variante (dominante, recesivo).


Tabla 10. Resultados del análisis de asociación de frecuencias genotípicas entre casos y controles para los subfenotipos MMC-alto y MMC-bajo.

Gen	Rs	A1	A2	Modelo*	Casos	Controles	GL	Valor p	OR	IC 95%
MMC-alto (n = 97)										
VANGL2	rs12086448	G	A	Tendencia	68/126	97/97	1	0.0018	0.54	0.35-0.83
				Genotípico	9/50/38	22/53/22	2	0.0074	-	
MMC-bajo (n = 403)										
COBL	rs10230120	A	C	Tendencia	23/781	54/752	1	0.0003	0.41	0.24-0.69
				Tendencia	141/661	94/706	1	0.0013	1.60	1.20-2.15
DVL2	rs2074216	A	G	Dominante	125/276	87/313	1	0.0025	1.63	1.17-2.27
				Genotípico	16/109/276	7/80/313	2	0.0058	-	
INVS	rs7024375	A	C	Tendencia	369/437	429/377	1	0.0036	0.74	0.61-0.91
				Recesivo	86/317	122/281	1	0.0038	0.62	0.45-0.87
				Genotípico	86/197/120	122/185/96	2	0.0097	-	
PLCB4	rs6077510	G	A	Dominante	237/165	280/121	1	0.0013	0.62	0.46 0.84
				Tendencia	304/500	367/435	1	0.0018	0.72	0.59 0.88
SUFU	rs17114803	C	T	Genotípico	67/170/165	87/193/121	2	0.0045	-	
				Dominante	226/152	136/176	1	2.23 ⁻⁰⁵	1.92	1.40-2.64
				Tendencia	43/183/152	30/106/176	2	9.89 ⁻⁰⁵	-	
				Tendencia	269/487	166/458	1	0.0004	1.52	1.20-1.94

Nota: A1, alelo 1 corresponde al alelo menor; A2, alelo 2 corresponde a silvestre; Modelo genético que mostró diferencias estadísticas significativas; GL, grados de libertad; IC95%, límites superior e inferior para intervalos de confianza al 95%.

En la tabla 11 se muestran los resultados del análisis de desequilibrio de transmisión (TDT) para las familias nucleares, y que mostraron apartarse de manera significativa del 50% de transmisión esperada para cada alelo, silvestre o variante, de acuerdo a un sistema bialélico. Para el MMC-total (500 tríos) se observó transmisión preferencial para 5 variantes génicas (*BBS2*, *CDH6*-rs2229575, *IFT52*, *LRP5*-rs3736228 y *LRP5*-rs556442). De manera interesante al estratificar por fenotipo ninguna de las 5 variantes génicas que mostraron diferencias estadísticas significativas para el MMC-bajo se repiten en el MMC-alto, sugiriendo una posible correlación genotipo-fenotipo.

Tabla 11. Resultados de análisis del desequilibrio de transmisión (TDT) en general y estratificado por fenotipos



Fenotipo	Gen	Rs	A1	A2	T	U	OR	IC 95%	Valor <i>p</i>
MMC-total (<i>n</i> = 500)									
	<i>BBS2</i>	rs11373	C	T	232	181	1.28	1.05-1.56	0.0121
	<i>LRP5</i>	rs3736228	A	G	179	139	1.29	1.03-1.61	0.0249
MMC-alto (<i>n</i> = 97)									
	<i>C2CD3</i>	rs826058	A	G	58	32	1.81	1.18-2.79	0.0061
MMC-bajo (<i>n</i> = 403)									
	<i>LRP5</i>	rs3736228	A	G	146	101	1.45	1.12-1.86	0.0042
	<i>BBS2</i>	rs11373	C	T	189	140	1.35	1.09-1.68	0.0069

Nota: A1, alelo 1 corresponde al alelo de menor frecuencia; A2, alelo 2 corresponde al silvestre; T, alelos transmitidos; U, alelos no transmitidos; IC95% límites superior e inferior para intervalos de confianza al 95%.

En la tabla 12 se presentan los resultados del análisis de interacción gen-gen (IGG) con el detalle de los genes que participan en la interacción, la variante de cada uno de ellos, así como los ORs e intervalos de confianza. Identificamos 22 diferentes interacciones génicas con un valor de $p < 0.01$, nueve para el MMC-total, 6 IGG exclusivas para el MMC-alto y 7 IGG exclusivas para el MMC-bajo. De igual manera se puede observar el fenómeno previamente encontrado tanto para el análisis de asociación como para el de TDT, siendo que las 6 IGG con diferencias estadísticas significativas para el MMC-alto son diferentes de las 10 IGG que se encuentran para el MMC-bajo, sugiriendo una posible correlación genotipo-fenotipo.

Finalmente la inclusión de un panel validado para población mexicana⁽¹¹⁾ de 112 marcadores informativos de ancestría, como parte del microarreglo, permitió realizar el análisis de componentes principales para distinguir la variación genética a lo largo de tres ejes: el componente nativo americano, europeo y africano, en los 500 casos y 500 controles en quienes no se observaron diferencias sistemáticas por ancestría descartándose de esta manera posibles sesgos por estratificación de la muestra (Figura 12).

Tabla 12. Interacciones gen-gen estadísticamente significativas en el MMC-total y por subfenotipos MMC-alto y MMC-bajo.

Gen	Rs	Vía de señalización	Gen	Rs	Vía de señalización	OR	Valor de p
MMC-total (n = 500)							
<i>LRP2</i>	rs4667591	Hh	<i>INTU</i>	rs3749507	Hh	1.58	0.0028
<i>LRP2</i>	rs830994	Hh	<i>BBS1</i>	rs2298806	Cilio	1.82	0.0032
<i>COBL</i>	rs10230120	Cilio	<i>FUZ</i>	rs2305918	PCP	3.47	0.0048
<i>COBL</i>	rs10230120	Cilio	<i>MKKS</i>	rs17852625	Cilio	5.18	0.0099
MMC-alto (n = 97)							
<i>PARD3</i>	rs12782862	Cilio	<i>PLCB4</i>	rs6077510	Wnt	2.54	0.0038
MMC-bajo (n = 403)							
<i>LRP5</i>	rs3736228	Wnt	<i>IFT52</i>	rs2664519	Cilio	1.77	0.0065
<i>CELSR2</i>	rs653635	PCP	<i>COBL</i>	rs2240089	Cilio	3.17	0.0081
<i>HNF1B</i>	rs2689	Cilio	<i>IFT52</i>	rs2664519	Cilio	1.62	0.0088
<i>CELSR2</i>	rs653635	PCP	<i>PLCB2</i>	rs2229691	Wnt	3.09	0.0097

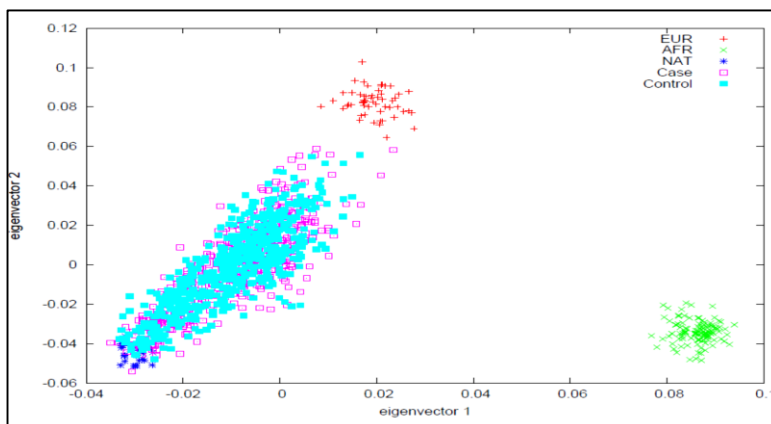


Figura 12. Gráfico del análisis de componentes principales de los marcadores informativos de ascendencia. Marcadores de origen nativo *; de origen europeo +; de origen africano x.

A manera de síntesis, en la tabla 13 se muestran en conjunto los resultados estadísticamente significativos obtenidos con los diferentes análisis genéticos realizados, categorizados por MMC-total, así como por fenotipos en MMC-alto y MMC-bajo, resaltando la vía de señalización o función ciliar en la que participa cada gen al que pertenece cada variante génica asociada. En el MMC-total, observamos diferencias estadísticamente significativas para 8 variantes génicas en el análisis de asociación, para 5 variantes génicas en el análisis de desequilibrio de transmisión alélica, y para 9 pares de genes en el análisis de interacción gen-gen; resaltando en general un enriquecimiento de genes de la vía de señalización Wnt. La vía de señalización con menor representación en los resultados significativos para cualquier modalidad de análisis estadístico realizado, corresponde a la de Hedgehog.

Tabla 13. Síntesis de las variantes genéticas asociadas al MMC.

FENOTIPO	Análisis	No. VG	GENES*			
			Ciliares	Hh	PCP	Wnt
	MMC total					
	Asociación	8	<i>COBL-20</i>	<i>SUFU</i>	<i>DVL2</i> , <i>VANGL2-48</i> ,	<i>CDH6-75</i> , <i>LRP5-42</i> , <i>PLCB4</i>
	TDT	5	<i>BBS2</i> , <i>IFT52</i>			<i>CDH6-75</i> , <i>LRP5-28</i> , <i>LRP5-42</i>
	IGG**	9	<i>LRP2-91 + BBS2</i> , <i>LRP2-91 + INTU</i> , <i>LRP2-94 + BBS1</i> , <i>LRP2-91 + VANGL2-48</i> , <i>LRP5-42 + WNT9B</i> , <i>COBL-20 + FUZ</i> <i>DVL3 + VANGL2-48</i> , <i>DVL3 + C2CD3-95</i> , <i>COBL-20 + MKKS</i>			
	MMC alto					
	Asociación	2			<i>VANGL2-48</i>	<i>CDH6-75</i> , <i>PLCB2</i>
	TDT	2	<i>C2CD3-58</i>			
	IGG**	6	<i>CDH6-75 + FUZ</i> , <i>CDH6-82 + FUZ</i> , <i>CDH6-82 + LRP2-94</i> , <i>PLCB4 + PARD3</i> , <i>PLCB4 + FZD7</i> , <i>LRP6 + C2CD3-58</i>			
	MMC bajo					
Asociación	6	<i>COBL-20</i>	<i>SUFU</i>	<i>DVL2</i>	<i>CDH6-75</i> , <i>INVS</i> , <i>PLCB4</i>	
TDT	5	<i>BBS2</i>		<i>VANGL2-27</i>	<i>LRP5-28</i> , <i>LRP5-42</i> , <i>PLCB4</i>	
IGG::	10	<i>LRP5-42 + WNT9B</i> , <i>LRP5-28 + IFT52</i> , <i>HNFB1B + IFT52</i> , <i>LRP2-91 + BBS2</i> , <i>C2CD3-58 + RPGRIP1L</i> , <i>CC2D2A + SMO</i> , <i>VANGL2-48 + DVL3</i> , <i>PLCB4 + ROCK2</i> <i>COBL-89 + CELSR2</i> , <i>PLCB2 + CELSR2</i>				

No. VG: número de variantes genéticas con resultados estadísticos significativos. (*): Se indica el nombre del gen y los últimos dígitos del rs cuando estudiamos dos o más VG en el mismo gen. **TDT:** prueba de desequilibrio de transmisión. **IGG:** interacción gen-gen. (**): Se muestra el número de interacciones y los genes que participan en cada una.

5. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN.

El mielomeningocele (MMC) es la variedad más frecuente y grave de espina bífida³⁴, un tipo de defecto del cierre del tubo neural, malformación congénita más frecuente después de las cardiopatías congénitas¹⁴². Se caracteriza por una herniación quística de la médula espinal que contiene meninges, raíces nerviosas y líquido cefalorraquídeo, y es consecuencia de una alteración del proceso de neurulación primaria durante la embriogénesis temprana en las semanas 2 a 4 después de la fecundación.^{1 19}

Si bien muchos esfuerzos se han dirigido a la investigación de los defectos del cierre del tubo neural, aún es poco lo que se sabe sobre su etiopatogenia en humanos¹⁴³. Estudios que contribuyan a un mejor entendimiento de su etiología y de la heterogeneidad del riesgo entre diversas poblaciones muy probablemente repercutirán en una disminución del riesgo de ocurrencia y recurrencia del MMC.

En nuestro estudio hemos identificado una serie de factores genéticos y algunos ambientales asociados a esta malformación congénita (MC), muy frecuente no sólo en nuestra población

mestizo-mexicana⁴, sino a nivel mundial, la que representa un importante problema de salud pública.

En el análisis de antecedentes clínicos maternos se observó en el grupo de casos una mayor frecuencia de las siguientes características: un creciente índice de masa corporal, irregularidades menstruales y cesáreas previas (tabla 5).

Respecto al IMC encontramos un riesgo 48% mayor para las madres con sobrepeso y obesidad grados 1 y 2 de tener un hijo(a) afectado con MMC, en comparación con madres control, confirmando reportes previos.^{45 46 148} El antecedente de irregularidades menstruales mostró una frecuencia significativamente mayor en las madres de casos, no encontrando antecedentes en la literatura que vinculen esta característica con MMC u otro defecto de cierre del tubo neural. Existe evidencia que asocia la obesidad con las irregularidades menstruales¹⁴⁹, pudiendo tener esta condición una relación de susceptibilidad en común que predisponen en conjunto al MMC.

La mayor frecuencia de parto por cesárea es muy probablemente una consecuencia de la MC, particularmente en las últimas décadas en que la implementación del ultrasonido fetal de manera rutinaria permite el diagnóstico del MMC con precisión en los primeros meses del embarazo permitiendo planear este tipo de parto.

La hidrocefalia, frecuente consecuencia secundaria del mielomeningocele, se confirmó en el 44% de casos. Consistente con reportes previos, la hidrocefalia es una asociación muy común con espina bífida⁴³. Se ha propuesto que la hidrocefalia se origina de manera primaria a partir de una obstrucción al flujo del líquido cefalorraquídeo a nivel del cuarto ventrículo cerebral ocasionada por la malformación de Chiari tipo II¹⁴⁴; sin embargo la hidrocefalia también se puede observar en DTN sin malformación Chiari II asociada¹⁴⁵. Otros factores que contribuyen a su origen incluyen estenosis del acueducto, hemodinamia venosa y denudación endimaria⁴³. Por otro lado, existe evidencia que indica que disrupciones ciliares, como lo es el ensamblaje de los brazos de dineína ciliares endimarios, resultan en pérdida de líquido cefalorraquídeo y subsecuentemente en el desarrollo de hidrocefalia.^{146 147} Ésta asociación muy frecuente, entre espina bífida e hidrocefalia, podría representar la presencia de diferentes malformaciones congénitas con una base etiopatogénica común.

Las vías de señalización de polaridad celular planar, de Hedgehog y de Wnt, son esenciales para el cierre normal del tubo neural y comparten la característica de requerir un cilio estructural y funcionalmente íntegro para su adecuada función. Decidiéndose incluir en el estudio, variantes en genes relacionados a estas específicas vías de señalización y funcionamiento ciliar.

Los resultados del análisis de asociación, de desequilibrio de transmisión (TDT), y del análisis de interacción gen-gen muestran claramente un comportamiento diferencial dependiente de la localización del defecto, de las variantes génicas y del tipo de análisis realizado.

Al comparar entre casos y controles las frecuencias alélicas de los 37 genes y sus 45 variantes, se encontraron diferencias estadísticas significativas para cinco variantes de los genes *COBL*, *DVL2*, *INVS*, *PLCB4*, y *VANGL2*. Cuatro de estas variantes génicas mostraron asociación con

MMC-bajo, dos positivamente asociadas al riesgo, *DVL2*-rs2074216 e *INVS*-rs7024375 con ORs 1.60 (1.20-2.15) y 1.35 (1.10-1.65), respectivamente. Y las otras dos variantes negativamente asociadas al riesgo de MMC-bajo, *COBL*-rs10230120 y *PLCB4*-rs6077510, ORs 0.41 (0.24-0.69) y 0.72 (0.59-0.88), respectivamente (Tabla 8). Estos resultados significativos son exclusivos para el subfenotipo del MMC-bajo. En cambio el subfenotipo MMC-alto mostró sólo asociación significativa con una variante, *VANGL2*-rs12086448, OR 0.54 (IC 95% 0.35-0.83), datos que apoyan una posible correlación genotipo-fenotipo. Resultados similares se observan al comparar las frecuencias genotípicas entre casos y controles (Tabla 9), resaltando diversos modelos genéticos para diferentes variantes génicas y observando nuevamente que las variantes con resultados significativos difieren entre el MMC-alto y el MMC-bajo (Tabla 10). No hemos encontrado reporte previos para estudios de genes candidato, como el presente, que analicen una posible correlación genotipo-fenotipo con MMC u otros defectos del tubo neural.

El gen *COBL* (proteína cordon-bleu con repetidos WH2) codifica para una proteína reguladora de actina, que en el ratón mutante *Vangl2^{Lp}/Cobl^{C101/C101}* causa exencefalia¹⁵⁸. En humanos, se ha estudiado en DTN craneales mediante estrategia de secuenciación exónica dirigida, mostrando variantes nuevas y raras estadísticamente significativas¹⁵⁹, con un efecto Polyphen estimado como benigno para la variante de sentido erróneo rs10230120¹⁶⁰. Sin embargo, en nuestra muestra, observamos DES con una asociación de riesgo negativa tanto para el MMC-total como para el subfenotipo MMC-bajo (Tabla 8).

La proteína multifuncional *DVL2* participa en la vía PCP. De Marco et al¹⁶⁵ reportó una posible participación de variantes raras en el gen *DVL2* como deletéreas para los DTN en humanos. De forma significativa nosotros encontramos la variante alélica un 50% más frecuentemente en casos que en controles, para el MMC-total (OR 1.56, p <0.0004) y para el MMC-bajo (OR 1.60, p <0.0010) (Tabla 8). Si bien en la base de datos SNPinfo¹⁵² la variante *DVL2*-rs2074216 se predice que cambia el patrón o la eficiencia del proceso de corte y empalme al alterar el sitio de empalme, no se ha reportado relacionada con los DTN en estudios de asociación en humanos.

La proteína ciliar Inversina se une a los microtúbulos y se localiza en el cuerpo basal del cilio⁸², y dirige a la proteína *DVL1* para su degradación inhibiendo así la señalización de la vía Wnt canónica¹⁵⁰. Ratones con mutaciones en el gen ciliar *Invs* muestran defectos morfológicos diferentes de los DTN, tales como *situs inversus*⁷⁴. En humanos, no se ha reportado asociada con DTN. Si bien la variante rs7024375 se localiza en la región 5'UTR del gen *INVS* (Tabla 3), esta se encuentra en un sitio de unión a factores de transcripción y muestra un potencial regulatorio de 0.41¹⁵², lo que no la descarta como una variante de riesgo para el MMC-bajo, principalmente en esta muestra de población Mexicana,.

La proteína *PLCB4* (fosfolipasa C beta 4) pertenece a un grupo de enzimas que hidrolizan fosfolípidos y otras moléculas lipofílicas, y por similitud con otras isoformas de fosfolipasa C se ha vinculado a la vía Wnt/Ca²⁺ como un segundo mensajero tras la activación del receptor Frizzled por su ligando Wnt5¹⁵³. En humanos no se han reportado estudios de asociación con defectos del tubo neural. En modelos animales se ha demostrado que isoformas de proteína cinasa C participan en las malformaciones embrionarias inducidas por hiperglucemia en madres diabéticas, muy probablemente a través de la vía de peroxidación de fosfolípidos cPLA¹⁵⁴. En la presente muestra la variante *PLCB4*-rs6077510 muestra DES, pero asociada negativamente al riesgo con el MMC-total (OR 0.68, p = .0051) y con el subfenotipo de MMC-bajo (OR 0.72,

$p = .001$), siendo que esta variante de sentido erróneo se predice como benigna mediante el software Polyphen¹⁵⁵.

El gen *VANGL2* (Van Gogh-like 2) codifica para una proteína de membrana implicada en la regulación de la polaridad celular planar, y transmite señales direccionales a las células en las capas epiteliales¹⁶¹. En el modelo de ratón looptail para DTN, *Vangl2* está alterado¹⁶², y en otros modelos de ratón induce espina bífida caudal¹⁶³. En humanos, se ha estudiado en diferentes tipos de DTN^{78, 164} añadiendo evidencia de su patogenicidad para estos defectos. Contrario a esto, observamos que la variante *VANGL2*-rs120864468 sinónima fue significativamente menos frecuente en el MMC-total (OR 0.76, $p = .0032$) y en el MMC-alto (OR 0.54, $p = .0029$), pero no así para el MMC-bajo, sugiriendo, como las otras cuatro variantes génicas discutidas previamente, una posible correlación genotipo-fenotipo para la muestra estudiada.

El análisis de desequilibrio de transmisión (TDT) (Tabla 10) mostró que el alelo parental con la variante se transmite con significativamente mayor frecuencia respecto a lo esperado para tres variantes de sentido erróneo en los genes *BBS2* y *C2CD3* que participan en la morfogénesis y funcionamiento ciliares, y en *LRP5* involucrado en la señalización de la vía Wnt. Interesantemente, dos de estas, *BBS2*-rs11373 y *LRP5*-rs3736228 se observan para el MMC-bajo (OR 1.35, $p = .007$; y OR 1.45, $p = .004$, respectivamente), y la variante *C2CD3*-rs3736228 exclusivamente para el MMC-alto (OR 1.81, $p = .006$), reafirmando una vez más la existencia de una muy probable correlación genotipo-fenotipo (Tabla 11).

Otro hallazgo interesante es el de transmisión preferencial de la variante *PLCB4*-rs6077510 para el MMC-bajo y que en el análisis de asociación comparando tanto frecuencias alélicas como genotípicas muestra resultados significativos también para el MMC-bajo (Tabla 12). De los 8 genes donde se localizan las 9 variantes génicas que encontramos con transmisión preferencial en el TDT, cuatro participan en la vía de señalización Wnt, tres en la morfogénesis/función ciliar, y un gen en la vía de señalización PCP.

El gen *BBS2* (proteína 2, síndrome de Bardet-Biedl) es un miembro de la familia de genes *BBS2*, y codifica para una proteína que participa, en conjunto con el complejo BBSoma, en la formación y función ciliares. La variante de sentido erróneo *BBS2*-rs11373 se predice in silico como benigna¹⁵⁵. Si bien encontramos estudios en pez cebra¹⁶⁶ que reportan defectos en la neurulación y la adhesión celular neural, así como mutaciones en ratones¹⁶⁷ que describen la ocurrencia de DTN, no encontramos estudios en humanos respecto a variantes génicas en *BBS2* y los DTN.

El gen *LRP5* (proteína 5 relacionada al receptor LDL) codifica para un receptor transmembranar lipoproteico de baja densidad que actúa como un co-receptor de los miembros de la familia de proteínas Frizzled para la transducción de señales de proteínas de la vía Wnt¹⁶¹. La transducción de señales de la vía Wnt3 es crítica para el proceso de formación de la estría primitiva, tal como se ha reportado en ratones mutantes con alteraciones en *Lrp5* y *Lrp5*¹⁶⁸. La variante *LRP5*-rs3736228 se ha asociado con fracturas vertebrales y densidad mineral ósea reducida¹⁶⁹, y aunque se predice como benigna¹⁵⁵, altera el sitio de corte y empalme¹⁵². En esta muestra, observamos que este alelo se transmite preferencialmente en los casos con el subfenotipo MMC-bajo (OR 1.45, $p = 0.0042$). Aunque ambas variantes génicas muestran una tendencia de patrón similar de riesgo TDT para el MMC-total, cómo se observa en el MMC-bajo, los valores de p no alcanzan significancia estadística (Tabla 11). En humanos, se ha investigado en diversas enfermedades, pero a nuestro conocimiento, no en los defectos de cierre del tubo neural.

El gen *C2CD3* (proteína 3 contenedora de dominio C2) codifica para una proteína que funciona como un controlador de la elongación de centriolos y se requiere para la formación de cilios y para la señalización Hedgehog^{169 170}. La variante de sentido erróneo rs826058, induce un posible cambio dañino tal como se predice in silico¹⁵⁵. Observamos que esta variante alélica es significativamente más frecuentemente transmitida en los casos, pero solo para aquellos con subfenotipo MMC-alto, reforzando la propuesta hipótesis de una posible correlación genotipo-fenotipo.

De las 13 interacciones gen-gen (IGG) que mostraron DES (Tabla suplementaria 1), nueve mostraron un OR sugerente de interacción de riesgo positivamente asociada al MMC (Tabla 12). De las cuales, cuatro se presentaron en MMC-total, cuatro en MMC-bajo, y sólo una en el MMC-alto. Interesantemente, ninguna de las IGG de riesgo se repite en los diferentes grupos de casos considerados, la muestra total y los subfenotipos de MMC alto y bajo, mostrando un patrón específico de variantes de IGG como se puede observar en la tabla 12. Este muy particular comportamiento de variantes en IGG, así como los resultados de los análisis de asociación y TDT mencionados previamente, sugieren en conjunto su contribución en algunos casos de una manera aditiva para las diferentes localizaciones a lo largo de la columna vertebral del MMC, y en consecuencia de los subfenotipos anatómicos y neurológicos.

En síntesis, los resultados del análisis de IGG que mostraron significancia estadística, muestran que los genes y sus variantes interactúan con otros genes y variantes de forma aleatoria. Sin embargo, algunos genes y variantes participan más frecuentemente que otros. Esto es cierto para genes involucrados en la ciliogénesis, que se observó participando en siete IGG, cinco con genes de diferentes vías de señalización, y una con genes ciliares.

Los genes de la vía de señalización Wnt participaron en tres IGG con diferentes genes, dos veces con VG de genes ciliares y en una con un gen PCP. Los genes de la vía de señalización PCP también participaron en tres IGG, en dos ocasiones con dos diferentes VG de *COBL*. La vía de señalización con menor representación en las IGG fue la de Hedgehog, observándose en dos ocasiones, una con un gen ciliar y otra con otro gen de la vía Hh. Como previamente se mencionó, sólo una IGG significativa se detectó en los casos de MMC-alto, y fue entre variantes de genes ciliares y de la vía de señalización Wnt (*PARD3* y *PLCB4*), y la cual no participa en alguna otra IGG sea del MMC-total o del MMC-bajo.

El MMC puede ocurrir a cualquier nivel a lo largo de la columna vertebral, siendo más frecuente en las vértebras inferiores. De acuerdo al nivel anatómico de presentación del defecto, diferentes sub-fenotipos pueden clasificarse: torácico, toraco-lumbar, lumbar, lumbo-sacro o sacro. Existe evidencia que sugiere que ciertos subtipos de espina bífida y/o sub-fenotipos pueden ser etiológicamente distintos.^{156 157} Se sabe que cuanto más alto a nivel de la columna vertebral se localice el MMC mayor la gravedad de las lesiones, de la afectación neuromuscular y de trastornos asociados. El resultante efecto aditivo combinado al considerar la gravedad del fenotipo y las interacciones gen-gen representa una interesante estrategia de análisis para estimar el riesgo de ocurrencia del MMC y otros defectos congénitos.

El diseño de tipo multicéntrico de este estudio que incluye casos y controles de 16 CRIT distribuidos en 16 estados diferentes con información de las características clínico-genéticas considerando pautas reproductivas y de exposición a diversos factores ambientales permite obtener un panorama bastante amplio y representativo del mielomeningocele en nuestra población. Además la inclusión de familias nucleares o tríos brinda mayor fortaleza al estudio,

controlando posibles errores mendelianos, de genotipificación así como de estratificación poblacional.

Estudios como el presente que incluyen un diseño combinado de casos-controles y tríos, la estratificación en subfenotipos de acuerdo a la gravedad del defecto así como el análisis de interacción gen-gen pueden ayudar al mejor entendimiento de la etiología del MMC y de otros defectos congénitos aislados.

Tal como se puede observar en nuestros resultados y como se ha mencionado en parte de la discusión, es la asociación específica entre variantes génicas y la localización anatómica del defecto un hallazgo a ser considerado en estudios posteriores, hecho no reportado previamente en la literatura especializada. Los diferentes tipos de análisis estadísticos realizados, tanto el de frecuencias alélicas y genotípicas como el de desequilibrio de transmisión alélica y de interacción gen-gen, sugieren fuertemente una correlación genotipo-fenotipo entre ciertas variantes génicas de vías de señalización asociadas directa o indirectamente al cilio primario y la gravedad del mielomeningocele.

Existe evidencia en modelos animales de que las vías de señalización Hedgehog, Wnt, y de polaridad celular planar participan en el desarrollo y cierre normal del tubo neural^{25 171}, y de que comparten la necesidad, para su adecuada función, de un cilio íntegro estructuralmente y funcional¹⁵⁰. Con base en lo anterior, investigamos la participación de diferentes variantes génicas ciliares y de estas vías de señalización, añadiendo una variable conceptual poco considerada en estudios previos en humanos, el análisis de una posible correlación genotipo-fenotipo involucrando la localización del MMC y la gravedad clínico-neurológica del defecto.

Los resultados presentados identifican un conjunto de variantes genéticas que interfieren con el cierre normal del tubo neural, y que sugieren correlaciones genotipo-fenotipo, hallazgos que pueden influir en la localización de la ocurrencia del MMC así como la gravedad de esta muy frecuente malformación congénita en nuestra población Mexicana-Mestiza. La validación de nuestras observaciones en futuros estudios permitiría, por un lado su confirmación y por otro la posibilidad de establecer y dirigir estrategias de prevención más personalizadas, sea a nivel familiar como a nivel poblacional para grupos en mayor riesgo dado su antecedentes/componente genético de susceptibilidad y heredofamiliar de riesgo.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. The developing human : clinically oriented embryology. 10th edition. ed. Philadelphia, PA: Elsevier 2016.
2. Winn HR, Youmans JR. Youmans neurological surgery Philadelphia, Pa.: W.B. Saunders,; 2004 [5th:[4 v. (Ixiv, 5296, cviii) ill. (some col.) 28 cm. + 1 CD-ROM (4 3/4 in.)].
3. Wallingford JB. Planar cell polarity, ciliogenesis and neural tube defects. *Hum Mol Genet* 2006;15 Spec No 2:R227-34. doi: 10.1093/hmg/ddl216
4. International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems. Annual report. San Francisco, CA: The Clearinghouse, 2014:volumes.
5. Prevention CfDca. Birth Defects Around the World 2017 [Available from: <https://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/index.html>].
6. Mutchinick O, Lisker R, Babinski V. [The Mexican program of Registration and Epidemiologic Surveillance of External Congenital Malformations]. *Salud publica de Mexico* 1988;30(1):88-100.
7. Greene ND, Copp AJ. Neural tube defects. *Annual review of neuroscience* 2014;37:221-42. doi: 10.1146/annurev-neuro-062012-170354
8. Deraet ER, George TM, Etchevers HC, et al. Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology, and genetics. *Neurotoxicology and teratology* 2005;27(3):515-24. doi: 10.1016/j.ntt.2004.12.007
9. Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, et al. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nature reviews Neuroscience* 2006;7(9):724-31. doi: 10.1038/nrn1986
10. Padmanabhan R. Etiology, pathogenesis and prevention of neural tube defects. *Congenital anomalies* 2006;46(2):55-67. doi: 10.1111/j.1741-4520.2006.00104.x
11. Allache R, Wang M, De Marco P, et al. Genetic studies of ANKRD6 as a molecular switch between Wnt signaling pathways in human neural tube defects. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 2015;103(1):20-6. doi: 10.1002/bdra.23273
12. Kirillova I, Novikova I, Auge J, et al. Expression of the sonic hedgehog gene in human embryos with neural tube defects. *Teratology* 2000;61(5):347-54. doi: 10.1002/(SICI)1096-9926(200005)61:5<347::AID-TERA6>3.0.CO;2-#
13. Petrova R, Joyner AL. Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. *Development* 2014;141(18):3445-57. doi: 10.1242/dev.083691
14. Tissir F, Goffinet AM. Shaping the nervous system: role of the core planar cell polarity genes. *Nature reviews Neuroscience* 2013;14(8):525-35. doi: 10.1038/nrn3525
15. Bay SN, Caspary T. What are those cilia doing in the neural tube? *Cilia* 2012;1(1):19. doi: 10.1186/2046-2530-1-19
16. Louvi A, Grove EA. Cilia in the CNS: the quiet organelle claims center stage. *Neuron* 2011;69(6):1046-60. doi: 10.1016/j.neuron.2011.03.002
17. Lee JE, Gleeson JG. Cilia in the nervous system: linking cilia function and neurodevelopmental disorders. *Current opinion in neurology* 2011;24(2):98-105. doi: 10.1097/WCO.0b013e3283444d05
18. Tortori-Donati P, Rossi A, Cama A. Spinal dysraphism: a review of neuroradiological features with embryological correlations and proposal for a new classification. *Neuroradiology* 2000;42(7):471-91.
19. O'Rahilly R, Muller F. Neurulation in the normal human embryo. *Ciba Foundation symposium* 1994;181:70-82; discussion 82-9.

20. Muller F, O'Rahilly R. The development of the human brain, the closure of the caudal neuropore, and the beginning of secondary neurulation at stage 12. *Anatomy and embryology* 1987;176(4):413-30.
21. Gordon R. A review of the theories of vertebrate neurulation and their relationship to the mechanics of neural tube birth defects. *J Embryol Exp Morphol* 1985;89 Suppl:229-55.
22. Schoenwolf GC, Franks MV. Quantitative analyses of changes in cell shapes during bending of the avian neural plate. *Developmental biology* 1984;105(2):257-72.
23. Ybot-Gonzalez P, Copp AJ. Bending of the neural plate during mouse spinal neurulation is independent of actin microfilaments. *Dev Dyn* 1999;215(3):273-83. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199907)215:3<273::AID-AJA9>3.0.CO;2-H
24. Ulloa F, Briscoe J. Morphogens and the control of cell proliferation and patterning in the spinal cord. *Cell Cycle* 2007;6(21):2640-9. doi: 10.4161/cc.6.21.4822
25. Ybot-Gonzalez P, Cogram P, Gerrelli D, et al. Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure. *Development* 2002;129(10):2507-17.
26. Ybot-Gonzalez P, Gaston-Massuet C, Girdler G, et al. Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling. *Development* 2007;134(17):3203-11. doi: 10.1242/dev.008177
27. Eom DS, Amarnath S, Agarwala S. Apicobasal polarity and neural tube closure. *Dev Growth Differ* 2013;55(1):164-72. doi: 10.1111/dgd.12030
28. 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. doi: 10.1002/bdra.20686
29. Pai YJ, Abdullah NL, Mohd-Zin SW, et al. Epithelial fusion during neural tube morphogenesis. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 2012;94(10):817-23. doi: 10.1002/bdra.23072
30. Rolo A, Savery D, Escuin S, et al. Regulation of cell protrusions by small GTPases during fusion of the neural folds. *Elife* 2016;5:e13273. doi: 10.7554/eLife.13273
31. Nishimura T, Honda H, Takeichi M. Planar cell polarity links axes of spatial dynamics in neural-tube closure. *Cell* 2012;149(5):1084-97. doi: 10.1016/j.cell.2012.04.021
32. Dias MS, Partington M. Embryology of myelomeningocele and anencephaly. *Neurosurg Focus* 2004;16(2):E1. doi: 10.3171/foc.2004.16.2.2
33. Centers for Disease C, Prevention. CDC Grand Rounds: additional opportunities to prevent neural tube defects with folic acid fortification. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010;59(31):980-4.
34. 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. doi: 10.1002/ddrr.93
35. Gu X, Lin L, Zheng X, et al. High prevalence of NTDs in Shanxi Province: a combined epidemiological approach. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 2007;79(10):702-7. doi: 10.1002/bdra.20397
36. Mutchinick OM, Lopez MA, Luna L, et al. High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Molecular genetics and metabolism* 1999;68(4):461-7. doi: 10.1006/mgme.1999.2939
37. Moore CA, Li S, Li Z, et al. Elevated rates of severe neural tube defects in a high-prevalence area in northern China. *American journal of medical genetics* 1997;73(2):113-8.

38. Canfield MA, Mai CT, Wang Y, et al. The association between race/ethnicity and major birth defects in the United States, 1999-2007. *Am J Public Health* 2014;104(9):e14-23. doi: 10.2105/AJPH.2014.302098
39. Juriloff DM, Harris MJ. Hypothesis: the female excess in cranial neural tube defects reflects an epigenetic drag of the inactivating X chromosome on the molecular mechanisms of neural fold elevation. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 2012;94(10):849-55. doi: 10.1002/bdra.23036
40. Boulet SL, Yang Q, Mai C, et al. Trends in the postfortification prevalence of spina bifida and anencephaly in the United States. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 2008;82(7):527-32. doi: 10.1002/bdra.20468
41. Grosse SD, Collins JS. Folic acid supplementation and neural tube defect recurrence prevention. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 2007;79(11):737-42. doi: 10.1002/bdra.20394
42. Collins JS, Canfield MA, Pearson K, et al. Public health projects for preventing the recurrence of neural tube defects in the United States. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 2009;85(11):935-8. doi: 10.1002/bdra.20619
43. Copp AJ, Adzick NS, Chitty LS, et al. Spina bifida. *Nature reviews Disease primers* 2015;1:15007. doi: 10.1038/nrdp.2015.7
44. Loeken MR. Current perspectives on the causes of neural tube defects resulting from diabetic pregnancy. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics* 2005;135C(1):77-87. doi: 10.1002/ajmg.c.30056
45. Anderson JL, Waller DK, Canfield MA, et al. Maternal obesity, gestational diabetes, and central nervous system birth defects. *Epidemiology* 2005;16(1):87-92.
46. Blomberg MI, Kallen B. Maternal obesity and morbid obesity: the risk for birth defects in the offspring. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 2010;88(1):35-40. doi: 10.1002/bdra.20620
47. Holmes LB. Spina Bifida: Anticonvulsants and Other Maternal Influences. Ciba Foundation Symposium 181 - Neural Tube Defects: John Wiley & Sons, Ltd. 1994:232-52.
48. Gilboa SM, Broussard CS, Devine OJ, et al. Influencing clinical practice regarding the use of antiepileptic medications during pregnancy: modeling the potential impact on the prevalences of spina bifida and cleft palate in the United States. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics* 2011;157C(3):234-46. doi: 10.1002/ajmg.c.30306
49. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports* 1992;41(RR-14):1-7.
50. Imbard A, Benoist JF, Blom HJ. Neural tube defects, folic acid and methylation. *International journal of environmental research and public health* 2013;10(9):4352-89. doi: 10.3390/ijerph10094352
51. Groenen PM, Peer PG, Wevers RA, 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.
52. Greene ND, Leung KY, Gay V, et al. Inositol for the prevention of neural tube defects: a pilot randomised controlled trial. *The British journal of nutrition* 2016;115(6):974-83. doi: 10.1017/S0007114515005322

53. Bupp CP, Sarasua SM, Dean JH, et al. When folic acid fails: Insights from 20 years of neural tube defect surveillance in South Carolina. *American journal of medical genetics Part A* 2015;167A(10):2244-50. doi: 10.1002/ajmg.a.37168
54. 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. doi: 10.1002/bdra.20676
55. 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. doi: 10.1002/bdra.20333
56. Greene ND, Stanier P, Copp AJ. Genetics of human neural tube defects. *Hum Mol Genet* 2009;18(R2):R113-29. doi: 10.1093/hmg/ddp347
57. Krupp DR, Xu PT, Thomas S, et al. Transcriptome profiling of genes involved in neural tube closure during human embryonic development using long serial analysis of gene expression (long-SAGE). *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 2012;94(9):683-92. doi: 10.1002/bdra.23040
58. Copp AJ, Greene NDE. Genetics and development of neural tube defects. *Journal of Pathology* 2010;220(2):217-30.
59. Molloy AM, Pangilinan F, Brody LC. Genetic Risk Factors for Folate-Responsive Neural Tube Defects. *Annual review of nutrition* 2017 doi: 10.1146/annurev-nutr-071714-034235
60. Yadav U, Kumar P, Yadav SK, et al. "Polymorphisms in folate metabolism genes as maternal risk factor for neural tube defects: an updated meta-analysis". *Metabolic brain disease* 2015;30(1):7-24. doi: 10.1007/s11011-014-9575-7
61. Liu J, Qi J, Yu X, et al. Investigations of single nucleotide polymorphisms in folate pathway genes in Chinese families with neural tube defects. *Journal of the neurological sciences* 2014;337(1-2):61-6. doi: 10.1016/j.jns.2013.11.017
62. Zhang T, Lou J, Zhong R, et al. Genetic variants in the folate pathway and the risk of neural tube defects: a meta-analysis of the published literature. *PloS one* 2013;8(4):e59570. doi: 10.1371/journal.pone.0059570
63. Fisk Green R, Byrne J, Crider KS, et al. Folate-related gene variants in Irish families affected by neural tube defects. *Frontiers in genetics* 2013;4:223. doi: 10.3389/fgene.2013.00223
64. Gonzalez-Herrera L, Castillo-Zapata I, Garcia-Escalante G, et al. A1298C polymorphism of the MTHFR gene and neural tube defects in the state of Yucatan, Mexico. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 2007;79(8):622-6. doi: 10.1002/bdra.20381
65. Yan L, Zhao L, Long Y, et al. Association of the maternal MTHFR C677T polymorphism with susceptibility to neural tube defects in offspring: evidence from 25 case-control studies. *PloS one* 2012;7(10):e41689. doi: 10.1371/journal.pone.0041689
66. Gueant JL, Chabi NW, Gueant-Rodriguez RM, et al. Environmental influence on the worldwide prevalence of a 776C->G variant in the transcobalamin gene (TCN2). *J Med Genet* 2007;44(6):363-7. doi: 10.1136/jmg.2006.048041
67. Wilcken B, Bamforth F, Li Z, et al. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J Med Genet* 2003;40(8):619-25.

68. Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debard R, et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *The American journal of clinical nutrition* 2006;83(3):701-7.
69. Volcik KA, Shaw GM, Lammer EJ, et al. Evaluation of infant methylenetetrahydrofolate reductase genotype, maternal vitamin use, and risk of high versus low level spina bifida defects. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 2003;67(3):154-7. doi: 10.1002/bdra.10008
70. Wilson A, Platt R, Wu Q, et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Molecular genetics and metabolism* 1999;67(4):317-23. doi: 10.1006/mgme.1999.2879
71. Toepoel M, Steegers-Theunissen RP, Ouborg NJ, et al. Interaction of PDGFRA promoter haplotypes and maternal environmental exposures in the risk of spina bifida. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 2009;85(7):629-36. doi: 10.1002/bdra.20574
72. Seo JH, Zilber Y, Babayeva S, et al. Mutations in the planar cell polarity gene, Fuzzy, are associated with neural tube defects in humans. *Hum Mol Genet* 2011;20(22):4324-33. doi: 10.1093/hmg/ddr359
73. De Marco P, Merello E, Piatelli G, et al. Planar cell polarity gene mutations contribute to the etiology of human neural tube defects in our population. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 2014;100(8):633-41. doi: 10.1002/bdra.23255
74. 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. doi: 10.1002/bdra.23079
75. Allache R, De Marco P, Merello E, et al. Role of the planar cell polarity gene CELSR1 in neural tube defects and caudal agenesis. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 2012;94(3):176-81. doi: 10.1002/bdra.23002
76. May-Simera HL, Kelley MW. Cilia, Wnt signaling, and the cytoskeleton. *Cilia* 2012;1(1):7. doi: 10.1186/2046-2530-1-7
77. Ybot-Gonzalez P, Savery D, Gerrelli D, et al. Convergent extension, planar-cell-polarity signaling and initiation of mouse neural tube closure. *Development* 2007;134(4):789-99.
78. Kibar Z, Salem S, Bosoi CM, et al. Contribution of VANGL2 mutations to isolated neural tube defects. *Clin Genet* 2011;80(1):76-82. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01515.x
79. Ishikawa H, Marshall WF. Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12(4):222-34. doi: 10.1038/nrm3085
80. Chen X, Shen Y, Gao Y, et al. Detection of copy number variants reveals association of cilia genes with neural tube defects. *PloS one* 2013;8(1):e54492. doi: 10.1371/journal.pone.0054492
81. Jones C, Roper VC, Foucher I, et al. Ciliary proteins link basal body polarization to planar cell polarity regulation. *Nature genetics* 2008;40(1):69-77. doi: 10.1038/ng.2007.54
82. Goetz SC, Anderson KV. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nature reviews Genetics* 2010;11(5):331-44. doi: 10.1038/nrg2774

83. Mukhopadhyay S, Rohatgi R. G-protein-coupled receptors, Hedgehog signaling and primary cilia. *Seminars in cell & developmental biology* 2014;33:63-72. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.05.002
84. Niewiadowski P, Kong JH, Ahrends R, et al. Gli protein activity is controlled by multisite phosphorylation in vertebrate Hedgehog signaling. *Cell Rep* 2014;6(1):168-81. doi: 10.1016/j.celrep.2013.12.003
85. Pal K, Hwang SH, Somatilaka B, et al. Smoothed determines beta-arrestin-mediated removal of the G protein-coupled receptor Gpr161 from the primary cilium. *J Cell Biol* 2016;212(7):861-75. doi: 10.1083/jcb.201506132
86. Bachmann VA, Mayrhofer JE, Ilouz R, et al. Gpr161 anchoring of PKA consolidates GPCR and cAMP signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2016;113(28):7786-91. doi: 10.1073/pnas.1608061113
87. Mick DU, Rodrigues RB, Leib RD, et al. Proteomics of Primary Cilia by Proximity Labeling. *Dev Cell* 2015;35(4):497-512. doi: 10.1016/j.devcel.2015.10.015
88. Kirschner LS, Yin Z, Jones GN, et al. Mouse models of altered protein kinase A signaling. *Endocr Relat Cancer* 2009;16(3):773-93. doi: 10.1677/ERC-09-0068
89. Hwang SH, Mukhopadhyay S. G-protein-coupled receptors and localized signaling in the primary cilium during ventral neural tube patterning. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 2015;103(1):12-9. doi: 10.1002/bdra.23267
90. Matteson PG, Desai J, Korstanje R, et al. The orphan G protein-coupled receptor, Gpr161, encodes the vacuolated lens locus and controls neurulation and lens development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105(6):2088-93. doi: 10.1073/pnas.0705657105
91. Li BI, Matteson PG, Ababon MF, et al. The orphan GPCR, Gpr161, regulates the retinoic acid and canonical Wnt pathways during neurulation. *Developmental biology* 2015;402(1):17-31. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.02.007
92. Mukhopadhyay S, Wen X, Ratti N, et al. The ciliary G-protein-coupled receptor Gpr161 negatively regulates the Sonic hedgehog pathway via cAMP signaling. *Cell* 2013;152(1-2):210-23. doi: 10.1016/j.cell.2012.12.026
93. Mukhopadhyay S, Wen X, Chih B, et al. TULP3 bridges the IFT-A complex and membrane phosphoinositides to promote trafficking of G protein-coupled receptors into primary cilia. *Genes Dev* 2010;24(19):2180-93. doi: 10.1101/gad.1966210
94. Tran PV, Haycraft CJ, Besschetnova TY, et al. THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia. *Nature genetics* 2008;40(4):403-10. doi: 10.1038/ng.105
95. Ocbina PJ, Eggenschwiler JT, Moskowitz I, et al. Complex interactions between genes controlling trafficking in primary cilia. *Nature genetics* 2011;43(6):547-53. doi: 10.1038/ng.832
96. Liem KF, Jr., Ashe A, He M, et al. The IFT-A complex regulates Shh signaling through cilia structure and membrane protein trafficking. *J Cell Biol* 2012;197(6):789-800. doi: 10.1083/jcb.201110049
97. Qin J, Lin Y, Norman RX, et al. Intraflagellar transport protein 122 antagonizes Sonic Hedgehog signaling and controls ciliary localization of pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108(4):1456-61. doi: 10.1073/pnas.1011410108

98. Regard JB, Malhotra D, Gvozdenovic-Jeremic J, et al. Activation of Hedgehog signaling by loss of GNAS causes heterotopic ossification. *Nat Med* 2013;19(11):1505-12. doi: 10.1038/nm.3314
99. Amieux PS, Howe DG, Knickerbocker H, et al. Increased basal cAMP-dependent protein kinase activity inhibits the formation of mesoderm-derived structures in the developing mouse embryo. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(30):27294-304. doi: 10.1074/jbc.M200302200
100. Huang Y, Roelink H, McKnight GS. Protein kinase A deficiency causes axially localized neural tube defects in mice. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(22):19889-96. doi: 10.1074/jbc.M111412200
101. Tuson M, He M, Anderson KV. Protein kinase A acts at the basal body of the primary cilium to prevent Gli2 activation and ventralization of the mouse neural tube. *Development* 2011;138(22):4921-30. doi: 10.1242/dev.070805
102. Svard J, Heby-Henricson K, Persson-Lek M, et al. Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Dev Cell* 2006;10(2):187-97. doi: 10.1016/j.devcel.2005.12.013
103. Wallingford JB, Fraser SE, Harland RM. Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Dev Cell* 2002;2(6):695-706.
104. Murdoch JN, Damrau C, Paudyal A, et al. Genetic interactions between planar cell polarity genes cause diverse neural tube defects in mice. *Disease models & mechanisms* 2014;7(10):1153-63. doi: 10.1242/dmm.016758
105. Wang XJ, Zhang DL, Xu ZG, et al. Understanding cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptors. *Journal of neurochemistry* 2014;131(6):699-711. doi: 10.1111/jnc.12955
106. Berger-Muller S, Suzuki T. Seven-pass transmembrane cadherins: roles and emerging mechanisms in axonal and dendritic patterning. *Mol Neurobiol* 2011;44(3):313-20. doi: 10.1007/s12035-011-8201-5
107. Curtin JA, Quint E, Tsipouri V, 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.
108. Boutin C, Goffinet AM, Tissir F. Celsr1-3 cadherins in PCP and brain development. *Curr Top Dev Biol* 2012;101:161-83. doi: 10.1016/B978-0-12-394592-1.00010-7
109. Zimmerman K, Yoder BK. SnapShot: Sensing and Signaling by Cilia. *Cell* 2015;161(3):692-92 e1. doi: 10.1016/j.cell.2015.04.015
110. Wu G, Huang X, Hua Y, et al. Roles of planar cell polarity pathways in the development of neural [correction of neutral] tube defects. *Journal of biomedical science* 2011;18:66. doi: 10.1186/1423-0127-18-66
111. Kibar Z, Bosoi CM, Kooistra M, et al. Novel mutations in VANGL1 in neural tube defects. *Hum Mutat* 2009;30(7):E706-15. doi: 10.1002/humu.21026
112. Robinson A, Escuin S, Doudney K, et al. Mutations in the planar cell polarity genes CELSR1 and SCRIB are associated with the severe neural tube defect craniorachischisis. *Hum Mutat* 2012;33(2):440-7. doi: 10.1002/humu.21662
113. Lei Y, Zhu H, Yang W, et al. Identification of novel CELSR1 mutations in spina bifida. *PloS one* 2014;9(3):e92207. doi: 10.1371/journal.pone.0092207
114. Shi J, Zhao Y, Galati D, et al. Chibby functions in Xenopus ciliary assembly, embryonic development, and the regulation of gene expression. *Developmental biology* 2014;395(2):287-98. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.09.008

115. Zhao T, Gan Q, Stokes A, et al. beta-catenin regulates Pax3 and Cdx2 for caudal neural tube closure and elongation. *Development* 2014;141(1):148-57. doi: 10.1242/dev.101550
116. Allache R, Lachance S, Guyot MC, et al. Novel mutations in Lrp6 orthologs in mouse and human neural tube defects affect a highly dosage-sensitive Wnt non-canonical planar cell polarity pathway. *Hum Mol Genet* 2014;23(7):1687-99. doi: 10.1093/hmg/ddt558
117. Drolet B. Birthmarks to worry about. Cutaneous markers of dysraphism. *Dermatol Clin* 1998;16(3):447-53.
118. Mitchell LE, Adzick NS, Melchionne J, et al. Spina bifida. *Lancet* 2004;364(9448):1885-95. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17445-X
119. Sival DA, Begeer JH, Staal-Schreinemachers AL, et al. Perinatal motor behaviour and neurological outcome in spina bifida aperta. *Early Hum Dev* 1997;50(1):27-37.
120. Bouchard S, Davey MG, Rintoul NE, et al. Correction of hindbrain herniation and anatomy of the vermis after in utero repair of myelomeningocele in sheep. *J Pediatr Surg* 2003;38(3):451-8; discussion 51-8. doi: 10.1053/jpsu.2003.50078
121. Adzick NS, Thom EA, Spong CY, et al. A randomized trial of prenatal versus postnatal repair of myelomeningocele. *The New England journal of medicine* 2011;364(11):993-1004. doi: 10.1056/NEJMoa1014379
122. Kohl T, Gembruch U. Current status and prospects of fetoscopic surgery for spina bifida in human fetuses. Response to Fichter et al: Fetal spina bifida repair--current trends and prospects of intrauterine neurosurgery (Fetal Diagn Ther 2008;23:271-286). *Fetal Diagn Ther* 2008;24(3):318-20. doi: 10.1159/000158549
123. Verbeek RJ, Heep A, Maurits NM, et al. Fetal endoscopic myelomeningocele closure preserves segmental neurological function. *Dev Med Child Neurol* 2012;54(1):15-22. doi: 10.1111/j.1469-8749.2011.04148.x
124. Pedreira DA, Zanon N, Nishikuni K, et al. Endoscopic surgery for the antenatal treatment of myelomeningocele: the CECAM trial. *American journal of obstetrics and gynecology* 2016;214(1):111 e1-11 e11. doi: 10.1016/j.ajog.2015.09.065
125. Caldarelli M, Di Rocco C, La Marca F. Shunt complications in the first postoperative year in children with meningomyelocele. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 1996;12(12):748-54.
126. Manning SM, Jennings R, Madsen JR. Pathophysiology, prevention, and potential treatment of neural tube defects. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 2000;6(1):6-14. doi: 10.1002/(SICI)1098-2779(2000)6:1<6::AID-MRDD2>3.0.CO;2-B
127. Routh JC, Cheng EY, Austin JC, et al. Design and Methodological Considerations of the Centers for Disease Control and Prevention Urologic and Renal Protocol for the Newborn and Young Child with Spina Bifida. *J Urol* 2016;196(6):1728-34. doi: 10.1016/j.juro.2016.07.081
128. Ouyang L, Bolen J, Valdez R, et al. Characteristics and survival of patients with end stage renal disease and spina bifida in the United States renal data system. *J Urol* 2015;193(2):558-64. doi: 10.1016/j.juro.2014.08.092
129. Mattsson S, Gladh G. [Children with meningomyelocele become adults!]. *Lakartidningen* 2005;102(37):2566-70.

130. Thompson DN. Postnatal management and outcome for neural tube defects including spina bifida and encephalocoeles. *Prenatal diagnosis* 2009;29(4):412-9. doi: 10.1002/pd.2199
131. Seitzberg A, Lind M, Biering-Sorensen F. Ambulation in adults with myelomeningocele. Is it possible to predict the level of ambulation in early life? *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 2008;24(2):231-7. doi: 10.1007/s00381-007-0450-2
132. 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. doi: 10.1056/NEJM199212243272602
133. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. *Lancet* 1991;338(8760):131-7.
134. Williams J, Mai CT, Mulinare J, et al. Updated estimates of neural tube defects prevented by mandatory folic Acid fortification - United States, 1995-2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015;64(1):1-5.
135. Grosse SD, Berry RJ, Mick Tilford J, et al. Retrospective Assessment of Cost Savings From Prevention: Folic Acid Fortification and Spina Bifida in the U.S. *American journal of preventive medicine* 2016;50(5 Suppl 1):S74-80. doi: 10.1016/j.amepre.2015.10.012
136. Cogram P, Tesh S, Tesh J, et al. D-chiro-inositol is more effective than myo-inositol in preventing folate-resistant mouse neural tube defects. *Hum Reprod* 2002;17(9):2451-8.
137. Galanter JM, Fernandez-Lopez JC, Gignoux CR, et al. Development of a panel of genome-wide ancestry informative markers to study admixture throughout the Americas. *PLoS genetics* 2012;8(3):e1002554. doi: 10.1371/journal.pgen.1002554
138. Price AL, Patterson NJ, Plenge RM, et al. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature genetics* 2006;38(8):904-9. doi: 10.1038/ng1847
139. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics* 2007;81(3):559-75. doi: 10.1086/519795
140. Spielman RS, Ewens WJ. The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *American journal of human genetics* 1996;59(5):983-9.
141. Lazeroni LC, Lange K. A conditional inference framework for extending the transmission/disequilibrium test. *Hum Hered* 1998;48(2):67-81.
142. Sarmah S, Muralidharan P, Marrs JA. Common congenital anomalies: Environmental causes and prevention with folic acid containing multivitamins. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews* 2016;108(3):274-86. doi: 10.1002/bdrc.21138
143. Ross ME, Mason CE, Finnell RH. Genomic approaches to the assessment of human spina bifida risk. *Birth defects research* 2017;109(2):120-28. doi: 10.1002/bdra.23592
144. McLone DG, Dias MS. The Chiari II malformation: cause and impact. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 2003;19(7-8):540-50. doi: 10.1007/s00381-003-0792-3
145. Chance A, Sandberg DI. Hydrocephalus in patients with closed neural tube defects. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 2015;31(2):329-32. doi: 10.1007/s00381-014-2492-6

146. Kramer-Zucker AG, Olale F, Haycraft CJ, et al. Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development* 2005;132(8):1907-21. doi: 10.1242/dev.01772
147. Mitchison HM, Schmidts M, Loges NT, et al. Mutations in axonemal dynein assembly factor DNAAF3 cause primary ciliary dyskinesia. *Nature genetics* 2012;44(4):381-9, S1-2. doi: 10.1038/ng.1106
148. Stothard KJ, Tennant PW, Bell R, et al. Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2009;301(6):636-50. doi: 10.1001/jama.2009.113
149. Wei S, Schmidt MD, Dwyer T, et al. Obesity and menstrual irregularity: associations with SHBG, testosterone, and insulin. *Obesity* 2009;17(5):1070-6. doi: 10.1038/oby.2008.641
150. Wheway G, Nazlamova L, Hancock JT. Signaling through the Primary Cilium. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2018;6(8) doi: 10.3389/fcell.2018.00008
151. Okada M, Sugimoto K, Shimada Y, et al. Association of INVS (NPHP2) mutation in an adolescent exhibiting nephronophthisis (NPH) and complete situs inversus. *Clin Nephrol* 2008;69(2):135-41.
152. Z, Taylor JA. SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies. *Nucleic Acids Res* 2009;37(Web Server issue):W600-5. doi: 10.1093/nar/gkp290
153. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, et al. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res* 2016;44(D1):D457-62. doi: 10.1093/nar/gkv1070
154. Zhiyong Z, Wu YK, Reece EA. Demonstration of the essential role of protein kinase C isoforms in hyperglycemia-induced embryonic malformations. *Reproductive sciences* 2008;15(4):349-56. doi: 10.1177/1933719108316986
155. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet* 2013;Chapter 7:Unit7 20. doi: 10.1002/0471142905.hg0720s76
156. Agopian AJ, Canfield MA, Olney RS, et al. Spina bifida subtypes and sub-phenotypes by maternal race/ethnicity in the National Birth Defects Prevention Study. *American journal of medical genetics Part A* 2012;158A(1):109-15. doi: 10.1002/ajmg.a.34383
157. De Wals P, Tairou F, Van Allen MI, et al. Spina bifida before and after folic acid fortification in Canada. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 2008;82(9):622-6. doi: 10.1002/bdra.20485
158. Carroll EA, Gerrelli D, Gasca S, et al. Cordon-bleu is a conserved gene involved in neural tube formation. *Developmental Biology* 2003; 262(1), 16-31. doi: 10.1016/s0012-1606(03)00323-3.
159. Ishida M, Cullup T, Boustred C, et al. A targeted sequencing panel identifies rare damaging variants in multiple genes in the cranial neural tube defects, anencephaly. *Clinical Genetics* 2017; 93, 870-879. <https://doi.org/10.1111/cge.13189>
160. Adzhubei I, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods* 2010; 7(4), 248-249. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
161. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards suites: From gene data mining to disease genome sequence analyses. *Current Protocols in Bioinformatics* 2016; 54, 1.30.1–1.30.33. <https://doi.org/10.1002/cpbi.5>

161. Kibar Z, Vogan KJ, Groulx N, et al. Ltap, a mammalian homolog of drosophila strabismus/van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant loop-tail. *Nature Genetics* 2001; 28(3), 251–255. <https://doi.org/10.1038/90081>
163. Galea GL, Nychyk O, Mole MA, et al. Vangl2 disruption alters the biomechanics of late spinal neurulation leading to spina bifida in mouse embryos. *Disease Models & Mechanisms* 2018; 11(3), dmm032219. <https://doi.org/10.1242/dmm.032219>
164. Lei YP, Zhang T, Li H, et al. VANGL2 mutations in human cranial neural-tube defects. *The New England Journal of Medicine* 2010; 362(23), 2232–2235. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0910820>
165. De Marco P, Merello E, Consales A, et al. Genetic analysis of disheveled 2 and disheveled 3 in human neural tube defects. *Journal of Molecular Neuroscience* 2013; 49(3), 582–588. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9871-9>
166. Badano JL, Leitch CC, Ansley SJ, et al. Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 2006; 439(7074), 326–330. <https://doi.org/10.1038/nature04370>
167. Ross AJ, May-Simera H, Eichers ER, et al. Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nature Genetics* 2005; 37(10), 1135–1140. <https://doi.org/10.1038/ng1644>
168. Herion NJ, Salbaum JM, Kappen C. Traffic jam in the primitive streak: The role of defective mesoderm migration in birth defects. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology* 2014; 100(8), 608–622. <https://doi.org/10.1002/bdra.23283>
169. van Meurs JB, Trikalinos TA, Ralston SH, et al. Large-scale analysis of association between LRP5 and LRP6 variants and osteoporosis. *JAMA* 2008; 299(11), 1277–1290. <https://doi.org/10.1001/jama.299.11.1277>
170. Hoover AN, Wynkoop A, Zeng H, et al. C2cd3 is required for cilia formation and hedgehog signaling in mouse. *Development* 2008; 35(24), 4049–4058. <https://doi.org/10.1242/dev.029835>
171. Nikolopoulou E, Galea GL, Rolo A, et al. Neural tube closure: Cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development* 2017; 144(4), 552–566. <https://doi.org/10.1242/dev.145904>
172. Afzelius BA. Cilia-related diseases. *J Pathol.* 2004 Nov;204(4):470-7. doi: 10.1002/path.1652. PMID: 15495266; PMCID: PMC7167937.

ANEXOS.

Tabla suplementaria 1. Interacciones gen-gen con DES para MMC-total, MMC-alto y MMC-bajo.

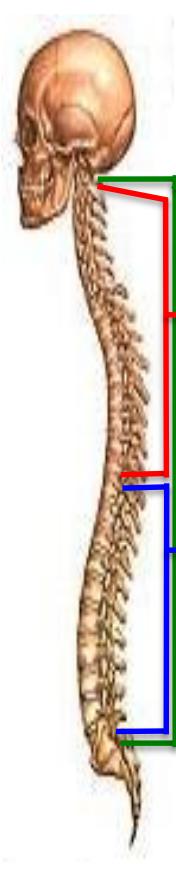
Fenotipo	Gen	Rs	Gen	Rs	OR	Valor p	
	MMC total						
	<i>LRP2</i>	rs4667591	<i>BBS2</i>	rs11373	0.573	0.0019	
	<i>LRP2</i>	rs4667591	<i>INTU</i>	rs3749507	1.584	0.0028	
	<i>LRP5</i>	rs556442	<i>WNT9B</i>	rs4968281	1.412	0.0029	
	<i>LRP2</i>	rs830994	<i>BBS1</i>	rs2298806	1.819	0.0032	
	<i>VANGL2</i>	rs12086448	<i>LRP2</i>	rs4667591	0.613	0.0037	
	<i>COBL</i>	rs10230120	<i>FUZ</i>	rs2305918	3.473	0.0048	
	<i>VANGL2</i>	rs12086448	<i>DVL3</i>	rs11919795	0.548	0.0050	
	<i>DVL3</i>	rs11919795	<i>C2CD3</i>	rs11235995	0.417	0.0088	
	<i>COBL</i>	rs10230120	<i>MKKS</i>	rs17852625	5.185	0.0099	
	MMC alto	<i>CDH6</i>	rs2229575	<i>FUZ</i>	rs2305918	4.796	0.0021
		<i>PARD3</i>	rs12782862	<i>PLCB4</i>	rs6077510	2.544	0.0037
<i>FZD7</i>		rs13034579	<i>PLCB4</i>	rs6077510	0.325	0.0038	
<i>LRP2</i>		rs830994	<i>CDH6</i>	rs2287582	0.464	0.0060	
<i>C2CD3</i>		rs826058	<i>LRP6</i>	rs7978064	0.259	0.0061	
<i>CDH6</i>		rs2287582	<i>FUZ</i>	rs2305918	0.392	0.0063	
MMC bajo		<i>LRP5</i>	rs556442	<i>WNT9B</i>	rs4968281	1.528	0.0013
	<i>VANGL2</i>	rs12086448	<i>DVL3</i>	rs11919795	0.476	0.0020	
	<i>ROCK2</i>	rs978906	<i>PLCB4</i>	rs6077510	0.647	0.0023	
	<i>CC2D2A</i>	rs16892095	<i>SMO</i>	rs2228617	0.609	0.0039	
	<i>LRP5</i>	rs3736228	<i>IFT52</i>	rs2664519	1.773	0.0065	
	<i>C2CD3</i>	rs826058	<i>RPGRIP1L</i>	rs1946155	0.588	0.0078	
	<i>CELSR2</i>	rs653635	<i>COBL</i>	rs2240089	3.173	0.0081	
	<i>LRP2</i>	rs4667591	<i>BBS2</i>	rs11373	0.596	0.0085	
	<i>HNF1B</i>	rs2689	<i>IFT52</i>	rs2664519	1.619	0.0088	
	<i>CELSR2</i>	rs653635	<i>PLCB2</i>	rs2229691	3.091	0.0097	

Imagen suplementaria 1. Imágenes representativas del proceso de estandarización para las 8 sondas genotificadas por Taqman.



