

Tesis de Maestría

Variantes alélicas y riesgo de defecto de cierre del tubo neural. Estudio del polimorfismo 1298AC del gen MTHFR

Bronberg, Rubén Adrián

2002-2004

Tesis presentada para obtener el grado de Magister de la Universidad de Buenos Aires en Biología Molecular Médica de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bronberg, Rubén Adrián. (2002-2004). Variantes alélicas y riesgo de defecto de cierre del tubo neural. Estudio del polimorfismo 1298AC del gen MTHFR. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4532_Bronberg

Cita tipo Chicago:

Bronberg, Rubén Adrián. "Variantes alélicas y riesgo de defecto de cierre del tubo neural. Estudio del polimorfismo 1298AC del gen MTHFR". Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002-2004.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4532_Bronberg

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Tesina Maestría Biología Molecular Médica
Universidad de Buenos Aires

Tema:

Variantes Alélicas y Riesgo de Defecto de Cierre del Tubo Neural.
Estudio del Polimorfismo 1298A>C del gen MTHFR.

Maestrando: Rubén Adrián Bronberg

Directora: Dra. Liliana Dain

Lugar: Centro Nacional de Genética Médica.
Departamento de Diagnóstico Genético
Departamento de Genética Médica y Poblacional

Período: 2002-2004

79087

ÍNDICE:

1	Resumen	1
1.2	Abstract	2
2	Agradecimientos	3
3	Introducción	5
3.1	Aspectos Epidemiológicos	5
3.2	Expresión Clínica	7
3.3	Aspectos Embriológicos	8
3.4	Factores maternos asociados con DCTN	10
3.5	Influencia de la Ingesta de Acido Fólico y DCTN	11
3.6	Metabolismo de la Homocisteína	12
3.7	Factores Genéticos	13
3.7.1	Evidencias Genéticas en modelos animales	13
3.7.2	Genética de la via metabólica de los folatos	14
3.7.3	Gen MTHFR	15
3.7.4	Variantes Alélicas de MTHFR	15
4	Objetivos	21
5	Materiales y Métodos	23
6	Resultados	28
7	Discusión	33
8	Conclusiones y Perspectivas	41
9	Bibliografía	43
10	Apéndice	58

1-RESÚMEN:

Los defectos de cierre del tubo neural (DCTN) abarcan a una serie de entidades como la anencefalia y la espina bífida. La incidencia de los DCTN a nivel mundial es de 10-20/ 10.000 nacimientos, con una variación entre diferentes áreas geográficas. La etiología de los DCTN resultan de la interacción entre factores genéticos y ambientales, con una heredabilidad asociada del 60%.

Varios genes candidatos han sido propuestos como factores de riesgo asociados a la enfermedad. Los más estudiados se relacionan a la vía metabólica de los folatos, entre ellos el MTHFR. Se ha sugerido que la presencia del genotipo MTHFR 677 TT, confiere un mayor riesgo para el desarrollo de DCTN. Asimismo en algunos estudios, se ha observado que el estado de heterocigosis compuesta entre los polimorfismos 677T/1298C de MTHFR en la madre y/o en el afectado, aumenta el riesgo para el desarrollo de la patología.

En el presente trabajo se estudió si la variante 1298A>C en el gen MTHFR constituye un factor de riesgo para DCTN en la población argentina. Para ello se realizó el estudio de 100 afectados de DCTN no sindrómico, 95 padres, 109 madres de niños afectados por DCTN y 61 niños y 120 adultos como controles sanos no relacionados.

Los resultados obtenidos indicarían que la variante 1298A>C no está asociada a la ocurrencia de DCTN en la población analizada, ya sea en forma aislada o en heterocigosis compuesta con el polimorfismo MTHFR 677 T (estudiado en un trabajo previo). Asimismo, y en concordancia a lo hallado para otras poblaciones, no se halló en la muestra analizada la presencia de la combinación de los genotipos 677TT y 1298 CC. Ha sido sugerido que esta combinación conferiría una condición letal al embrión en desarrollo.

1.2-ABSTRACT:

The Neural Tube Defects (NTD) comprise a group of different clinical entities as a result of a deficiency in neurulation in the fetus before 28 days of embryologic development. They are due a destructive process follow for cellular growth and anomaly differentiation being anencephaly, encephalocele and spina bifida the most frequent. The incidence of any type of worldwide NTD is 10-20/10.000 newborn, with variation between geographic area.

NTD in humans are considered as multifactorial diseases, with an associated heredability about 60 %.

Several candidate genes have been suggested as genetic risk factors for NTD, such as those related to the folate pathway. Several studies have showed that homozygosity for MTHFR 677TT determines an increase risk to develop NTD. Moreover, some studies have showed that a compound heterozygote genotype MTHFR 677T/1298C in the mother and/or in the affected child is associated to an increased NTD risk.

Our objective was to evaluate mutation MTHFR 1298A>C as a genetic risk factor for NTD in the Argentine population.

We have studied 100 non-syndromic NTD patients, 95 fathers and 109 mothers of NTD affected children and 61 children and 120 adult as non related healthy controls.

Our results show no association between MTHFR 1298A>C genetic variant and NTD development. No association was found when this variant was analyzed in compound heterozygosity with the polymorphism MTHFR677T. Moreover in accordance to previous studies, the combination of the 677TT and 1298CC genotypes has not been found in the sample analyzed. Presence of these compound genotypes have been suggested to confer a lethal condition to the growing embryo.

2-AGRADECIMIENTOS:

A Diana, mi esposa; Melissa y Jimena, mis hijas; por compartir y consentirme durante el curso de la maestría.

A Liliana Dain y Noemi Buzzalino, por sus enseñanzas, paciencia y aceptación durante el desarrollo de la presente tesina.

A Liliana Alba y Pablo Barbero, por su sostén, compromiso y colaboración para que la tesina se desarrolle.

A Rosa Liascovich, por su apoyo en los análisis estadísticos

A Laboratorio Dominguez, por su colaboración.

A Docentes, y compañeros de la maestría por la experiencia vivida durante estos años.

"En Memoria de mi Padre"

Introducción

•

3-INTRODUCCIÓN:

Los Defectos del cierre del Tubo Neural (DCTN) son definidos como un conjunto de malformaciones congénitas estructurales que afectan el cerebro y la médula espinal, comprometiendo a estructuras que rodean al sistema nervioso en desarrollo, incluyendo al tejido conectivo y componentes esqueléticos.

Su etiología precisa no es conocida, pero se sugiere que tanto factores genéticos como ambientales estarían implicados [Finnell y col, 2003]. La influencia genética se evidencia por el hecho que el riesgo de recurrencia en familias con afectados previos es superior al riesgo poblacional, estimándose en alrededor de un 4% [Harper, 1998].

Por su parte, es sabido que diferentes factores ambientales, dietarios y teratogénicos constituyen factores de riesgo para el desarrollo de DCTN. [Botto y col, 1999], habiéndose hallado que la suplementación periconcepcional con ácido fólico disminuye el riesgo de recurrencia y ocurrencia de DCTN [Czeizel y Dudas, 1992; Castilla y col, 2003; Lopez Camelo y col, 2005].

3.1-Aspectos Epidemiológicos:

Los defectos de cierre de tubo neural (DCTN) se encuentran entre las malformaciones humanas más frecuentes y agrupan a una serie de entidades, entre las cuales se hallan la anencefalia, la espina bífida y el encefalocele.

La incidencia de anencefalia es de 2-6/10000 nacimientos en los países más industrializados, si bien las frecuencias más altas se han observado en Japón, Irlanda del Norte y México. Por su parte, se estima que la incidencia de espina bífida (en ausencia de anencefalia) es de 3-6/10.000, siendo alta en México e Irlanda del Norte. En promedio, la incidencia de DCTN es a nivel mundial es de 10-20/10.000 nacimientos, siendo menor en los Estados Unidos, y alcanzando un valor mayor en México con 37/10.000 nacimientos [International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems ICBOMS, 1991].

En nuestro país la incidencia de DCTN ha sido estimada en 6.9/10.000 para anencefalia, 1.9/10.000 para encefalocele y 7.5 /10.000 para espina bífida [Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas ECLAMC, 1996].

Las variaciones en las incidencias en los distintos países podría estar relacionada a una diferente predisposición genética, al estado de salud y nutrición materna, a la frecuencia por la cual estudios prenatales resultan en un aborto electivo, o bien a la exposición a teratógenos que inducen DCTN, entre otros. De hecho, se ha observado que la prevalencia de los DCTN decrece desde una frecuencia del 2,5 %

en embriones en estadio 12 (aproximadamente 26 días postovulatorios), al 0,6% o menos al término del embarazo [Shiota y col, 1991]. De esta manera, la mayoría de las concepciones con DCTN abortan espontáneamente, probablemente antes del final del período embrionario.

En la tabla 1 se muestran algunas de las Incidencias promedio halladas para DCTN en diferentes países.

Tabla 1: Incidencia promedio de distintos tipos de DCTN cada 10000 nacimientos publicadas por Programas de Monitoreo de Malformaciones en el mundo durante el periodo 1974-1988*

País	Anencefalia	Espina Bífida abierta	Encefalocele
Argentina ¹	6.9	7.5	1.9
Australia	4.9	7.0	1.5
Canadá	5.0	9.2	1.6
Francia (este y centro)	0.8	3.5	0.6
Rep. Checa	2.8	4.0	0.6
Dinamarca	1.4	3.8	0.6
Inglaterra-Gales	5.2	9.9	1.3
Finlandia	1.9	1.8	0.3
Hungría	5.7	9.1	1.6
Israel	4.2	4.8	0.8
Italia	2.4	3.8	1.0
Japón	9.2	2.8	1.2
México	18.4	15.9	3.2
Nueva Zelanda	4.2	9.3	0.7
Irlanda del Norte	11.5	17.5	1.6
Noruega	3.6	5.1	0.7
China (Sichuan)	6.3	3.7	2.7
Sudamérica	5.3	6.5	1.7
España	3.9	4.5	0.9
Suecia	2.0	5.1	0.8
Estados Unidos	3.4	5.0	1.2

*Fuente: ICBDMs (1991)

¹ Fuente: ECLAMC

3.2-Expresión Clínica:

La *Anencefalia* es una malformación letal debida a un cierre defectuoso en el extremo superior o rostral del tubo neural. La malformación comprende la ausencia del cráneo y ambos hemisferios cerebrales que pueden estar representados por un remanente de tejido. Puede diferenciarse entre *Holoanencefalia* y *Meroanencefalia* si la ausencia del cerebro es completa o parcial, respectivamente. Si bien los nervios ópticos están ausentes, los ojos son prominentes y están sorprendentemente bien formados. El cerebelo se halla usualmente ausente y el tallo cerebral puede ser hipoplásico. Si falla también el cierre del tubo neural inferior, la medula espinal puede estar ausente o dividida (cráneoraquisquisis). Los niños anencefálicos pueden nacer vivos, tener reflejos primitivos y sobrevivir por algunos días.

El *Encefalocele* comprende la herniación del tejido cerebral y/o de las meninges a partir de un defecto óseo en el cráneo, comúnmente en la región occipital, si bien puede presentarse en las regiones frontal, parietal o basal. El tejido neural dentro de un encefalocele está cubierto por piel o una fina membrana. Usualmente contiene una cavidad llena de fluido en comunicación con los ventrículos cerebrales y aproximadamente la mitad de los casos están asociados con hidrocefalia. Los encefalocelos posteriores son los más frecuentes y son principalmente debidos a defectos de etiología genética, mientras que los encefalocelos anteriores (esfenoidales o frontoetmoidales) son más comunes en el sudeste asiático y están más relacionados con trastornos de la inducción ventral.

El *Meningocele* y el *Mielomeningocele* comprenden lesiones que resultan del cierre defectuoso del tubo neural en la columna vertebral. Hay un defecto óseo en el arco neural, pero en el meningocele sólo las meninges son incorporadas dentro de la piel adyacente, mientras que para el mielomeningocele también se incorpora el tejido de la médula espinal. Cuando el ectodermo adyacente se ha roto y la médula espinal está expuesta (una lesión abierta), el término *mielocele* es usado aún cuando puede adquirirse una membrana y simular el mielomeningocele. El punto clínico importante es que los pacientes con meningocele recubierto de piel (una lesión cerrada) pueden no presentar déficit neurológico, mientras que siempre hay compromiso neurológico cuando el tejido neural está expuesto.

La *esпина bífida oculta* o el *disrafismo espinal oculto* comprende una unión del cono de la médula espinal a una estructura vecina con fallas de cierre de dos o más arcos vertebrales, frecuentemente en asociación con signos neurológicos anormales y marcadores cutáneos o subcutáneos tales como un mechón de pelo, un hemangioma o un lipoma. Esta lesión es parte del espectro de los DCTN y tiene

algunas implicaciones genéticas [Carter, 1975]. A veces, sin embargo, el término *espina bífida oculta* es usado para describir la osificación incompleta de la lamina vertebral incidental. Esta lesión posterior no tiene consecuencias clínicas, no es de causa genética y es una variante normal en niños menores de 2 años, con una ocurrencia de aproximadamente el 20 % en adultos [Emery, 1986].

Figura 1. Fotografía de un recién nacido fallecido con un Defecto de Cierre del Tubo neural. Se observa ausencia de calota, y tejido meníngeo por encima de la cara. (Fotografía tomada de Gorlin Robert y col, "Syndromes of the head and neck", Fourth edition, 2004).



3.3-Aspectos Embriológicos:

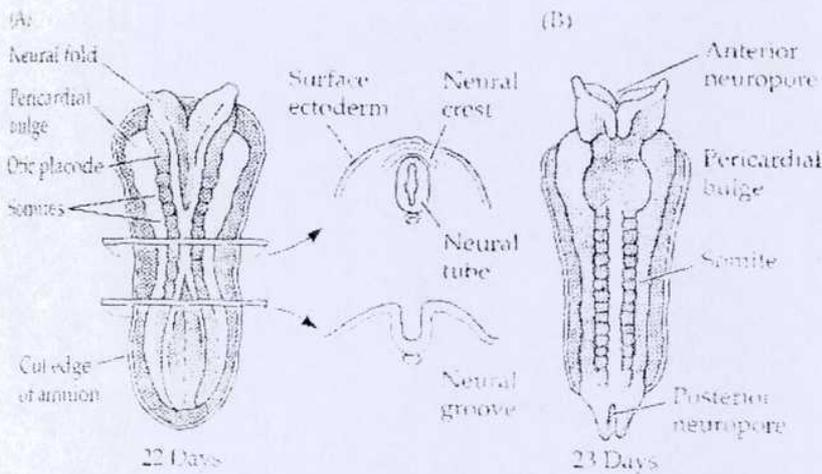
La formación del Tubo Neural se produce por un proceso embrionario llamado neurulación primaria y comienza con la formación y plegamiento de la placa neural en el día 18 y finaliza con el cierre del tubo neural en el día 28 postovulatorio. Posteriormente la porción rostral del tubo neural se desarrolla en cerebro y la porción caudal en cuerda espinal.

A nivel tisular, la neurulación ocurre en cuatro etapas: formación de la placa neural, modelado, arqueado y cierre del tubo neural.

El tubo neural se cierra a medida que los pliegues neurales se aparean y se unen en la línea media dorsal. Los pliegues se adhieren unos a otros y las células de ambos emergen. En algunas especies, las células en esta unión forman las células de la cresta neural. En mamíferos, las células craneales de la cresta neural (las cuales forman estructuras del cuello y faciales) migran, mientras los pliegues neurales se elevan antes del cierre del tubo neural. Por otro lado, en la región de la médula espinal, las células de la cresta neural no migran hasta el momento del cierre del tubo.

La formación del tubo neural no ocurre simultáneamente en todo el ectodermo. Asimismo, la regionalización del tubo neural ocurre como resultado de cambios en la forma del mismo. Los dos extremos abiertos del tubo neural son llamados *neuroporo anterior* y *neuroporo posterior*. El tubo neural forma un cilindro cerrado que se separa de la superficie del ectodermo. Se piensa que esta separación es mediada por la expresión de diferentes moléculas de adhesión. En una etapa inicial las células que formarán el tubo neural expresan E-Caderina, seguida por la síntesis de N-Caderinas y moléculas de adhesión de células neurales (N-CAM) [Gilbert y col, 1997]

Figura 2. Neurulación en embriones humanos. (A) Secciones dorsal y transversal de un embrión humano de 22 días. Tanto el neuroporo anterior como el posterior están abiertos al fluido amniótico. (B) Vista dorsal de un embrión humano un día después. El neuroporo anterior está cerrado mientras el posterior permanece abierto. (Tomado de Gilbert, 1997)

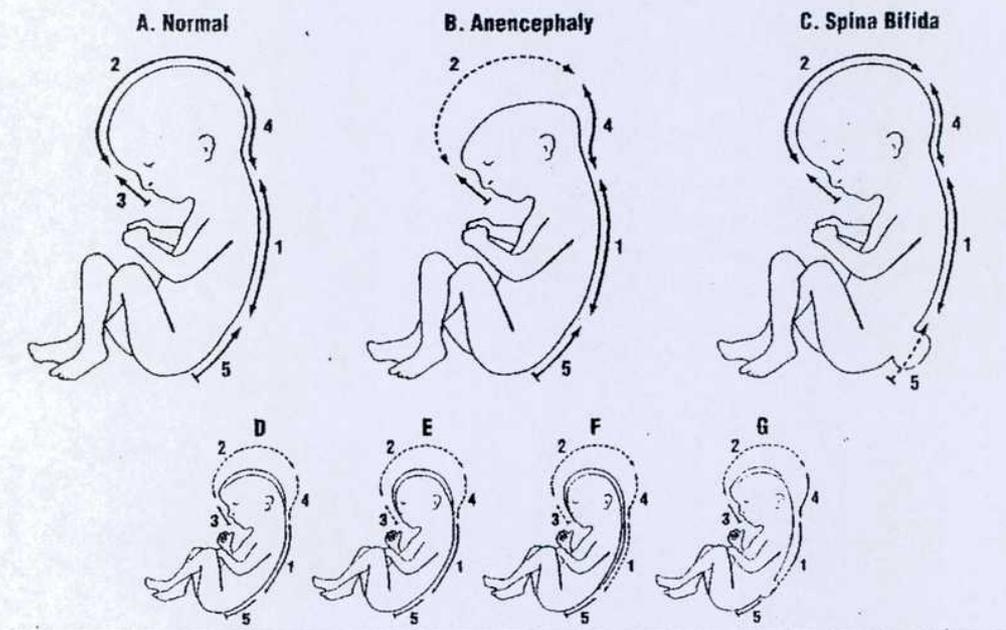


Existe una controversia acerca de la forma en que se cierra el tubo neural en humanos. En la versión clásica se postula que lo hace de una forma bidireccional en el estadio 11 (día 24) hacia los neuroporos anterior y posterior a partir de un único punto de contacto en la región cervical del embrión. Este modelo se conoce como modelo de sitio único de cierre. [Harmen y Prickett, 1942; Graves, 1945; Hamburger y Hamilton, 1951; Edwards, 1968; Davignon y col., 1980]. De esta forma, se postula que la mayoría de los DCTN resultan de una falla primaria del cierre del tubo neural, siendo la reapertura secundaria una causa menos frecuente. [Gardner, 1973; Campbell y col., 1986].

Esta versión clásica fue cuestionada en base a las diferencias observadas tanto en las frecuencias de los diferentes DCTN así como en el riesgo de recurrencia de los mismos [Van Allen y col, 1993]. Para explicar los defectos más comunes, el modelo

clásico requiere asumir que "lesiones salteadas" o áreas focales de reapertura son más frecuentes en la patogénesis que la falla de cierre. En contraposición al modelo de sitio único, Van Allen y col postularon que el tubo neural se cierra a partir de 5 sitios diferentes de contacto (*modelo multisitio*), también en forma bidireccional. De acuerdo a este modelo, los diferentes DCTN corresponderían a fallas de cierre en las diferentes regiones propuestas.

Figura 3. Resultados de cierres completos e incompletos para los cinco puntos de cierre propuestos por Van Allen y col. Las flechas sólidas denotan cierres exitosos y las punteadas representan cierres incompletos. (A) Condición Normal; (B) Anencefalia (merocrania), falla en el punto 2; (C) Espina bífida abierta, falla en el punto 5. La porción caudal del punto 1 también puede estar involucrada. (D) Holocrania, falla en los puntos 2 y 4. (E) Faciocraniosquisis. Falla en los puntos 3, 2 y 4. (F) Faciocranioraquisquisis. Falla en los puntos 3, 2, 4 y 1; (G) Anencefalia con espina bífida, falla en el punto 2 y la porción caudal del punto 1. (Tomado de De Sesso y col, 1999. Modificado de Van Allen y col, 1993)



3.4- Factores maternos asociados con DCTN:

Se ha sugerido la existencia de varios factores maternos durante el embarazo asociados con un riesgo aumentado para el desarrollo de DCTN, si bien los más aceptados son el tratamiento con anticonvulsivantes [Lammer y col, 1987], la diabetes mellitus tipo I [Bererra y col, 1990] y la hipertermia [Edwards, 1995; Moretti y col, 2005].

Entre los anticonvulsivantes más utilizados se halla el ácido valproico. La exposición materna a este anticonvulsivante resulta en un aumento del riesgo para DCTN entre el 1 y el 5 % [Bjerkendal y col, 1982; Lindhout y col, 1986; Nau, 1994].

En los últimos años, y gracias a la posibilidad de búsqueda de genes candidatos utilizando microarreglos del ADN se ha empezado a determinar algunos genes que podrían estar implicados en el desarrollo de DCTN inducidos por ácido valproico, varios de los cuales están relacionados con el proceso de neurulación, o con la remodelación de cromatina [Kultima y col, 2004].

Si bien la terapia con Carbamazepina, otro anticonvulsivante, estaría también asociada con un riesgo mayor al 1 % para DCTN [Rosa y col, 1991], los estudios realizados acerca del potencial teratogénico de la misma son limitados [Matalon y col, 2002] y los mecanismos de acción teratogénica son aún desconocidos.

Asimismo, se ha podido determinar que la tasa de malformaciones congénitas está incrementada de dos a tres veces en la descendencia de madres con diabetes mellitus insulina dependiente [Elwood y col, 1992]. En este caso se considera que el riesgo para DCTN es aproximadamente del 1%, si bien el riesgo individual para cada mujer estaría relacionado con la calidad de su control de la diabetes [Garner, 1995]. Recientemente, se ha podido establecer en un modelo animal de diabetes, que la hiperglucemia materna produce un aumento del stress oxidativo, provocando una regulación anormal de determinados genes que conducirían al desarrollo de defectos del tubo neural durante la embriogénesis [Loeken, 2005].

Asimismo, estudios experimentales en ratones [Finnel y col, 1986] y estudios retrospectivos realizados en humanos [Warkany, 1986], muestran una relación causal entre la hipertermia materna y los DCTN. Varios estudios del tipo caso-control indican que la fiebre alta, baños de agua caliente y baños saunas estarían asociados con un riesgo para DCTN de aproximadamente el doble que el poblacional [Milunsky y col, 1992]. Un reciente meta-análisis en el cual se incluyeron 1719 casos y 37898 controles, confirma que el riesgo de desarrollar DCTN asociados a hipertermia materna se encuentra incrementado [Moretti y col, 2005].

3.5- Influencia de la Ingesta de Acido Fólico y DCTN:

Se ha demostrado que la administración de ácido fólico previene la mayor parte de los DCTN [MCR Vitamin study research group, 1991; Czeizel, Dudas, 1992]. La suplementación con ácido fólico durante el período periconcepcional, confiere un efecto protector que oscila entre un 50 y un 70% [Castilla y col, 2003; López Camelo y col, 2005].

El hallazgo de niveles elevados de homocisteína y disminuidos de vitamina B₁₂ en sangre en mujeres embarazadas de fetos afectados por DCTN [Steegers-Theunissen y col, 1994; Mills y col, 1995], así como el hecho de que se ha

observado un aumento de los niveles de homocisteína plasmática en niños afectados por DCTN que no se relaciona con un déficit de ácido fólico en la dieta [Van der Put y col, 1997a; Bjorke-Monsen y col, 1997], ha llevado a sugerir que defectos en la vía metabólica de la conversión/degradación de homocisteína/metionina dependiente de folatos tendrían un rol importante en la etiología de esta condición [Mills y col, 1995; Fodinger y col, 1999].

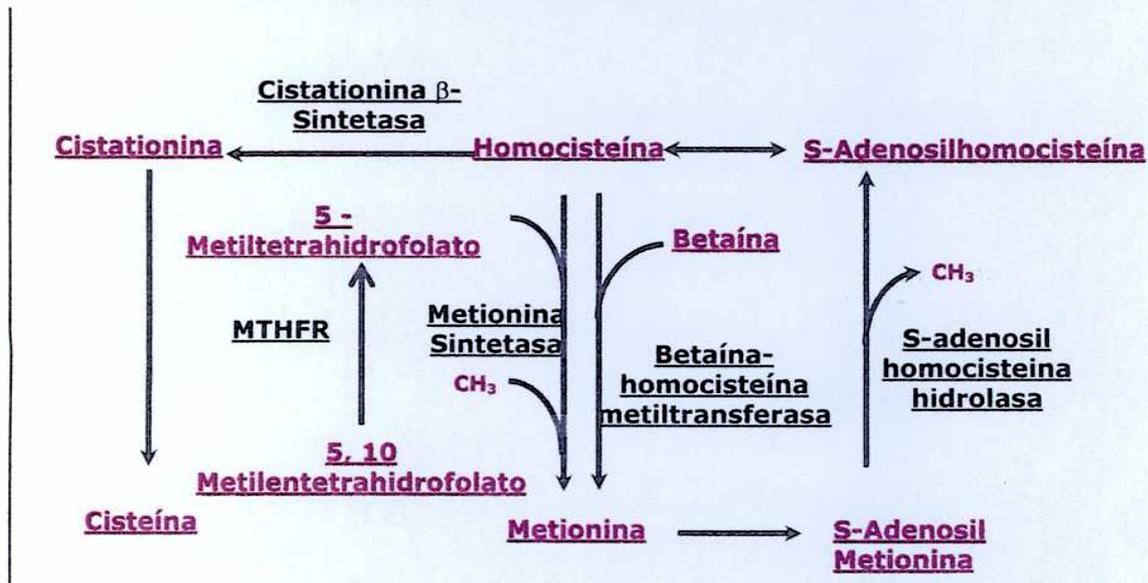
En la última década, la hiperhomocisteinemia moderada ha sido reconocida como un nuevo factor de riesgo para arteriosclerosis y trombosis, con un valor comparable a factores de riesgo clásicos como la hipercolesterolemia. Aproximadamente del 10 al 20 % de la población tiene niveles elevados de homocisteína que se asocian con un riesgo aumentado dos o tres veces para la obstrucción de vasos sanguíneos arteriales o venosos. Sin embargo, las complicaciones tempranas del embarazo, como los abortos espontáneos recurrentes y los DCTN parecen estar relacionados a fallas en el metabolismo de la homocisteína, pero no son causados por vasculopatías debidas a problemas en este metabolismo [Castro y col, 2006].

Por otro lado, el ácido fólico es un factor protector de otros defectos congénitos [Canfield y col, 2005]. Estas observaciones estarían apoyando el concepto que el efecto protector del ácido fólico no sería totalmente específico para DCTN. Asimismo, es sabido que el folato es un componente fundamental durante la expansión temporal proliferativa del embrión [Anthony y Hanson, 2000], siendo la neurulación uno de los eventos de mayor sensibilidad a las interrupciones en los procesos de proliferación y diferenciación celular. Por lo tanto, una explicación posible es que el ácido fólico estabilice los procesos de morfogénesis embrionaria, aumentando la probabilidad de que la neurulación se complete exitosamente [Colas y Schoenwolf, 2001].

3.6-Metabolismo de la Homocisteína:

El folato en la forma 5-metilo, participa en la transferencia de un único carbono utilizado en la síntesis de nucleótidos a partir de S-adenosilmetionina, la remetilación de homocisteína a metionina, y la metilación de ADN, proteínas, neurotransmisores y fosfolípidos. La actividad de la enzima MTHFR ayuda a mantener el pool de folatos circulantes, así como de metionina y previene el incremento de homocisteína. En la figura 4 se sintetizan los diferentes pasos de esta vía.

Figura 4. Vía Metabólica de la homocisteína/metionina



3.7-Factores Genéticos:

Se ha observado que los DCTN tienen etiología variada y la mayoría ocurren sin una historia familiar anterior. Sin embargo, varias observaciones hacen pensar en influencias genéticas. Primero, la probabilidad de que un feto o un niño sea afectado por DCTN está aumentada con respecto a los valores poblacionales si existen antecedentes familiares. Asimismo, el riesgo de DCTN es mayor en ciertas poblaciones en las cuales las parejas consanguíneas son frecuentes y finalmente en poblaciones de baja prevalencia, el riesgo para DCTN entre parientes es más alto que el riesgo poblacional. Estas observaciones se ajustan al modelo de enfermedad multifactorial, el cual propone que la malformación resulta de la interacción entre factores genéticos y ambientales que afectarían el desarrollo normal del tubo neural [Carter, 1976]. Se estima que la heredabilidad asociada es alrededor del 60 % [Emery, 1986].

3.7.1-Evidencias genéticas en modelos animales:

Existe una gran cantidad de modelos animales con defectos del tubo neural, aunque sólo un número muy bajo de ellos presentan similitud con los DCTN en humanos [Finnell y col, 2002; Harris y Juriloff, 2007]. En muchos de ellos se ha podido identificar el o los genes causantes de la patología. Este es el caso del mutante *Splotch* [Epstein y col, 1991] en el cual se ha identificado al gen *pax3* como factor etiológico. Mutaciones en su homólogo en humanos *PAX 3*, causan el síndrome de Waardenburg [Baldwin y col, 1992]. Si bien algunos de los casos clínicos pueden

presentar un DCTN como característica asociada, no se ha hallado que defectos en este gen estén mayoritariamente asociados con los DCTN aislados no sindrómicos, tanto familiares [Chatkupt y col, 1995] como esporádicos [Trembath y col, 1999].

Otro ejemplo lo constituye la existencia de un 16 % de embriones de ratones deficientes en p53 que exhiben exencefalia, entidad equivalente a la anencefalia humana [Sah y col, 1995].

En todos los casos de modelos de DCTN de etiología genética en ratones, se ha observado la presencia de un número variable de fetos afectados. Este hecho indicaría que la penetrancia de cada uno de ellos es diferente y que la aparición de la patología depende, al menos parcialmente, del acervo genético, consistente con la existencia de influencias de otros genes en los *loci* principales [Copp, 1993]. En concordancia con lo expuesto, Helwig y colaboradores (1995) han observado que ratones doble mutantes *Patch / ondulado* tienen un fenotipo similar a la espina bífida oculta. Este fenotipo no se observa en ratones que poseen una sola de las mutaciones.

Otros estudios en ratones presentan como posibles genes candidatos para DCTN a los genes codificantes para el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRA) [Payne y col, 1997; Zhang X, 1998], el receptor de efrina A5 una molécula de adhesión celular [Holmberg y col, 2000], y los factores de transcripción *T (Brachyury)* [Wilson y col, 1993, Rashbass y col, 1994] y *Zic3* [Klootwijk y col, 2000; Purandare y col, 2002].

Otro ejemplo interesante es el modelo de ratón homocigota mutado para el gen *Car-t 1*, un gen que contiene un homeobox. Estos ratones nacen vivos con acrania y meroanencefalia pero mueren poco después del nacimiento. Notablemente, el tratamiento prenatal de las hembras preñadas con ácido fólico suprime en un 87 % el desarrollo de ratones nacidos con este fenotipo [Zhao y col, 1996].

3.7.2-Genética de la vía metabólica de los folatos:

Se han estudiado muchos genes candidatos para DCTN en humanos, si bien sólo en poco de ellos se ha podido demostrar una asociación positiva con el desarrollo de la patología [Boyles y col, 2005]. Dada la etiología multifactorial de los DCTN, la identificación de genes susceptibles es dificultosa. Diversos estudios han focalizado su atención en el estudio de diferentes polimorfismos genéticos en *loci* de la vía metabólica de la homocisteína/metionina [Botto y Yang, 2000]. La tabla 2 resume algunos de los genes estudiados.

Tabla 2: Genes candidatos de vía metabólica de los folatos

Gen	Locus	Pollimorfismos	Primeros estudios
5,10 metileno- tetrahidrofolato reductasa (MTHFR)	1p36.3	677C>T; 1298A>C	[Van der Put, 1995, 1998]
Cistationina beta sintetasa (CBS)	21 q22.3	844ins64pb	[Ramsbottom, 1997]
Metionina Sintetasa (MS)	1q43	2756A>G	[Morrison, 1998]
Receptor alfa de los folatos (FR alfa)	11q13.3	Haplotipos H1 y H2	[Trembath, 1999]
Metionina sintetasa reductasa (MTRR)	5p15.2	66A>G	[Wilson, 1999]
Transportador de Folatos (RFC)	21q22.3	80A>G	[De Marco, 2000]
Serina Hidroximetil Transferasa (SHMT)	17p11.2	1420C>T	[Hell, 2001]

3.7.3- Gen MTHFR:

El gen 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) mapea en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36.3), posee 11 exones, y se transcribe dando un ARN mensajero mayoritario de 2.2 kilobases. El producto es una proteína catalíticamente activa de 77 kilodalton (kDa) que cataliza la conversión de 5,10 a 5-metiltetrahidrofolato (forma mayoritaria de folatos circulante). Existe asimismo una isoforma proteica más pequeña de 70 kDa [Goyette y col, 1998].

3.7.4-Variantes Alélicas de MTHFR:

La variante más común de la MTHFR es una mutación puntual que convierte una citosina en una timina en la posición 677 en el exón 4, produciendo una sustitución de una alanina por valina en la proteína. Este cambio produce una enzima con actividad reducida a 37°C, comunmente llamada variante termolábil. Se presume que esta sustitución afectaría el dominio catalítico de la proteína. La actividad enzimática en los individuos homocigotas (TT) es del 50 al 60% menor a 37°C, y 65% menor a 46°C. En los individuos heterocigotas, la actividad se halla en rangos intermedios. Los homocigotas tienen un leve aumento de la homocisteinemia si la ingesta de folatos es insuficiente, pero normales si la ingesta de folatos es adecuada [Frosst y col, 1995].

La prevalencia de la variante 677C>T tiene variaciones étnicas y regionales, con una alta frecuencia en Italia e hispanos de California, y baja en Afroamericanos y

en áreas de Africa Subsahariana [Stevenson y col, 1997; Pepe y col, 1998; Schneider y col, 1998].

En Europa la frecuencia de homocigocidad TT es del 18% en Italia [Sacchi y col, 1997], 13% en Gran Bretaña y 8% en Alemania [Botto y Yang, 2000]. Por su parte, se observó una frecuencia de 14% en poblaciones caucásicas en USA y Canadá, mientras que para los hispanos, se observó homocigocidad en un 21% en California, y 25% en Colombia [Shaw y col, 1998; Camacho y col, 1998]. En Africa Subsahariana no se identificaron individuos homocigotas 677TT, si bien la frecuencia del alelo fue estimada en un 7% [Schneider y col, 1998]. En Afroamericanos se observó un 2% de homocigocidad [Giles y col, 1998; McAndrew y col, 1996]. En Japón la frecuencia de homocigotas fue estimada en un 11% [Nishio y col, 1996], y 21% en un grupo Amerindio del Brasil [Schneider y col, 1998].

De los estudios del tipo caso-control realizados en algunas poblaciones analizando la variante 677C>T, se ha podido establecer que el genotipo homocigota 677TT aumenta al doble el riesgo de ocurrencia de DCTN [Botto y Yang, 2000]. Se postula que el mecanismo involucrado sería un mayor requerimiento de folatos del embrión en desarrollo. La presencia del genotipo homocigota 677TT conjuntamente en la madre y en el embrión, aumentaría el riesgo de ocurrencia en alrededor de seis veces [Christensen y col, 1999].

Por otro lado, existe otra variante, 1298A>C en el exón 7, que produce una sustitución de glutámico por alanina. Si bien la actividad de la proteína se encuentra disminuida [Van der Put y col, 1998], esta disminución es menor que en el caso de la sustitución 677C>T. Se presume que en este caso estaría afectado el dominio regulatorio de la proteína [Fodinger y col, 1999], si bien no se ha observado que los individuos homocigotas 1298CC presenten niveles de homocisteinemia aumentados. Los compuestos heterocigotas 1298AC/677CT, por su parte, tienen un perfil bioquímico similar al de los homocigotas 677TT [Botto y Yang, 2000].

Diversos autores han sugerido un aumento del riesgo para DCTN para la presencia del alelo 1298A>C en estado de heterocigota compuesto con el alelo 677 C>T [Van der Put y col, 1998; Dekou y col, 2001]. Por su parte no se ha descrito la presencia del genotipo 1298AC en asociación con el genotipo 677TT, ni tampoco la presencia del genotipo 1298CC con los genotipos 677CT y 677TT, por lo cual se ha sugerido que estas combinaciones de genotipos podría ser letal para el embrión [Van der Put y col, 1998]. Otra observación de importancia es que los compuestos

heterocigotas 1298C/677T) se observan solo en *trans*, siendo cada alelo heredado a partir de un progenitor [Van der Put y col, 1998].

Un resumen de los estudios publicados en la literatura para estos dos polimorfismos del gen MTHFR y el riesgo de desarrollo de DCTN, se muestran en la tabla 3 [modificada de Boyles y col, 2005].

Tabla 3: Estudios de Riesgo de los genotipos C677T y A1298C del gen MTHFR

Autores	Población	Muestra	Diagnósticos incluidos	Genotipo	Conclusión
Van der Put y col (1995)	Alemanes	55 casos y controles	DCTN	677C>T	La mutación 677C>T es un factor de riesgo genético.
Morrison y col (1998)	Alemanes y Británicos	79 casos y sus familiares	Espina bífida, espina bífida oculta, yencefalocele	677C>T	No hubo diferencias significativas
Shields y col (1999)	Irlandeses	271 casos y 218 familiares	DCTN (mielomeningocele anencefalia, encefalocele)	677C>T	El alelo T incrementa el riesgo en casos y un moderado riesgo adicional es conferido al genotipo materno TT.
Stegmann y col (1999)	Alemanes	148 casos, 174 controles, 77 padres, 110 madres	Espina bífida no sindrómica (más 8 anencefalías y 2 encefaloceles)	677C>T 1298A>C	No hubo evidencia de asociación
Trembath y col (1999)	Americanos Mediooeste (96% Caucásicos)	128 familias Iowa 35 Minesota, 9 Nebraska	DCTN (mielomeningocele anencefalia, encefalocele).	677C>T	Evidencia de un incremento del riesgo en casos no asociados con mielomeningoceles.
Christensen (1999)	Canadienses (75% Ingleses o Franceses)	56 casos, 62 madres de casos, 97 controles niños, 90 madres controles	DCTN mielomeningocele anencefalia, encefalocele)	677C>T	Incremento del riesgo de DCTN asociados con el polimorfismo 677C>T
De Marco y col (2002)	Italianos	203 casos, 98 madres, 67 padres de casos, y 210 controles	Mielomeningocele, menIngocele	1298A>C	Evidencia de incremento del riesgo cuando pacientes o sus madres tienen el alelo C, o bien los padres son genotipo CC
Johanning y col (2002)	84% Caucásicos, 16% Afro-americanos	77 caso y 77 controles	DCTN (mielomeningocele anencefalia, encefalocele)	677C>T	Incremento del riesgo
Cunha y col (2002)	Brasileros	25 casos con madres, 75 controles	DCTN (mielomeningocele anencefalia, encefalocele)	677C>T 1298A>C	No hubo diferencias entre casos y controles

Tabla 3: Continuación

Autor	Población	Muestra	Diagnósticos incluidos	Genotipo	Conclusión
Gonzalez-Herrera y col (2002)	Hispanicos (area del Yucatan)	65 casos, 60 madres y 110 controles	Espina bífida	677C>T	No hubo evidencia de asociación
Rampersaud y col (2003)	Americanos caucásicos	175 casos y sus familiares, 195 controles	Mielomeningocele	677C>T	Evidencia para Incremento del riesgo
Pietrzyk y col (2003)	Polacos	104 casos, 106 madres de casos y 100 controles adultos	Espina bífida no sindrómica aislada	677C> T	Incremento del riesgo asociado con 677C>T en casos y madres homocigotas
Gutierrez-Revilla y col (2003)	Espanoles	27 casos, 28 madres, 23 hermanos, y 159 controles	DCTN	677C>T 1298A>C	No hubo diferencia significativa
Boduroglu y col (2005)	Turcos	95 casos , 80 madres, 72 padres y 93 controles	DCTN	677C>T 1298A>C	No hay una asociación significativa

Si bien la asociación entre distintas variantes genéticas y el riesgo de desarrollo de DCTN está muy estudiada en poblaciones de Europa y América del Norte, los estudios en poblaciones latinoamericanas son escasos [Martinez y col, 2001; Dávalos y col, 2000; Cunha y col, 2002; Perez y col, 2003; Nitsche y col, 2003; Felix y col 2004].

A pesar que la incidencia de estas patologías ha sido estimada para nuestra población (Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas, ECLAMC) [Castilla y col, 1996], no se cuenta con información acerca de los factores genéticos que estarían relacionados con estas patologías. Es por ello que nuestro grupo de trabajo ha iniciado una línea de investigación para determinar aquellos genes de riesgo asociados a la ocurrencia de DCTN en nuestra población, con el objeto no sólo de colaborar en el entendimiento de los procesos involucrados en la patofisiología de estas enfermedades, sino con la posibilidad de identificar grupos poblacionales de riesgo y contribuir en la aplicación de políticas de salud destinadas a la prevención primaria de estas patologías. Resultados preliminares estarían indicando que la variante 677TT de MTHFR constituiría un factor de riesgo.

Sin embargo una inserción de 68pb en CBS, no constituye un factor de riesgo, aún en combinación con la variante T de MTHFR [Buzzalino y col, 2002].

Objetivos

4-OBJETIVOS DEL TRABAJO:

General:

Determinar factores genéticos asociados a la predisposición a desarrollar DCTN en la población de Argentina.

Específicos:

1. -Estimar si la mutación 1298A>C en el gen MTHFR constituye un factor de riesgo para DCTN en nuestra población.
2. -Estimar si la combinación de las mutaciones MTHFR 1298A>C y MTHFR 677C>T constituyen un factor de riesgo para DCTN en nuestra población.

Materiales y
Métodos

5-MATERIALES Y MÉTODOS:

5.1-Muestra:

- a. Propósitos: individuos con DCTN aislados, no sindrómicos. Se analizaron muestras de sangre de 100 afectados: 90 espinas bífidas, 7 anencefalias y 3 encefalocelos.
- b. Progenitores de los propósitos: Se analizaron muestras de sangre provenientes de 95 padres y 109 madres de niños afectados por DCTN.
- c. Controles: Se analizaron muestras de sangre de niños y adultos aparentemente sanos, sin antecedentes de DCTN en la familia y que habiendo tenido descendencia los mismos no sean afectados con DCTN. Se cuenta con muestras de sangre de 61 niños y 120 adultos provenientes de los mismos centros de atención.

Los pacientes fueron atendidos en el Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez", la Maternidad "Ramón Sardá" y el Centro Nacional de Genética Médica por un genetista de cada uno de los centros.

La participación de la familia fue voluntaria y los individuos fueron informados por los médicos participantes de los alcances y limitaciones del estudio. En todos los casos se obtuvo un consentimiento firmado.

El estudio ha sido aprobado por el comité de ética del Centro Nacional de Genética Médica.

5.2-Técnicas de laboratorio utilizadas

A - Extracción de ADN:

Se realizó a partir de linfocitos de sangre periférica mediante la técnica de extracción salina (ver apéndice). Brevemente, a partir de 5 ml de sangre se realiza una lisis celular con SDS y Proteína K. Luego de una precipitación con NaCl saturado, el ADN es aislado mediante precipitación con Etanol absoluto. La concentración y pureza del mismo se realiza mediante medición espectrofotométrica a 260/280 nm.

B - PCR para el fragmento conteniendo al polimorfismo 1298A>C:

Alrededor de 100 ng de ADN fueron utilizados para amplificar la región de interés por PCR (Polimerase Chain Reaction) utilizando cebadores (primers) específicos. Los primers y condiciones de la reacción se detallan a continuación:

Primer sense 5'- CTT TGG GGA GCT GAA CTA CTA C -3'

Primer Antisense 5'- CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG -3'

Reactivos: Volumen final de 50 μ l

Reactivo	cc Inicial	Volumen/tubo	cc Final
H ₂ O		36.8 μ l	
Buffer	10X	5 μ l	1X
MgCl ₂	25mM	3 μ l	1.5mM
DMSO	100%	2.5 μ l	2.5%
dNTPs	25mM	0.4 μ l	200 μ M
Primer Sense	50 μ M	0.5 μ l	0.5 μ M
Primer Antisense	50 μ M	0.5 μ l	0.5 μ M
Taq Polimerasa	5U/ml	0.3 μ l	1.5U
ADN		1 μ l	

Condiciones de ciclado:

-1 Ciclo de iniciación a 94°C por 1min 30seg

-30 ciclos a 94°C 40seg,

55°C 30seg

72°C 1min

- 1 ciclo de elongación final a 72°C por 7min

Fragmento de Amplificación: 164 pb.

c - Corrida en geles de agarosa al 1%

Para un volumen final de 70ml

TAE 1% -----70ml

Azarosa -----0.7gr

Bromuro de Etidio (10 mg/ml) -----3 μ l

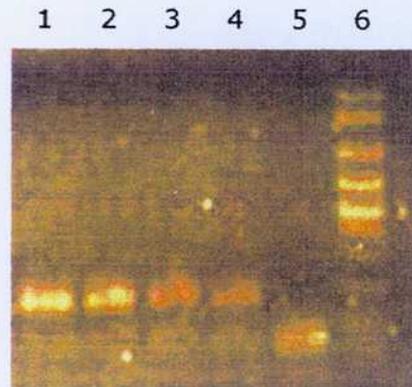
Luego de la gelificación

Siembra de 7 μ l (muestra 5 μ l + Buffer de siembra 2 μ l)

3 μ l de Marcador de Peso Molecular de 50pb + Buffer de siembra 2 μ l

Corrida a 100 V, durante 30 min.

Figura 5. Fotografía de corrida en el gel de agarosa, observada en transiluminador de luz UV, de fragmentos del producto de amplificación de una serie de muestras de ADN (calles 1-4), control sin ADN (calle 5) y marcador de PM de 50pb (calle 6).



D - Digestión con la Endonucleasa de restricción Mbo II

Alrededor de 5 μ l del fragmento de amplificación de 164 pb fue digerido con la enzima MboII. La misma digiere al alelo A generando un fragmento de 56pb, y otros de 31, 30, y 28pb. Por su parte para el alelo C se obtienen fragmentos de 84, 32 y 30 pb. El producto de la digestión es visualizado por una corrida electroforética en geles de poliacrilamida 20% y teñidos con plata. Se detallan a continuación las condiciones de digestión y de la tinción con nitrato de plata.

Corte con Mbo II

Para un volumen final de 20 μ l

H₂O-----14 μ l

Enzima (MboII) 5U/ μ l-----1 μ l

Buffer 10X-----2 μ l

ADN-----3 μ l

Incubación a 37° a 16 horas.

E - Corrida en Poliacrilamida al 20%

Para un volumen de gel de de 5ml.

H₂O-----1.5ml

Acrilamida-Bisacrilamida 29:1-----2.5ml

TBE 5X-----1ml

PSA 10%-----40 μ l

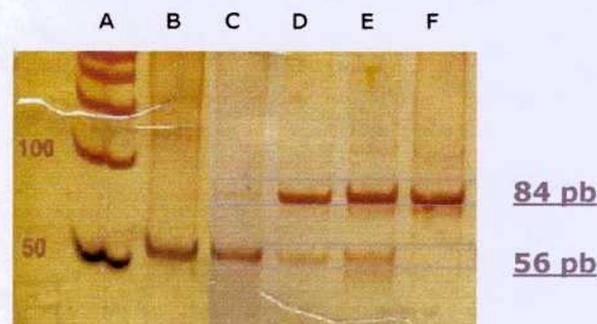
TEMED-----6 μ l

Corrida: 15 mA/gel, 90 Min

F - Tinción con Nitrato de Plata

- 1-Fijación con ETOH 10% durante 10 minutos
- 2-Oxidación con HNO₃ al 1% (1.54V/V) durante 3 minutos
- 3-Lavado con H₂O destilada por 30 segundos en dos oportunidades
- 4-Tinción con AgNO₃ (2.02g/l) por mas de 20 minutos
- 5- Lavado con H₂O destilada por 30 segundos en dos oportunidades
- 6-Revelado con Na₂CO₃ (29.6g/l) + Formaldehido (54 µl/100ml)
- 7-Frenado con AcOH al 10% por mas de 5 minutos.

Figura 7. Fotografía de la corrida electroforética en gel de poliacrilamida al 20% (A: Marcador de PM de 50pb, B y C: Homocigotas AA, D y E: Heterocigotas AC, F: Homocigota CC)

**5.3-Análisis estadístico:**

Se calculó el riesgo asociado de las distintas variantes genéticas estudiadas (OR) con un intervalo de confianza del 95%, utilizando el paquete estadístico del EPIINFO 6 [versión 6.4, OMS]. Se consideró significativo un OR cuyo intervalo de confianza no contuviera al 1. Las interacciones entre diferentes variantes alélicas fueron analizadas por regresión logística mediante la utilización del paquete estadístico SPSS.

Para estimar diferencias estadísticas entre diferentes haplotipos entre casos y controles, se utilizó el test de χ^2 , así como para comparar frecuencias genotípicas entre distintos grupos de controles. Para estimar si las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W), se utilizó el test de χ^2 de bondad de ajuste.

El tamaño muestral utilizado, de 100 afectados y de alrededor de 200 controles, se calculó del trabajo previo sobre la variante 677C>T; para el presente trabajo sobre la variante 1298A>C, se continuó trabajando con ese tamaño muestral. El poder de la prueba con la muestra en estudio es del 60%, teniendo en cuenta que la frecuencia estimada para la variante C en controles de nuestra población fue de 0.2 y considerando un posible OR de 2.

Resultados

6-RESULTADOS:

La tabla 4 muestra la distribución de los alelo A y C y los diferentes genotipos de MTHFR 1298 en afectados, padres de afectados y en controles.

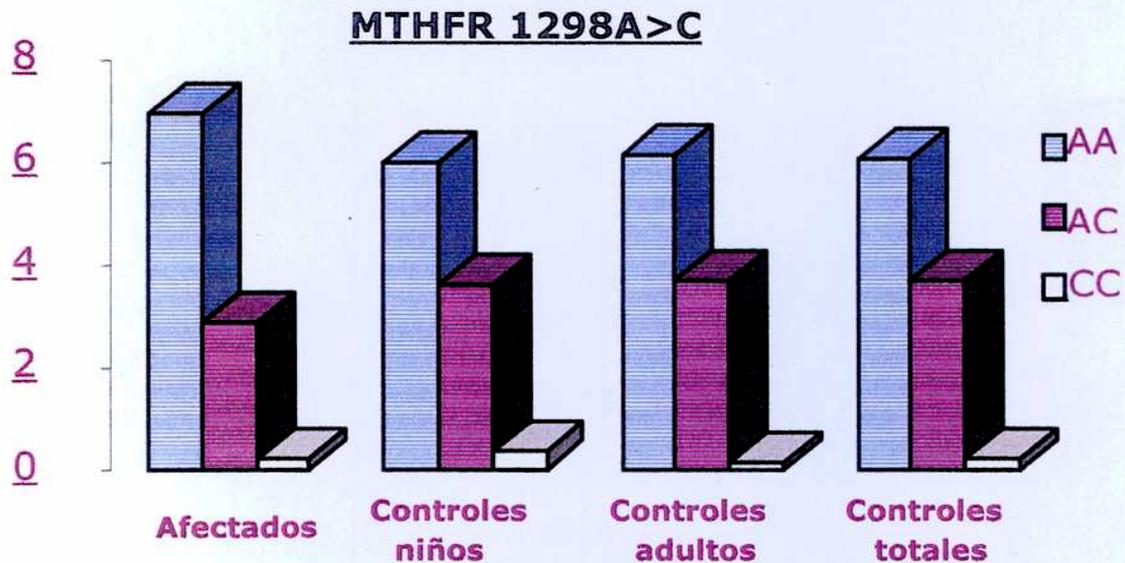
Tabla 4: Distribución alélica y genotípica de los alelos de MTHFR 1298A>C

Alelo	Casos %	Madres %	Padres %	Controles %
1298 A	84	82	81	80
1298 C	16	18	19	20

Genotipo	Casos % (n)	Madres % (n)	Padres % (n)	Controles % (n)
A/A	69.4(68)	69.3(72)	62.8(59)	61.6(109)
A/C	28.6(28)	25.9(27)	36.1(34)	36.2(64)
C/C	2.0(2)	4.8(5)	1.1(1)	2.2(4)

En la figura 8 se muestra la distribución de los diferentes genotipos entre casos y controles niños y adultos.

Figura 8. Gráfico de las frecuencias genotípicas en afectados, y controles niños, adultos y totales.



Según se observa en la tabla 5 la distribución de las frecuencias genotípicas de MTHFR 1298 se ajustó al equilibrio de H-W tanto en casos como en controles.

Tabla 5: Estimación del número de individuos esperados de acuerdo a H-W y su comparación con lo observado en la muestra estudiada.

Casos: (n)

	AA	AC	CC
Observadas	68	28	2
Esperado (H-W)	69.58	26.46	1.96
			<i>p>0.05</i>

Controles: (n)

	AA	AC	CC
Observadas	109	64	4
Esperado (H-W)	113	56	7
			<i>p>0.05</i>

Con el objeto de estimar si el polimorfismo estudiado se asocia con la ocurrencia de la enfermedad, se utilizó el cálculo de Odds Ratio (OR) como estimador del riesgo relativo (RR). Para los sucesivos cálculos fueron considerados los individuos controles en su totalidad dado que no se hallaron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas entre controles adultos y niños ($X^2=0.03$; $p=0.869$). Considerando a la variante C como factor de riesgo, no se halló que los genotipos AC+CC estén asociado a un incremento en el riesgo a desarrollar DCTN (tabla 6).

Tabla 6: Estimación del Riesgo del MTHFR 1298A>C, considerando a la variante C como factor de riesgo.

AC+CC vs. AA	Odds Ratio (95% IC)
<i>Pacientes vs. Controles</i>	1.54 (0.85-2.46)
<i>Madres de afectados vs. Controles</i>	0.70 (0.41-1.16)
<i>Padres de afectados vs. Controles</i>	0.92 (0.55-1.55)
<i>Madres y Padres vs. Controles</i>	0.82 (0.53-1.25)

A los efectos de analizar si esta variante podría contribuir a incrementar el riesgo previamente hallado para la variante MTHFR 677TT, se realizó un análisis de interacción por regresión logística. La distribución de los genotipos compuestos de MTHFR 677C>T y de MTHFR 1298 A>C se muestran en las tablas 7.1 y 7.2. Como se observa, no se evidenció la presencia de los genotipos 677TT y TC en combinación con el genotipo 1298CC.

Tabla 7: Distribución de los genotipos de 677C>T y de 1298A>C en la población estudiada

Tabla 7.1 Casos n=98

677 \ 1298	A/A (n)	A/C (n)	C/C (n)
C/C	14.2% (14)	14.2% (14)	2% (2)
C/T	30.6% (30)	13.2% (13)	-
T/T	24.5% (24)	1% (1)	-

Tabla 7.2 Controles n=173

677 \ 1298	A/A (n)	A/C (n)	C/C (n)
C/C	20.2% (35)	17.3% (30)	2.3% (4)
C/T	29.5% (51)	19% (33)	-
T/T	11% (19)	0.6% (1)	-

Los resultados de la regresión logística muestran que la presencia de los genotipos MTHFR 1298 AC+CC no modifican significativamente el riesgo previamente hallado para la variante en 677 (Tabla 8).

Tabla 8: Análisis de regresión logística

Genotipos	Odds Ratio (95% IC)
MTHFR 677TT	2.56 (1.48-5.06) ¹
MTHFR 677TT * MTHFR 1298CC+AC	2.67(1.37-5.18)

¹ Datos de trabajo previo (Buzzalino y col., 2002).

Asimismo, no se halló que la presencia el genotipo compuestos heterocigota MTHFR 677CT/1298AC se asocie a un riesgo aumentado de desarrollar DCTN: OR $_{CT/AC}$ vs. $_{CC/AA}$ = 1.17; IC 95%= 0.44-3.11

Por su parte se calculó la distribución fraccional de cada haplotipo combinado de MTHFR 677C>T y de MTHFR 1298A>C en los individuos controles y en los pacientes (tabla 9.1 y 9.2)

Tabla 9.1: Distribución fraccional para los haplotipos combinados 677C>T y 1298A>C en casos (n=196)

677/1298	Distribución fraccional (n)
C/A	0.367 (72)
C/C	0.158 (31)
T/A	0.469 (92)
T/C	0.005 (1)

Tabla 9.2: controles (n=346)

677/1298	Distribución fraccional (n)
C/A	0.436 (151)
C/C	0.205 (71)
T/A	0.355 (123)
T/C	0.003 (1)

Al comparar casos y controles, se observa una diferencia estadísticamente significativa en la distribución de los mismos ($\chi^2 = 6.8$, $p=0.03$). Sin embargo, esta diferencia se explicaría debido a un exceso del alelo 677T entre los afectados.

Se debe considerar que la metodología utilizada no permite distinguir cuál es la fase de ambos polimorfismos en el caso de compuestos heterocigotos CT/AC (si es CC-TA o CA-TC). Sin embargo y teniendo en cuenta que la combinación 677T-1298C se halló en un sólo individuo control y en un paciente, se consideró que la probabilidad *a priori* de encontrar un alelo con dicha asociación en los compuestos heterocigotos CT/AC sería aproximadamente 0.0035.

Discusión

7-DISCUSIÓN:

Los primeros datos históricos de DCTN se remontan a 10.000 años atrás en el que se ha evidenciado por restos arqueológicos la existencia de espina bífida [Feremback, 1963]. Las primeras descripciones médicas de DCTN fueron hacia el siglo 17, y la asociación de espina bífida e hidrocefalia fue comunicada por primera vez en el año 1769. Los esfuerzos para proteger el saco herniado comenzaron en el siglo 19, y el conocimiento de que las infecciones y la hidrocefalia podrían implicar complicaciones letales, se realizaron recién hacia el comienzo del siglo 20. Hacia 1930 se recomendó un cierre quirúrgico temprano del saco para la prevención de infecciones.

La historia natural y las complicaciones de los DCTN dependen ampliamente de la severidad del defecto primario y de la naturaleza de algún defecto asociado. Los DCTN pueden ser letales, en el caso de una anencefalia, ya sea en forma aislada o en asociación con otros defectos, como en el caso de una trisomía 13. Por otro lado los DCTN pueden ser leves y tener un impacto limitado. Es así que alrededor del 90% de los recién nacidos que reciben un tratamiento quirúrgico temprano a raíz de una lesión en el cordón espinal, sobreviven y llegan a la vida adulta [Shurtleff, 1986].

En algunos casos de niños con DCTN se verifica la presencia de problemas de aprendizaje que pueden estar asociados a trastornos en la atención, en la memoria, secuenciamiento y razonamiento. Las problemáticas sociales y conductuales, están más acentuadas en la adolescencia. Los problemas en la alimentación y crecimiento conllevan a internaciones frecuentes durante la infancia, así como también es frecuente la disfunción oculomotora (estrabismo) y oromotora (disfagia), escoliosis, dislocación de la cadera, deformidad en los pies y osteoporosis. La disfunción de la vejiga, con incontinencia e infecciones urinarias, suele ocurrir en la totalidad de los afectados. La hidrocefalia, el retraso en las pautas madurativas motoras y las parálisis en los miembros inferiores son las principales manifestaciones neurológicas [Rubin y Crocker, 1989].

Las técnicas diagnósticas han favorecido el diagnóstico de DCTN durante el embarazo. Actualmente, el nivel de Alfa Feto Proteína (AFP) en el suero materno es usado en la población general como pesquisa y detecta entre un 75 a 80% de los fetos afectados por DCTN [Johnson y col, 1990]. Por otro lado, la ecografía fetal puede detectar la mayoría de los DCTN. [Nadel y col, 1990]. Si bien el diagnóstico prenatal provee un adecuado asesoramiento, acceso a la información y apoyo a los padres, así como planificar un parto seguro en un centro que pueda proveer una

respuesta inmediata a las necesidades médicas del recién nacido, es necesario un equipo de promoción de la salud multidisciplinario y de cuidados preventivos de un niño con un DCTN, con la coordinación de importantes servicios médicos y quirúrgicos, así como centros de educación y apoyo de asociaciones de padres, que desarrollen un plan de tratamiento y seguimiento acorde a cada individuo afectado [Sarwark, 1996].

Desde el punto de vista su etiología, los DCTN son reconocidos por tener una causa compleja, en el que están implicados factores ambientales y genéticos. Se ha sugerido la existencia de varios factores maternos durante el embarazo asociados con un riesgo aumentado para el desarrollo de DCTN, si bien los más aceptados son el tratamiento con anticonvulsivantes [Bjerkendal y Goujard, 1982; Lammer y col, 1987], la diabetes mellitus tipo I [Bererra y col, 1990] y la hipertermia [Edwards, 1995; Moretti y col, 2005]. Asimismo es sabido que una ingesta adecuada de ácido fólico durante el período periconcepcional, confiere un efecto protector que oscila entre un 50 y un 70% [De Marco y col, 2000; Castilla y col, 2003; Lopez Camelo y col, 2005].

Los genes candidatos estudiados como posibles de estar implicados en el desarrollo DCTN, provienen de tres tipos de evidencia: genes implicados en modelos de ratón, candidatos posicionales y genes de la vía metabólica del metabolismo de los folatos.

Los estudios realizados en modelos animales, ya sean mutantes espontáneos o knockouts para genes específicos, han implicado a más de 190 genes candidatos [Harris y Juriloff, 2007]. Varios genes candidatos de modelos de ratón han sido estudiados en poblaciones humanas. El locus T, es el homólogo humano del gen *Brachyury* en el ratón, es vital para el desarrollo axial y la formación del mesodermo posterior [Rashbass y col, 1994]. A pesar que un estudio propone que este gen participaría en un 6%-18% de la incidencia de DCTN [Morrison y col, 1998], otros estudios no han hallado evidencia alguna de ser un locus mayor en los DCTN humanos [Trembath y col, 1999; Speer y col, 2002]. Otro ejemplo lo constituye el "ratón *Spotch*" que posee una mutación en homocigosis en el gen *Pax3* y desarrolla ratones con defectos de cierre del tubo neural [Goulding y col, 1991; Machado y col, 2001]. Sin embargo, no se han encontrado evidencias que este gen pudiera estar implicado en un riesgo mayor de DCTN en humanos [Trembath y col, 1999; Speer y col, 2002].

Por otro lado, algunos genes candidatos se propusieron a raíz de anomalías cromosómicas asociadas a DCTN, como por ejemplo las trisomías 13 y 18 [Boyles y col, 2005]. La delección del brazo largo del cromosoma 13 se asocia a un síndrome

caracterizado por anencefalia y encefalocele. En la región 13q32 mapea el gen del factor de transcripción ZIC2 cuyo homólogo en ratón está implicado en defectos del tubo neural [Nagai y col, 2000]. Sin embargo no se halló, una vez más, que este gen esté implicado con los DCTN en humanos [Brown y col, 2002].

Se han propuesto otros genes candidatos relacionados con distintas vías metabólicas y/o mecanismos de formación del tubo neural. Existirían evidencias recientes que sustentan el rol de las moléculas de adhesión neural 1 (NCAM1) en la etiología de DCTN [Boyles y col, 2005]. Por su parte, en un estudio caso-control en una población de California, polimorfismos en la Uncoupling Protein 2 (UCP2), proteína que interviene en el metabolismo energético, se asociaron a un incremento en el riesgo en el desarrollo de DCTN [Volcik y col, 2003]. Asimismo, un estudio en la población del sur de Italia muestra asociación para polimorfismos en el gen de la enzima transcobalamina que metaboliza la Vitamina B [Gueant-Rodriguez y col, 2003], si bien otro estudio hecho en la población alemana no mostró asociación con la ocurrencia de DCTN [Afman y col., 2002].

No obstante todo lo dicho precedentemente, y sin tener aún dilucidado por completo el mecanismo, existe mucha evidencia que la incidencia de DCTN en niños cuyas madres reciben ácido fólico en el período periconcepcional se encuentra disminuida [MRC Vitamin Study Research Group, 1991; Milunsky y col, 1992]. La suplementación materna de folatos puede prevenir del 50 al 70% de los DCTN [American Academy of Pediatrics, Committee on Genetics, 1999]. El folato es esencial para la síntesis de ADN, la división celular y el crecimiento tisular. Asimismo es necesario para la metilación del ADN, proceso importante tanto en la expresión génica como en la estructura cromatínica. Por otro lado, se ha demostrado que el ácido fólico disminuye la incidencia de DCTN inducidos por fenitoina en embriones de pollos en desarrollo [Guney y col, 2003]. Estas observaciones cobran relevancia si se tiene en cuenta que en humanos se ha demostrado la existencia de un riesgo aumentado de DCTN asociado a la exposición a drogas antiepilépticas [Ornoy, 2006].

Los niveles de folatos séricos tienen un fuerte componente genético con una heredabilidad estimada del 46 % [Mitchell y col, 1997]. La deficiencia de folatos contribuye a la etiología multifactorial de DCTN, y genes en esta vía metabólica han sido la base para algunos estudios de posibles genes candidatos asociados a la enfermedad (ver la tabla 2).

Si bien las enzimas relacionadas con la vía metabólica de los folatos están fuertemente implicadas en los DCTN, los numerosos genes candidatos y la amplia diferencia en las frecuencias alélicas observadas en diferentes poblaciones y grupos

étnicos, sugiere que no hay un único factor genético implicado en los DCTN [Botto y Yang, 2000].

La variante 677C>T del gen MTHFR se asoció originalmente con un riesgo aumentado para el desarrollo de DCTN. Identificada inicialmente para enfermedades vasculares, esta variante alélica produce una isoforma termolábil de MTHFR. La MTHFR reduce 5,10-methilentetrahidrofolato a 5-methilentetrahidrofolato (la forma predominante de folatos circulantes), que actúa como donante de metilos en la remetilación de homocisteína a metionina [Frosst y col, 1995]. La baja actividad de MTHFR entonces, estaría asociada con bajos niveles de folatos séricos y altos niveles de homocisteinemia. En un estudio caso-control realizado en 55 pacientes alemanes, se halló mayor incidencia de la mutación 677C>T en pacientes y padres de DCTN que en controles [Van der Put y col, 1995]. Un trabajo posterior realizado en 218 familias Irlandesas confirmó este hallazgo y también se encontró un modesto riesgo adicional asociado al genotipo materno 677TT [Shields y col, 1999]. Estos resultados podrían estar indicando un modelo biológico de MTHFR relacionado a la patogénesis de DCTN, en el cual un nivel subóptimo de folato materno provocaría un estado de estrés bioquímico en el feto en desarrollo [Shields, 1999; Botto y Yang, 2000]. Se ha propuesto que este genotipo estaría contribuyendo en la etiopatología de entre un 11% y un 19% de los DCTN [Ou y col, 1996].

Sin embargo otros estudios en diferentes poblaciones no han encontrado evidencia de asociación entre DCTN y variantes alélicas de MTHFR [Rampersaud y col, 2003]. Las discrepancias observadas podrían estar relacionadas con variables poblacionales específicas, ya sea por diferencias étnicas o factores ambientales. De hecho, en algunas áreas como Irlanda, Inglaterra, México, así como en algunas regiones en China, se observa una alta prevalencia de DCTN que podrían explicarse principalmente debido a una ingesta inadecuada de ácido fólico, a las condiciones físicas del ambiente (disponibilidad de nutrientes), las condiciones socio económicas de la población (pobreza y edad) y a los hábitos personales de salud de la población (asesoramiento y suplementación vitamínica) [Slattery y Janerich, 1991]. Todas estas observaciones han conducido a la necesidad de realizar estudios genéticos-moleculares para cada población en particular con el propósito de determinar los factores de riesgo que se asocian con estas patologías. En este sentido, estudios preliminares de nuestro laboratorio del tipo caso-control, estarían indicando que el genotipo 677TT de MTHFR es un factor de riesgo para nuestra población [Buzalino y col, 2002].

Por su parte, la variante de MTHFR 1298A>C produce una disminución mucho menor de la actividad proteica que la variante 677C>T, pero se ha sugerido que los compuestos heterocigotos (MTHFR 677CT-1298AC) producen un perfil similar a la variante proteica termolábil [Van der Put y col, 1998]. Uno de los primeros estudios demuestra un aumento del riesgo para DCTN por la presencia del alelo 1298A>C en estado de heterocigota compuesto con el alelo 677 C>T [Van der Put y col, 1998]. Al igual que para la variante 677 de MTHFR, no existen hasta el presente estudios que relacionen la posible influencia del polimorfismo en 1298 en el desarrollo de DCTN en nuestra población.

En este trabajo nos propusimos estudiar la asociación entre el polimorfismo 1298A>C del gen MTHFR y el riesgo de desarrollo de DCTN en una muestra de afectados de la Argentina.

Las frecuencias del alelo C de MTHR 1298 muestran una variación a nivel mundial, similar a lo que fuera comunicado para el alelo 677T de MTHFR. Nuestros resultados estarían indicando una frecuencia de 0.20 para alelo C en individuos controles de nuestra población, siendo el nuestro, el primer trabajo en comunicar esta estimación. La prevalencia del alelo C fue estimada en 0.33 en una muestra de una población alemana [Van der Put y col, 1998], 0.25 en una muestra de la población italiana y canadiense [Weinsberg y col, 1998], 0.28 en una muestra de Judios Ashkenazis [Rady y col, 1999] y 0.48 en una muestra de la población de Miao en China [Xiao y col, 2005].

En este estudio, el polimorfismo del gen de la MTHFR 1298A>C no se asoció a un riesgo aumentado de DCTN. Estos resultados, si bien se contraponen a otros realizados en diferentes poblaciones, en su mayor parte europeas (alemanes, irlandeses, italianos, canadienses, americanos caucásicos, polacos), están en concordancia con los obtenidos para algunas poblaciones hispanas, así como en amerindios, asiáticos y africanos subsaharianos [Botto y Yang, 2000].

Sin embargo, no se puede descartar que, dado que el poder de la prueba no alcanzó el valor del 80%, los resultados obtenidos en nuestro estudio puedan variar con la incorporación de más afectados y controles. Asimismo, no se halló que la variante 1298C aumente el riesgo observado para el genotipo MTHFR 677TT, ni que el genotipo compuesto heterocigota 677CT-1298AC se asocie a un riesgo aumentado de ocurrencia de la patología. Estos resultados son coincidentes con lo observado en otros estudios [Stegmann y col, 1999; Cunha y col, 2002; Gutierrez-Revilla y col, 2003; Boduroglu y col, 2005], y difieren con otros que sugieren una posible interacción entre ambas variantes [Van der Put y col, 1998]. Nuevamente, la presencia de variables poblacionales específicas o bien el número de individuos estudiados en cada caso podrían explicar las discrepancias observadas.

En un meta-análisis realizado a partir de 5389 individuos de diferentes poblaciones [Ogino y col, 2003] estiman las frecuencias de los haplotipos de las variantes de MTHFR 677 y 1298 en la población general. De acuerdo a este estudio, 20% de los individuos poseen el genotipo probable de riesgo CT-AC, 0.18% de los individuos el genotipo TT-AC, 0.14% de los individuos el genotipo CT-CC y ningún individuo el genotipo TT-CC. En nuestro grupo control de 173 individuos estudiados hallamos frecuencias similares a las mencionadas (CT-AC: 19%, TT-AC: 0.6%; TT-CC: 0), si bien no se halló ningún individuo con el genotipo CT-CC. Dada la baja frecuencia de este genotipo, se puede esperar que esta combinación no se observe en el número de individuos analizados para este trabajo. Sólo en dos estudios, uno de Canadá y otro de Inglaterra [Isotalo y col, 2000; Dekou y col, 2001], se observó una frecuencia más elevada para este genotipo que se podría explicar por un efecto fundador. Asimismo, y en concordancia con lo sugerido en la literatura [Christensen, 1999; De Marco y col, 2002; Boyles y col, 2005], no hemos hallado individuos con los genotipos compuestos 677TT-1298CC en homocigosis, sustentado la idea que esta combinación sería una condición letal para el embrión [De Marco y col, 2000]. Exceptuando a aquellas poblaciones en la que se propone un efecto fundador para los haplotipos de baja frecuencia, se ha comunicado la presencia de un solo individuo con la combinación 677TT-1298CC perteneciente a un grupo de afectados por accidente cerebro vascular en la población de Turquía [Akar y col, 2001]. Es interesante remarcar, por otro lado, que estos polimorfismos (MTHFR 677C>T, 1298A>C), han sido implicados en un mayor riesgo de abortos espontáneos recurrentes [Zetterberg, 2004; Wang y col, 2004].

Por último, analizamos las frecuencias haplotípicas y su distribución fraccional para cada uno de los polimorfismos de MTHFR. Los resultados obtenidos en nuestro estudio para individuos controles son similares a los hallados en el meta-análisis de Ogino y col [2003], en el cual se estima una frecuencia de 0.37 para el haplotipo 677C-1298A, 0.31 para 677C-1298C, 0.32 para 677T-1298A y 0.0023 para 677T-1298C. Al igual que lo observado por los autores, la mayoría de los alelos 677T y 1298C se encuentran en *cis* con los alelos 1298A y 677C, respectivamente.

Al comparar la distribución fraccional de los haplotipos entre casos y controles en nuestro estudio, hallamos que los mismos presentan una distribución estadísticamente diferente. Sin embargo, esta diferencia se puede interpretar en el contexto que hemos demostrado en estudios previos que la frecuencia del alelo T se encuentra aumentada en los afectados.

Si bien existen numerosos trabajos de asociación para el polimorfismo en 677, aquellos que relacionan la ocurrencia de DCTN con las variantes alélicas en 1298 de MTHFR son más escasos. A pesar que no se descarta la necesidad de analizar un mayor número de afectados, nuestro estudio adquiere relevancia en especial al no existir datos similares para otras poblaciones de América Latina. Asimismo, los resultados obtenidos con este estudio contribuyen con la posibilidad cercana de realizar un meta-análisis a fin de establecer si existe una asociación entre este polimorfismo y la ocurrencia de DCTN.

Finalmente, si bien algunos estudios destacan que el genotipo materno puede impactar en el embarazo incrementando el riesgo de DCTN en el embrión en desarrollo [Shields y col, 1999], en este trabajo este análisis no ha sido posible, dado el número bajo de controles madres que se disponía para el análisis.

Conclusiones y Perspectivas

8-CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS:

Conclusiones:

- La frecuencia hallada en nuestra población para el alelo C 1298 de MTHFR es de 0.20
- La distribución de los genotipos fue similar en casos, padres de casos y controles.
- La variante MTHFR 1298 C no representaría un factor de riesgo de padecer DCTN.
- No fueron hallados los genotipos MTHFR 677 TT o TC en asociación con el genotipo 1298 CC.
- La interacción de los genotipos MTHFR 677 CT y 1298 AC no parece representar, a la luz de los datos en la muestra analizada, un factor de riesgo incrementado de padecer DCTN.

Perspectivas:

Teniendo en cuenta que:

1. Los defectos de cierre del tubo neural están dentro de las malformaciones congénitas de mayor frecuencia.
2. Se han asociado determinados polimorfismos en genes de la vía metabólica de la homocisteína/metionina y la ocurrencia de DCTN sólo para algunas poblaciones.
3. No se cuenta en la actualidad con estudios de genes asociados a estas patologías en nuestra población.

Consideramos que los resultados del presente trabajo y futuras investigación contribuirían a:

- a. Un mejor entendimiento de los procesos involucrados en la etiología de los defectos de cierre de tubo neural.
- b. La caracterización genotípica de la población de Argentina.
- c. La identificación de grupos de riesgo dentro de la población de Argentina.

Bibliografía

9-BIBLIOGRAFÍA:

Afman LA, Lievers KJ, van der Put NM, Trijbels FJ, Blom HJ (2002): Single nucleotide polymorphisms in the transcobalamin gene: relationship with transcobalamin concentrations and risk for neural tube defects. *Eur J Hum Genet.* 10(7):433-8.

Akar N, Akar E, Ozel D, Deda G, Sipahi T (2001): Common mutations at the homocysteine metabolism pathway and pediatric stroke. *Thromb Res* 102:115-20.

American Academy of Pediatrics, Committee on Genetics (1999): Folic acid for the prevention of neural tube defects. *Pediatrics* 104:325-7.

Baldwin CT, Hoth CF, Amos JA, Da-Silva EO, Milunsky A (1992): An exonic mutation in the HuP2 paired domain gene causes Waardenburg's syndrome. *Nature* 355 (6361):637-8.

Bererra JE, Khoury MJ, Erickson JD (1990): Diabetes Mellitus during pregnancy and the risk for specific birth defects: a population based case-control study. *Pediatrics*; 85:1-9

Bejerkendal T, Goujard J (1982): Valproic Acid and Spina Bifida. *Lancet* 2:1096.

Bjorke-Monsen A.L., Ueland P.M., Schneede J., Vollset S.E., Refsum H. (1997): Elevated plasma homocysteine and C677T mutations of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with spina bifida. *QJM* 90:593-6.

Boduroglu K, Alanay Y, Alikasifoglu M, Aktas D, Tuncbilek E (2005): Analysis of MTHFR 1298A>C in addition to MTHFR 677C>T polymorphism as a risk factor for neural tube defects in the Turkish population. *Turk J Pediatr* 47(4):327-33.

Botto LD, Moore C, Erickson D (1999): Neural Tube Defects, *N Engl J Med* 341(20):1509-19.

Botto LD, Yang Q (2000): 5-10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 151:862-77.

Boyles AL, Hammock P, Speer MC (2005): Candidate gene analysis in human neural tube defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 135:9-23.

Brown LY, Hodge SE, Johnson WG, Guy SG, Nye JS, Brown S (2002): Possible association of NTDs with a polyhistidine tract polymorphism in the ZIC2 gene. *Am J Med Genet* 108(2):128-31.

Buzzalino N., René Cortese, Goldshmidt E., Mercado G., Liascovich R., Dain L. (2002): Estudio de variantes alélicas de los genes metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y Cistationina Beta Sintetasa (CBS) como factores de riesgo para defectos de cierre del tubo neural (DCTN). XXXI Congreso de la Sociedad Argentina de Genética, La Plata, 17-20 de septiembre 2002.

Camacho O, Giusti B, Restrepo Fernandez CM (1998): Frequency of factor V Leiden and C677T MTHFR mutations in Colombians. *Thromb Haemost* 79:883-4.

Campbell LR, Dayton DH, Sohal GS (1986): Neural tube defects: A review of human and animal studies in the etiology of neural tube defects. *Teratology* 34:171-87.

Canfield MA, Collins JJ, Botto LD, Williams LJ, y col (2005): Changes in the birth prevalence of selected birth defects after grain fortification with folic acid in the United States: findings from a multi-state population-based study. *Birth Defects Research (Part A)* 73:679-89.

Carrel T, Herman GE, Moore GE, Stanier P (2001): Lack of mutations in ZIC3 in three families with neural tube defects. *Am J Med Genet* 98:283-5.

Carter CO, Evans KA, Till K (1975): Spinal dysraphism: genetic relation to neural tube defects. *J Med Genet* 13:343-50.

Carter CO (1976): Genetics of common single malformations. *Br Med Bull* 30:158-63.

Castilla E., Orioli I., Paz J. Lopez Camelo J. (1996): Atlas Latino-Americano de Malformaciones Congénitas. Editorial Fiocruz.

Castilla E, Orioli IM, López-Camelo JS, Dutra MG, Nazer-Herrera J (2003): Preliminary data on changes in neural tube defect prevalence rates after folic acid fortification in South America. *Am J Med Genet* 123A:123-8.

Castro R, Rivera I, Blom HJ, Jakobs C, Tavares de Almeida I (2006): Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinaemia and vascular disease: an overview. *J Inherit Metab Dis*. Feb; 29(1):3-20.

Chatkupt S, Hol FA, Shugat YY, Geurds MP, Stenroos ES, Koenigsberger MR, Hamel BC, Johnson WG, Mariman EC (1995): Absences of linkage between familial neural tube defects and Pax-3 gene. *J Med Genet* 32:200-4.

Christensen B, Arbour L, Tran P, Leclerc D, Sabbaghian N, Platt R, Gilfix BM, Rosenblatt DS, Gravel RA, Forbes P, Rozen R (1999): Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Med Genet* 84(2):151-7.

Colas JF, Schoenwolf GC (2001): Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn* 221: 117-45.

Copp AJ (1993): Neural tube defects. *Trends Neurosci* 16:381-3.

Cunha AL, Hirata MH, Kim CA, Guerra-Shinohara EM, Nonoyama K, Hirata RD (2002): Metabolic effects of C677T and A1298C mutations at the MTHFR gene in Brazilian children with neural tube defects. *Clin Chim Acta* 318:139-43.

Czeizel AE, Dudas I (1992): Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptual multivitamin supplementation. *N Eng J Med* 327: 1832-5.

Dávalos IP, Olivares N, Castillo MT, Cantu JM, Ibarra B, Sandoval L, Moran A (2000): The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Ann Genet* 43:89-92.

Davignon RW, Parker RM, Hendrickx AG (1980): Staging of early embryonic brain in the baboon (*Papio cynocephalus*) and rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Anat Embryol (Berl)* 159(3):317-34.

De Marco P, Moroni A, Merello E, de Franchis R, Andreussi L, Finnel RH, Barber RC, Cama A, Capra V (2000): Folate Pathway Gene Alterations In Patients with Neural Tube Defects. *Am J Med Genet* 95:216-23.

De Marco P, Calevo MG, Moroni A, Arata L, Merello E, Finnell RH, Zhu H, Andreussi L, Cama A, Capra V (2002): Study of MTHFR and MS polymorphisms as risk factors for NTD in the Italian population. *J Hum Genet* 47(6):319-24.

De Sesso JM, Scialli AR, Holson JF (1999): Apparent Lability of Neural Tube Closure in Laboratory Animals and Humans. *Am J Med Genet* 87: 143-62.

Dekou V, Gudnason V, Hawe E, Miller GJ, Stansbie D, Humphries SE (2001): Gene-environment and gene-gene interaction in the determination of plasma homocysteine levels in healthy middle-aged men. *Throm Haemost* 85:67-74.

Edwards JA (1968): The external development of the rabbit and rat embryo. En Wollam DHM (ed) *Advances in Teratology*. Vol 3. Academic Press. New York.

Edwards MJ, Shiota K, Walsh DA, (1995): Hypertermia and birth defects. *Reprod Toxicol* 9:411-25.

Elwood MJ, Little J, Elwood H. (1992): Maternal illness and drug use in pregnancy in *Epidemiology and control of neural tube defects*. Monographs in epidemiology and estadistics. Oxford University Press: 20:414-55.

Emery A.E.H. (1986): *Methodology in Medical genetics* 2nd ed 58 Churchill Livingstone, Edinburgh.

Epstein DJ, Vekemans M, Gros P (1991): Splotch (Sp2H), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3. *Cell* 67:767-74.

Felix T.M., Leistner S., Giugliani R. (2004): Metabolic effects and the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism associated with neural tube defects in southern Brazil. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 70:459-63.

Feremback D (1963): Frequency of spina bifida occulta in prehistoric human skeletons. *Nature* 199:100.

Finnell RH, Junker WM, Wadman LK, Cabrera RM (2002): Gene expression profiling within the developing neural tube. *Neurochem Res.*27:1165-80.

Finnell RH, Gould A, Spiegelstein O. (2003): Pathobiology and genetics of neural tube defects. *Epilepsia* 44 Suppl 3:14-23.

Födinger M, Buchmayer H, Sunder-Plassmann G (1999): Molecular Genetics of Homocysteine Metabolism. *Min Electrolyte Metab* 25:269-78.

Frosst P., Blom H. J., Milos R., Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer, Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LP, Rozen R. (1995): A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in metylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10:111-3.

Gardner NJ (1973): *The Dysraphic States From Syringomyelia to Anencephaly.* Excerpta Med, p 201. Amsterdam.

Garner P (1995): Type 1 diabetes mellitus and pregnancy. *Lancet* 346:157-61.

Giles WH, Kittner SJ, Ou CY (1998): Thermolabile MTHFR polymorphism and total homocysteine concentration among African-American and White women. *Ethn Dis* 8:149-57.

Gonzalez-Herrera L, Garcia-Escalante G, Castillo-Zapata I, Canto-Herrera J, Ceballos-Quintal J, Pinto-Escalante D, Diaz-Rubio F, Del Angel RM, Orozco-Orozco L. (2002): Frequency of the thermolabile variant C677T in the MTHFR gene and lack of association with neural tube defects in the State of Yucatan, Mexico. *Clin Genet* 62(5):394-8.

Goulding MD, Chalepakis G, Deutsch U. (1991): Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J* 10:1135-1147.

Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R (1998): Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) Mammalian Genome 9:652-6.

Graves AP (1945): Development of the golden hamster, *Cricetus auratus* waterhouse during the first nine days. J Morphol 77: 219-51.

Gueant-Rodriguez RM, Rendeli C, Namour B, Venuti L, Romano A, Anello G, Bosco P, Debard R, Gerard P, Viola M, Salvaggio E, Gueant JL (2003): Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans. Neurosci Lett. 344(3):189-92.

Guney O, Canbilgen A, Konak A, Acar O. (2003): The effects of folic acid in the prevention of neural tube development defects caused by phenytoin in early chick embryos. Spine. Mar 1; 28(5):442-5.

Gutierrez Revilla JI, Perez Hernandez F, Calvo Martin MT, Tamparillas Salvador M, Gracia Romero J (2003): C677T and A1298C MTHFR polymorphisms in the etiology of neural tube defects in Spanish population. Med Clin (Barc) 120 (12):441-5.

Hamburger V, Hamilton HL (1951): A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morphol 88:49-92.

Harris MJ, Juriloff DM (2007). Mouse mutants with neural tube closure defects and their role in understanding human neural tube defects: Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 79:187-210.

Harper Peter (1998): Practical Genetic Counselling. Fifth Edition Reed Educational and Professional Publishing Ltd.

Heil SG, Van der Put NM, Waas ET, den Heijer M, Trijbels FJ, Blom HJ (2001): Is mutated serine hydroxymethyltransferase (SHMT) involved in the etiology of neural tube defects? Mol Genet Metab 73(2):164-72.

Helwig U, Imai K, Schmahl W, Thomas BE, Varnum DS, Nadeau JH, Balling R (1995): Interaction between undulated and Patch leads to an extreme form of spina bifida in double-mutant mice. Nat Genet 11:60-3.

Holmberg J, Clarke DL, Frisén J (2000): Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* 408:203-6.

ICBDMS (International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems) (1991): *Congenital Malformations worldwide*. Elsevier Science. Amsterdam.

Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG (2000): Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet* 67:986-90.

Johanning GL, Wenstrom KD, Tamura T (2002): Changes in frequencies of heterozygous thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene in fetuses with neural tube defects. *J Med Genet* 39(5):366-7.

Johnson A, Palomaki G, Haddow J (1990): Maternal serum alpha-fetoprotein level in pregnancies among black and white women with fetal open spina bifida: a United State collaborative study. *Am J Obst Gynecol* 67:1-16.

Joosten PHLJ, Toepoel M, Mariman ECM, Van Zoelen EJJ (2001): Promoter haplotype combinations of the platelet-derived growth factor receptor gene predispose to human neural tube defects. *Nat Genet* 27:215-7.

Klootwijk R, Franke B, van der Zee CE, de Boer RT, Wilms W, Hol FA, Mariman EC (2000): A deletion encompassing *Zic3* in bent tail, a mouse model for X-linked neural tube defects. *Hum Mol Genet* 9:1615-22.

Kultima K, Nystrom AM, Scholz B, Gustafson AL, Dencker L, Stigson M (2004): Valproic acid teratogenicity: a toxicogenomics approach. *Environ Health Perspect*. 112:1225-35.

Lammer EJ, Sever le, Oakley GP (1987): Teratogen Update: Valproic Acid, *Teratology* 35:4665-73.

Lindhout D, Schimdt D (1986): In-utero exposure to valproate and neural tube defects. *Lancet* 1:1392-3.

Loeken MR (2005): Current perspectives on the causes of neural tube defects resulting from diabetic pregnancy. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 135:77-87.

López-Camelo JS, Orioli IM, Dutra MG, Nazer-Herrera J, Rivera N, Ojeda ME, y col. (2005): Reduction of birth prevalence rates of neural tube defects after folic acid fortification in Chile. *Am J Med Genet* 135A:120-5.

Machado AF, Martin LJ, Collins MD. (2001): Pax3 and the splotch mutations: Structure, function, and relationship to teratogenesis, including gene-chemical interactions. *Curr Pharm Des* 7:751-785.

Matalon S, Schechtman S, Ornoy A, (2002): The Teratogenic effect of Carbamazepine: a meta-analysis of 1255 exposures, *Reprod Toxicol* 16:9-17.

Martinez de Villarreal LE, Delgado-Enciso I, Valdez-Leal R, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A, y col. (2001): Folate levels and N (5),N(10)-methylenetetrahydrofolate reductase genotype (MTHFR) in mothers of offspring with neural tube defects: a case-control study. *Arch Med Res* 32(4):277-82.

McAndrew PE, Brandt JT, Pearl DK (1996): The incidence of the gene for thermolabile MTHFR in Africans American. *Thromb Res* 83:195-8.

Mills JL, Mc Partlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, Scott JM (1995): Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural tube defects. *Lancet* 345:149-51.

Milunsky A, Ulcickas M, Rothman K, Willett W, Jick SS, Jick H (1992): Maternal heat exposure and neural tube defects. *JAMA* 268:882-5.

Mitchell LE, Duffy DL, Duffy P, Bellingham G, Martin NG (1997): Genetic effects on variation in red-blood-cell folate in adults: implications for the familial aggregation of neural tube defects. *Am J Hum Genet.*60 (2):433-8.

Moretti, ME, Bar-Oz, B, Fried, S, Koren, G (2005): Maternal Hyperthermia and the Risk for Neural Tube Defects in Offspring: Systematic Review and Meta-Analysis. *Epidemiology*16 (2):216-9.

Morrison K, Papapetrou C, Attwood J, Hol F, Lynch SA, Sampath A, Hamel B, Burn J, Sowden J, Stott D, Mariman E, Edwards YH (1996): Genetic mapping of the human homologue (T) of mouse T (Brachyury) and a search for allele association between human T and spina bifida. *Hum Mol Genet* 5:669-74.

Morrison K, Papapetrou C, Hol FA, Mariman ECM, Lynch SA, Burn J, Edwards YH (1998): Susceptibility to spina bifida: an association study of five candidate genes. *Ann Hum Genet* 62:379-96.

MRC Vitamin Study Research Group (1991): Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 338:131-7.

Nadel A, Green J, Holmes L (1990): Absence of need for amniocentesis in patients with elevated levels of maternal serum alpha-feto-protein and normal ultrasonographic examinations. *N Eng J Med* 323:557-61.

Nagai T, Aruga J, Minowa O, Sugimoto T, Ohno Y, Noda T, Mikoshiba (2000): Zic2 regulates the kinetics of neurulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(4):1618-23.

Nau H (1994): Valproic acid-induced neural tube defects. *En Neural Tube Defects.* Ciba Foundation Symposium 181, P141. Wiley, Chichester. England.

Nishio H, Lee MJ, Fujii M (1996): A common mutation in MTHFR gene among the Japanese population. *Jpn J Hum Genet* 41:247-51.

Nitsche F., Alliende M.A., Santos J.L., Perez F., Santa Maria L., Hertrampf E., Cortes F.(2003): Frequency of C677T polymorphism of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in Chilean mothers of spina bifida cases and controls. *Rev Med Chil.* 131:1399-404.

Ogino S, Wilson R (2003): Genotype and haplotype distributions of MTHFR677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. *J Hum Genet* 48(1):1-7.

Ornoy A (2006): Neuroteratogens in man: an overview with special emphasis on the teratogenicity of antiepileptic drugs in pregnancy. *Reprod Toxicol* 22(2):214-26.

Ou CY, Stevenson RF, Brown VK, Schwartz CE, Allen WP, Khoury MJ, Rozen R, Oakley GP Jr, Adams MJ Jr (1996): 5,10, methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for neural tube defect. *Am J Med Genet* 63:610-4.

Payne J, Shibasaki F, Mercola M. (1997): Spina bifida occulta in homozygous Patch mouse embryos. *Dev Dyn* 209:105–116.

Pepe G, Camacho Vanegas O, Giusti B. (1998): Heterogeneity in World distribution of termolabile C677T mutation in 5, 10 MTHFR. *Am J Hum Genet*: 78:332-5.

Perez A.B., D'Almeida V., Vergani N., de Oliveira A.C., de Lima F.T., Brunoni D. (2003): Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): incidence of mutations C677T and A1298C in Brazilian population and its correlation with plasma homocysteine levels in spina bifida. *Am J Med Genet A*. 119:20-5.

Pietrzyk JJ, Bik-Multanowski M, Sanak M, Twardowska M (2003): Polymorphisms of the 5,10-methylenetetrahydrofolate and the methionine synthase reductase genes as independent risk factors for spina bifida. *J Appl Genet* 44(1):111-3.

Purandare SM, Ware SM, Kwan KM, et al. (2002): A complex syndrome of left-right axis, central nervous system and axial skeleton defects in *Zic3* mutant mice. *Development* 129:2293–2302.

Rady PL, Tying SK, Hudnall SD, Vargas T, Kellner LH, Nitowsky H, Matalon RK (1999): Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): the incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Med Genet* 8 86(4):380-4.

Rampersaud E, Melvin EC, Siegel D, Mehlretter L, Dickerson ME, George TM, Enterline D, Nye JS, Speer MC, NTD Collaborative Group (2003): Updated investigations of the role of methylenetetrahydrofolate reductase in human neural tube defects. *Clin Genet* 63(3):210-4.

Ramsbottom D, Scott JM, Molloy A, Weir DG, Kirke PN, Mills JL, Gallagher PM, Whitehead AS (1997): Are common mutations of cystathionine β -synthase involved in the aetiology of neural tube defects? *Clin Genet* 51:39-42.

Rashbass P, Wilson V, Rosen B, Beddington R. (1994): Alterations in gene expression during mesoderm formation and axial patterning in Brachyury (T) embryos. *Int J Dev Biol. Mar*; 38(1):35-44.

Richter B, Stegmann K, Röper B, Böddeker I, Ngo ETKM, Koch MC (2001): Interaction of folate band homocysteine pathway genotypes evaluated in susceptibility to neural tube defects (NTD) in German population. *J Hum Genet* 46:105-9.

Rosa FW (1991): Spina bifida in infants of women treated with carbamazepine during pregnancies. *N Eng J Med* 324:674-7.

Rubin L, Crocker A (1989): Developmental disabilities, delivery of medical care for children and adults. Philadelphia: Lea and Febirger Eds.

Sacchi E, Tagliabue L, Duca F. (1997): High frequency of the C677T mutation in the MTHFR gene in North Italy. *Thromb Haemost* 78:963-4.

Sah VP, Attardi LD, Mulligan GJ, Williams BO, Bronson RT, Jacks T (1995): A subset of p53- embryos exhibit exencephaly. *Nature Genet* 10:175-80.

Sarwark J (1996): Spina bifida. *Ped Clin North Am* 43:1151-8.

Schneider J, Rees D, Liu Y (1998): WorldWide distribution of common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet* 62:1258-60.

Shaw GM, Rozen R, Finnell RH (1998): Maternal Vitamin use, genetics variation of infant MTHFR, and risk for spina bifida. *Am J Epidemiol* 48:30-7.

Shields DC, Kirke PN, Mills JL, Ramsbottom D, Molloy AM, Burke H, Weir DG, Scott JM, Whitehead AS (1999): The "termolabile" variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: an evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. *Am J Hum Genet* 64: 1045-55.

Shiota K (1991): Development and intrauterine fate of normal and abnormal human conceptuses. *Congenital Anom* 31:67-80.

Shurtleff D (1986): Selection process for infants. In myelodysplasias and exotrophies: Significance, prevention and treatment, ed Shurtleff, pp 89-115. Orlando, Florida: Grune and Stratton.

Slattery ML, Janerich DT (1991): The epidemiology of neural tube defects: A review of dietary intake and related factors as etiologic agents. *Am J Epidemiol* 133(6):526-40.

Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ, Seller MJ, Nevin NC, Harris R, Read AP, Fielding DW (1980): Possible prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Lancet* (8164): 339-40.

Speer MC, Melvin EC, Viles KD, Bauer KA, Rampersaud E, Drake C, George TM, Enterline DS, Mackey JF, Worley G, Gilbert JR, Nye JS, NTD Collaborative Group (2002): T locus shows no evidence for linkage disequilibrium or mutation in American Caucasian neural tube defect families. *Am J Med Genet* 110(3):215-8.

Stegers-Theunissen RPM., Boers GHJ, Trijbels FJM, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CM, Borm GF, Wouters MG, Eskes TK (1994): Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural tube defects? *Metabolism* 43:1475-80.

Stegmann K, Boecker J, Kosan Ermert A, Kunz J, Koch M (1999): Human transcription factor SLUG: mutation analysis in patients with neural tube defects (NTD) and identification of a missense mutation (D119E) in the Slug subfamily-defining region. *Mut Res Genom* 406:63-9.

Stevenson RE, Schwartz CE, Du YZ, Adams MJ Jr (1997): Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies between black and whites. *Am J Hum Genet* 60:229-30.

Tolmie J (1997): Neural Tube defects and other congenital malformations of the Central Nervous system. En Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE (eds) Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics 3rd edition Vol. II Churchill Livingstone, New York.

Trembath D, Sherbondy AL, Vandyke DC, Shaw GM, Todoroff K, Lamer EJ, Finnell RH, Marker S, Lerner G, Murria JC (1999): Analysis of select folate pathway genes, PAX3 and human T in a Miswestern neural tube defect population. *Teratology* 59:331-41.

Van Allen MI, Kalousek DK, Chernoff GF, Juriloff D, Harris M, McGillivray BC, Yong SL, Langlois S, MacLeod PM, Chitayat D, Friedman JM, Wilson RD, McFadden D, Pantzar J, Ritchie S, Hall JG (1993): Evidence for Multi-Site Closure of the Neural Tube in Humans. *Am J Med Genet* 47:723-43.

Van der Put NM, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, y col. (1995): Mutated metylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 346:1070-1.

Van der Put NM, Thomas CMG, Eskes TKAB, Trijbels FJM, Steegers-Theunissen RP, Mariman EC, De Graaf-Hess A, Smeitink JA, Blom HJ y col. (1997a): Altered folate and vitamin B12 metabolism in families with spina bifida offspring. *QJM* 90:505-10.

Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ (1998): A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects ? *Am J Hum Genet* 62: 1044-51.

Volcik KA, Shaw GM, Zhu H, Lammer EJ, Finnell RH. (2003): Risk factors for neural tube defects: associations between uncoupling protein 2 polymorphisms and spina bifida. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 67(3):158-61.

Von Reclinghausen E (1886): Untersuchgen iuber die spina bifida. *Arch Pathol Anat* 105:243.

Wang XP, Lin QD, Ma ZW, Zhao AM (2004): C677T and A1298C mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*.39(4):238-41.

Warkany J (1986): Teratogen update: hypertemia. *Teratology* 33:365-1.

Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani, Rozen R (1998): A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 64:169-72.

Whitehead AS, Gallaher P., Mills JL, Kirke PN, Burke H, Molloy AM, Weir DG, Shields DC, Scott JM. (1995): A genetic defects in 5,10 metylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. *QJM* 88:763-6.

Wilson V, Rashbass P and Beddington, R (1993): Chimeric analysis of T (Brachyury) gene function. *Development* 117: 1321–1331.

Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel RA, Rozen R. (1999): A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab* 67 (4):317-23.

Xiao Y, Shan K, Li Y, Zhao Y, Qi X, Xie Y, Wu C, Ma J, Liu H, Xu Y, Guan Z, Ren X (2005): 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in three nationalities of Guizhou in China. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* (2):219-21.

Zetterberg H (2004): Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. *Reprod Biol Endocrinol* 2(1):7.

Zhang, X Q (1998). Specific expression in mouse mesoderm and neural crest-derived tissues of a human PDGFRA promoter/lacZ transgene. *Mech. Dev.* 70, 167–180

Zhao Q, Behringer RR, de Crombrughe B (1996): Prenatal folic treatment suppresses acrania and meroanencephaly in mice mutant for the *Cart 1* homeobox gene. *Nat Genet* 13:275-83.

Apéndice

10-APÉNDICE:

Extracción de ADN de linfocitos de sangre periférica:

1. Tomar 5 ml de sangre entera extraída con EDTA 5% (anticoagulante) y centrifugar a 1000 rpm durante 10 minutos.
2. Remover la capa de glóbulos blancos con pipeta y pasarla a un tubo de 15 ml. Agregar 8 ml de buffer de lisis de glóbulos rojos (RBC). Mezclar.
3. Centrifugar 10 min a 1500 rpm.
4. Descartar el sobrenadante y si es necesario realizar un nuevo lavado con RBC hasta que se clarifique el pellet de glóbulos rojos.
5. Agregar 3ml de buffer TEN y resuspender el pellet.
6. Agregar 20 ul Proteinasa K (20 mg/ml).
7. Agregar 100 ul SDS 20 %. Mezclar
8. Incubar ON a 37°C.
9. Agregar 1 ml de NaCl 6M. Mezclar
10. Centrifugar 10 min a máxima velocidad.
11. Pasar el sobrenadante a un tubo de 15 ml y agregar 2 volúmenes de etanol 100%. Mezclar bien hasta que el ADN esté completamente precipitado.
12. Pescar el ADN con la punta de la pipeta.
13. Sumergir la pipeta en etanol 70 % (3 veces).
14. Dejar secar hasta que esté claro.
15. Resuspender en 500 ul de buffer TE o agua destilada a 37°C ON.
16. Cuantificar por espectrofotometría 260/280 nm (1 OD= 50 ug/ml).

TEN:

0,1 M NaCl

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

1 mM EDTA (pH 8,0)

TE 8:

10 mM Tris HCl (pH 8,0)

1 mM EDTA (pH 8,0)

RBC 1X: (Para preparar 1000 ml)

8,02 g NH₄Cl

1,00 g KHCO₃

0,03722 g EDTA