

EVALUACIÓN CLÍNICA, BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE UNA FAMILIA CON RECURRENCIA DE DEFECTOS DEL TUBO NEURAL.

Rebeca T. Martínez Villarreal, Augusto Rojas Martínez, José G. Sánchez Hernández, Ulises Hernández Torres, Ivan Delgado Enciso y Rocío Ortiz López
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León
E-mail: tmartinez@prounisev.uanl.mx

Introducción

Los defectos del tubo neural (DTN) son un grupo de malformaciones congénitas del cerebro y del cordón espinal. Dentro de estos defectos, los más comunes son la anencefalia y la raquisquisis. Estos defectos se producen durante los días 23 a 25 de la gestación y son debidos a fallas en el cierre del tubo neural a nivel del cerebro o del cordón espinal, respectivamente (1). Los DTN son un problema de salud pública mundial. En México, esta malformación adquiere frecuencias alarmantes. El Registro Internacional para el Monitoreo de las Malformaciones Congénitas (RIMMC) reporta que en 1994 hubo una tasa de 15.8 casos de anencefalia y 16.1 casos de espina bífida por 10,000 nacimientos registrados en este país. Estas frecuencias sólo son superadas por las reportadas para el norte de China (60/10,000 nacimientos) (2). En el estado de Nuevo León, la tasa de mortalidad por defectos congénitos en 1997 fue de 33.6 por 10,000 nacidos vivos registrados, representando la segunda causa de mortalidad después de la hipoxia neonatal. El 21% de estos decesos representaban DTN, estimándose una incidencia de 15 por 10,000 para esta malformación (3,4).



Tradicionalmente, los DTN han sido considerados como defectos de herencia multifactorial con predilección para el sexo femenino. Una vez que ha ocurrido un caso en una familia, el riesgo estimado para recurrencia de DTN está relacionado con la prevalencia geográfica y el sexo del producto malformado. El riesgo de recurrencia oscila entre 3.7%, 4.5% y 8.3% en zonas de baja, mediana y alta prevalencia, respectivamente (5). Del porcentaje de mujeres con dos hijos afectados, se ha estimado que una de cada 10 podría tener un tercer producto con DTN (6), por lo que observar familias con tres o más casos es raro.

Dentro de los factores asociados a los DTN, se ha observado que el déficit nutricional de folatos en el periodo pre-concepcional y el polimorfismo 677T del gen de la enzima *N5,N10*-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (7) están asociados con mayor riesgo de DTN en los productos. Estos dos factores, extrínseco e intrínseco, tienen en común su participación en la biosíntesis de metionina a partir de homocisteína. Se ha determinado la reducción de la incidencia de esta patología en la madres tratadas preconcepcionalmente con folatos (8,9). Algunos polimorfismos genéticos para MTHFR han sido asociados con los DTN. La enzima MTHFR cataliza la reducción del cofactor *N5,N10*-metilentetrahidrofolato a *N5*-metiltetrahidrofolato, la principal forma de folato circulante y donadora de carbonos para la conversión de homocisteína en metionina (Figura 1). Los polimorfismos se deben a mutaciones en el gen de la enzima MTHFR (677C-T y 1298 A-C) que sustituyen alanina por valina y glutamina por alanina, respectivamente. La mutación ocasiona aumento de la termolabilidad y decremento de la actividad enzimática, con un subsecuente aumento de la homocisteína en sangre (10,11), la cual ha demostrado tener efectos embriotóxicos en pollo (12) y ratón (13). La frecuencia de la mutación 677T en la población mexicana, cercana al 50%, es una de las más altas del mundo (14).

Se presenta el estudio clínico, bioquímico y molecular de una familia con recurrencia de tres productos con DTN.

Material y Métodos

Descripción de la familia:

Se trata de una familia con antecedente de 3 casos con DTN (dos con anencefalia y raquisquis y uno con anencefalia aislada), un aborto y dos productos normales, estos últimos concebidos bajo la administración de folato pre-concepcional. La madre y el padre, de 28 años y 33 años respectivamente, son originarios de Doctor Arroyo, Nuevo León y residen en el municipio de Guadalupe, en el mismo estado, desde hace 23 años. Niegan consanguinidad. La madre está dedicada a las labores del hogar; refiere menarca a los 12 años, con inicio de vida sexual activa a los 16 años y tiene un perfil obstétrico G₆P₅A₁V₂ (Tabla 1). La pareja niega antecedentes de tabaquismo, alcoholismo, toxicomanías o exposición a teratógenos. El nivel de folato plasmático detectado en la madre 2 meses después de tener su último producto con anencefalia fue de 2ng/ml, un valor por debajo de lo normal.

Se realizó un árbol genealógico detallado de cinco generaciones de la familia en estudio. En los miembros de la familia nuclear, se realizó una exploración física completa y radiológica de la columna dorsolumbar para descartar anomalías inaparentes. En el caso de la madre, 2 meses después de la última gestación con producto anencefálico, se determinó el nivel de folato plasmático, se hizo un estudio de infecciones prenatales para sífilis, toxoplasmosis, rubéola, citomegalovirus y herpes (STORCH) mediante análisis de anticuerpos y se realizó cariotipo a los padres.

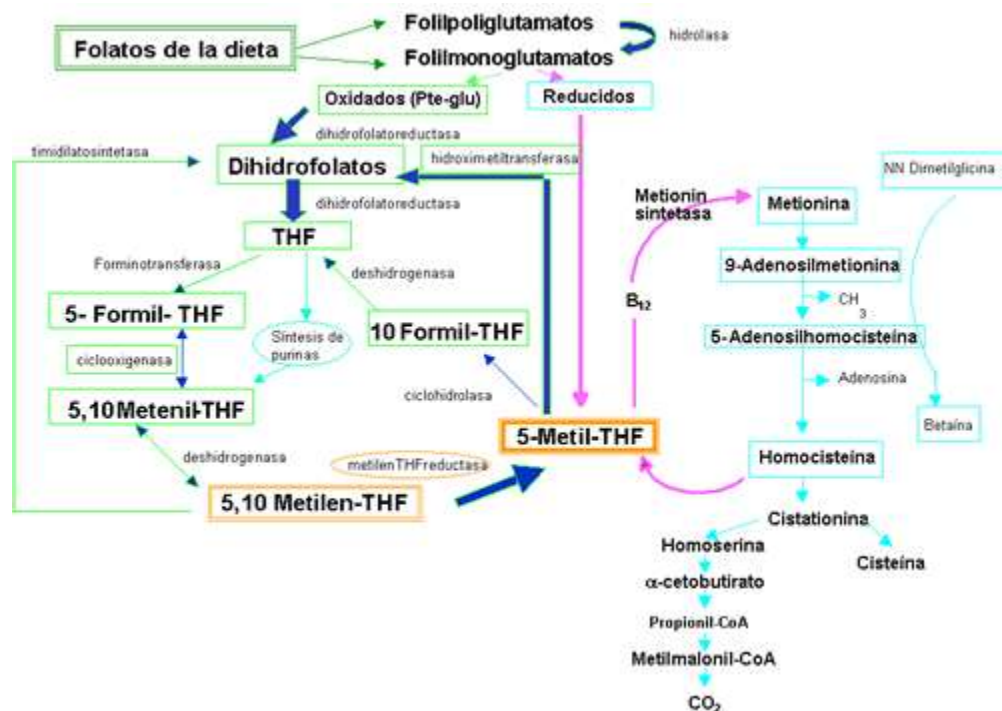


Figura 1: Biosíntesis de metionina y metabolismo del ácido fólico. La homocisteína es convertida a metionina por la enzima metionina sintetasa, la cual utiliza como cofactores al 5-metil-tetrahidrofolato (5-Metil-THF), producido por la enzima MTHFR.

TABLA 1. Perfil obstétrico de la madre de familia.

N° de Gestación	1	2	3	4	5	6
Edad Gestacional (Semanas)	18	26	22	40	22	40
Sexo	Indefinido	Varón	Mujer	Varón	Mujer	Mujer
Hallazgo	Aborto espontaneo	Anencefalia y espina bífida	Anencefalia	Sano	Anencefalia y espina bífida	Sano

Colección de muestras:

Después del consentimiento informado, se realizaron tomas de sangre periférica de los 4 miembros de la familia nuclear, tomadas en ayuno, 3 meses después de la suspensión de la administración oral de ácido fólico en la madre (último periodo post-gestacional), para realizar determinaciones de los niveles de homocisteína y folatos plasmático e intraeritrocitario. Además se colectó una muestra adicional de sangre para estudiar la presencia de las mutaciones C677T y A1298C en el gen MTHFR. 10 ml fueron extraídos y colocados en tubos con ácido etilén diamino tetra acético (EDTA) como anticoagulante. Las muestras fueron divididas en 3 tubos: 5 ml fueron usados para aislar el DNA, 0.1 ml fueron mezclados con ácido ascórbico para hemólisis y cuantificación de folato intraeritrocitario. Los 4.9 ml remanentes fueron centrifugados a 1,500 rpm durante 10 minutos y el plasma fue empleado para la determinación de folato y homocisteína.

Determinación de folatos y homocisteína:

El folato intraeritrocitario y plasmático, así como los aminoácidos fueron determinados por radioinmunoensayo (RIA), usando un estuche comercial (Diagnostic Products Co., Los Angeles, CA). Los estándares para valor nivel alto, medio y bajo fueron provistos por la misma compañía. El valor de folato plasmático fue tomado directamente de la curva de estándares. El valor de folato intracelular fue obtenido por la multiplicación del resultado a partir de la curva de estándares por el factor de dilución. El folato intraeritrocitario fue calculado al multiplicar el valor intracelular por 100 y dividido por el hematocrito de cada muestra. Los rangos de valores normales para folato plasmático e intraeritrocitario fueron de 3.7-17ng/ ml y 160-700 ng/ml, respectivamente, en tanto que para homocisteína los valores normales son de 6-15 μ mol.

Análisis del Gen MTHFR:

El DNA de las muestras de sangre fue aislado utilizando el amortiguador de lisis TSNTE (10 mM Tris-HCl a pH 8.0, 1% SDS, 100 mM NaCl y 2% 100X-Triton, 1 mM EDTA), extracción fenol-cloroformo y precipitación del DNA con etanol al 100%. La concentración y calidad del DNA fue medida mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La genotipificación de las mutaciones C677T y A1298C del gen MTHFR fueron desarrolladas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus iniciales en inglés) y digestión con enzimas de restricción como previamente ha sido descrito (15) . El alelo silvestre 677C y el alelo mutado 677T originan fragmentos de 198 y 175 pares de bases (pb), respectivamente, cuando los productos de PCR son digeridos con la enzima *Hinf* I. En tanto, el alelo silvestre 1298A y el alelo mutado 1298C originan fragmentos de 56 y 84 pb respectivamente, cuando los productos de PCR

son digeridos con la enzima *Mbo* II. Los productos digeridos fueron analizados en geles de poliacrilamida al 12%.

Resultados

Estudios clínicos:

La exploración física y radiológica de los miembros vivos de la familia nuclear no muestra anormalidades, descartándose la presencia de espina bífida oculta o malformaciones menores. Los cariotipos de los progenitores fueron normales, excluyéndose anomalías cromosómicas estructurales o numéricas, como causales de la transmisión de la enfermedad. El estudio de STORCH realizado a la madre resultó negativo.

Árbol Genealógico:

El árbol genealógico se ilustra en la figura 2. En este árbol se destaca la presencia de siete productos con DTN presentes en la línea ancestral materna, observándose recurrencia de este defecto en tres familias, correspondientes a parientes de segundo grado del caso índice. Entre los productos afectados del árbol completo, hay una relación 5:2 entre productos de sexo femenino y masculino respectivamente, excluyendo a tres productos de sexo indeterminado. También se observa un patrón de transmisión horizontal en cuatro familias de las 5 afectadas, correspondientes a las descendencias del varón III-13 y de las mujeres IV-4 (caso índice de este estudio), IV-10 y IV-25. La mujer VI-15 sólo registra un producto con el defecto. Es interesante notar que la descendencia del varón III-13 sugiere un transmisión vertical del defecto.

Niveles de Folato y homocisteína:

Las cifras de folato y homocisteína detectadas 3 meses después del último parto, con producto sano, se muestran en las tablas 2 y 3, respectivamente. En general, los niveles de folato intraeritrocitario son normales y se observan niveles ligeramente elevados de homocisteína.

Genotipos del gen MTHFR:

Los resultados de la genotipificación de los alelos 677 y 1298 se ilustran en la figura 3. El análisis del alelo 677 reveló que todos los miembros de esta familia son heterocigotos 677C/677T. En cuanto al alelo 1298, el análisis de la madre y la hija sobreviviente muestran un genotipo heterocigoto 1298A/1298C, mientras que el padre y el hijo varón sobreviviente presentan una genotipo homocigoto normal 1298A/1298A. Este análisis muestra que la madre y la hija son heterocigotas compuestas 677C/677T y 1298A/1298C.

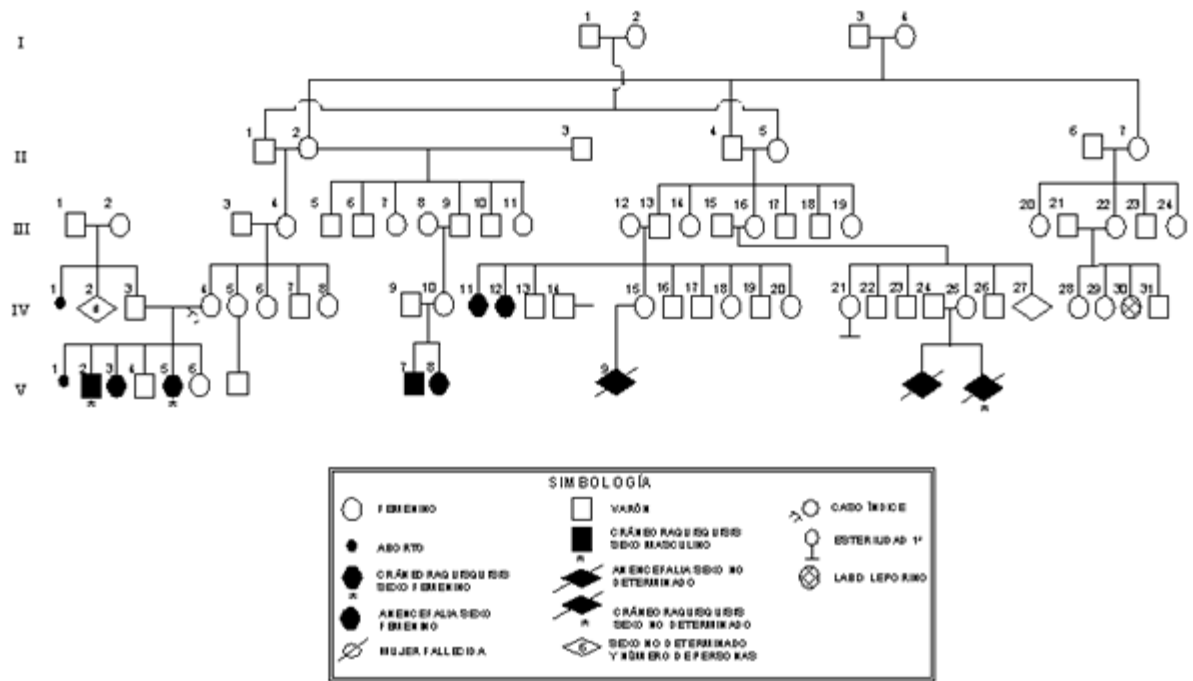


Figura 2. Árbol genealógico.

TABLA 2. Determinación de folatos.

Miembro de la familia	Folato eritrocitario (ng/ml)*	Folato plasmático (ng/ml)**
Padre	208.6	8.14
Madre	241.8	7.29
Hijo (Gesta 4)	224.5	8.40
Hija (gesta 6)	277.8	10.51

*Valores Normales >160 ng/ml

**Valores Normales >3.0 ng/ml

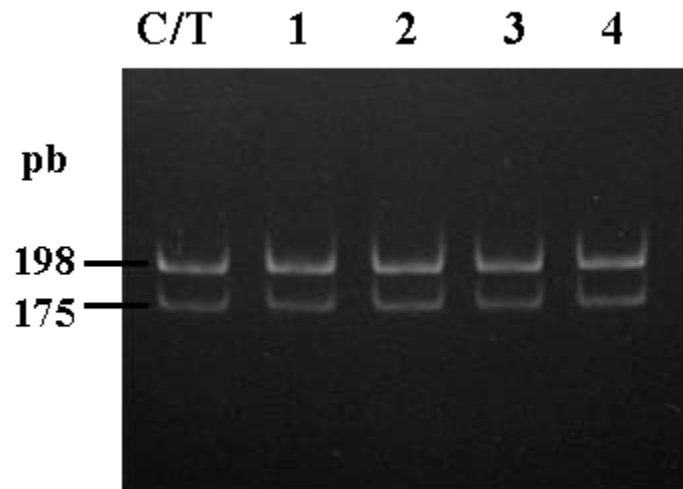
TABLA 3. Determinación de homocisteína en plasma

Miembro	Homocisteína (μ mol)*
Padre	16.57

Madre	10.48
Hijo (gesta 4)	9.12
Hija (gesta 6)	NA*

*Valores Normales 6-15 μ mol

+ NA No analizado



A.

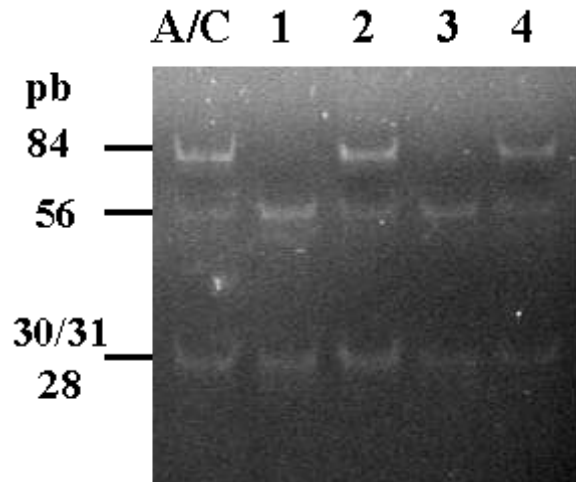
C/T= Control heterocigoto: *Hinf* I⁻/*Hinf* I⁺ (C/T)

1= Padre: *Hinf* I⁻/*Hinf* I⁺ (C/T)

2= Madre: *Hinf* I⁻/*Hinf* I⁺ (C/T)

3= Hijo: *Hinf* I⁻/*Hinf* I⁺ (C/T)

4= Hija: *Hinf* I⁻/*Hinf* I⁺ (C/T)



B.

A/C= Control heterocigoto: *Mbo* II⁻ / *Mbo* II⁺ (A/C)

1= Padre: *Mbo* II⁻ / *Mbo* II⁻ (A/A)

2= Madre: *Mbo* II⁻ / *Mbo* II⁺ (A/C)

3= Hijo: *Hinf* I⁻ / *Hinf* I⁻ (A/A)

4= Hija: *Mbo* II⁻ / *Mbo* II⁺ (A/C)

Figura 3. A. Genotipificación de la posición nucleotídica 677 del gen MTHFR: Gel de poliacrilamida al 12% del producto amplificado por PCR y digerido con *Hinf* I. El alelo mutado 677T es cortado por la enzima y produce la banda inferior de 175 pb, mientras que la versión normal 677C no es cortada y genera un fragmento de 198 pb. En este estudio, todos los miembros de la familia muestran un patrón de heterocigocidad (677C/677T). **B. Genotipificación de la posición nucleotídica 1298 del gen MTHFR:** Gel de poliacrilamida al 12% del producto amplificado y digerido con *Mbo* II. El alelo normal 1298A es cortado por la enzima, generando una banda de 56 pb, mientras que la versión mutada no es cortada y produce una banda de 84 pb. En esta figura se observa que la madre y la hija son heterocigotas, mientras que el padre y el hijo son homocigotos normales.

Discusión

En la familia estudiada por recurrencia de tres productos con DTN y que niega lazos de consanguinidad, se observa un árbol genealógico con notables recurrencias intrafamiliares del mismo tipo de defectos en parientes maternos de segundo grado; también se observa predilección del defecto por el sexo femenino y un patrón de transmisión horizontal en cuatro familias de las 5 afectadas, aunque una de las familias tiene un patrón de herencia semi-vertical (descendencia del varón III-13 en la figura 2). Este patrón bizarro de transmisión autosómica es difícil de clasificarlo

como dominante o recesivo. La predilección del defecto por el sexo femenino en el árbol genealógico es similar a la establecida para este tipo de defectos en general (2:1) (16).

La recurrencia intrafamiliar de DTN es rara. Aunque el riesgo de recurrencia para esta enfermedad multifactorial se incrementa 10 veces después del nacimiento del primer producto afectado, 20 veces después la gestación de dos productos afectados y hasta 40 veces después de la gestación de tres productos malformados, el 95% de los casos de DTN surgen en madres que no tenían antecedentes de la malformación (17). Un análisis de segregación de casos recurrentes y de casos esporádicos de DTN ha sugerido la presencia de un gen mayor autosómico recesivo implicado en el defecto (18).

México es el segundo país con mayor incidencia de DTN en el mundo (19). Adicionalmente, uno de los factores asociados al defecto, la mutación 677T en el gen MTHFR, tiene una frecuencia alélica muy alta en nuestra población (59%) (20) y está presente en todos los miembros de la familia estudiada. Los análisis moleculares revelan que la madre y su hija son heterocigotas compuestas para los polimorfismos de las posiciones 677 y 1298 del gen MTHFR, mientras que el padre y el hijo son heterocigotos simples para el polimorfismo de la posición 677 del mismo gen. Con los genotipos paternos determinados, existe la posibilidad que los fetos afectados hayan sido homocigotos para la mutación 677T, e inclusive, que en adición a esta homocigocidad, hayan heredado la mutación 1298C (homocigocidad 677T más heterocigocidad compuesta 677CT/1298AC). Aunque varios estudios han asociado al alelo 677T con el defecto (21, 22, 23, 24, 25), otros reportes no han podido demostrar dicha asociación (26,27,28,29,30,31,32,33,34). El polimorfismo 1298C del mismo gen no ha sido asociado con este tipo de defectos congénitos y se ha observado que los riesgos relativos para la ocurrencia del defecto en las madres homocigotas 677T, heterocigotas simples 677T y heterocigotas compuestas 677C/677T-1298A/1298C son de 2.38, 1.18 y 1.06, respectivamente; lo cual significa que ese riesgo es casi inexistente para las dos últimas (35). Sin embargo, el riesgo para DTN en productos con heterocigocidad compuesta 677CT/1298AC se ha estimado que es 2.04 (36).

Todos los miembros de la familia estudiada muestran niveles adecuados de folatos intraeritrocitarios y plasmáticos, los cuales pueden ser debidos a cambios relativamente recientes en los hábitos alimentarios de la familia, propiciados por los médicos tratantes. Sin embargo el padre presenta niveles altos de homocisteína, a pesar de tener un genotipo MTHFR probablemente más benéfico que la madre y la hija y de tener niveles adecuados de folatos sanguíneos.

En el presente trabajo se puede observar una interacción muy interesante entre los factores genéticos (genotipo MTHFR) y nutricionales (deficiencia de folato en la dieta) que han sido implicados en la patogénesis de los DTN. El tratamiento pre-concepcional de la madre con folatos parece haber jugado un papel central en la prevención de la aparición del fenotipo malformativo en esta familia, pues los únicos productos sobrevivientes y clínicamente sanos fueron gestados después del tratamiento pre-concepcional con ácido fólico y existe el antecedente de bajos niveles de folatos plasmáticos (2 ng/ml) dos meses después de un embarazo de la propósita que resultó en un producto con anencefalia. Lo anterior sugiere que la vitamina tuvo un efecto supresor de la malformación. La suplementación pre-concepcional con ácido fólico previene un 70% de los casos esperados de DTN en los estudios clínicos controlados (37). Los estudios bioquímicos han demostrado deficiencias de la actividad de la enzima MTHFR resultante de los genotipos homocigoto simple 677T y homocigoto compuesto 677CT/1298AC, cuando se compara con la versión codificada por alelos normales (38,39). En los embarazos que cursaron con el tratamiento preconcepcional con folatos, la deficiencia genética y enzimática pudo haber sido compensada por un incremento de los niveles intracelulares de 5-metil-THF requeridos para una embriogénesis normal. Aunque la posible constitución genotípica de los productos afectados y las bajas concentraciones de folato en el ambiente intrauterino pudieron ser determinantes para la aparición de DTN, no es descartable la participación de otros genes sensibles a la actividad del ácido fólico,

tal como se ha observado en algunos modelos animales, particularmente con los genes *Cart 1* y *Cd* (40,41).

Finalmente, es importante mencionar que la participación de genes sensibles al ácido fólico en la recurrencia de DTN en la especie humana no ha sido claramente establecida y que este reporte implica una posible participación del gen *MTHFR* en la recurrencia de este tipo de malformaciones.

Conclusión

En el presente estudio se describen los estudios moleculares y bioquímicos de una familia con recurrencia de DTN y los resultados sugieren una interesante interacción entre factores genéticos (genotipo *MTHFR*) y nutricionales (deficiencia nutricional de ácido fólico). Estos dos factores han sido fuertemente implicados en la patogénesis de los DTN en general, pero no han sido asociados con la recurrencia del defecto.

Agradecimientos

Los autores agradecen, a la Dra. Laura Martínez de Villarreal y a la Secretaría de Salud de Nuevo León, por las determinaciones de folatos y al Dr. Ricardo García Cavazos del Instituto Nacional de Perinatología por la realización de los análisis de homocisteína.

Resumen

Se presenta una familia originaria del sur de Nuevo León con recurrencia de defectos del tubo neural (DTN) cuyos productos sobrevivientes se han logrado después del tratamiento pre-concepcional con folato. Después de las evaluaciones clínicas, bioquímicas y moleculares, se encuentra que los miembros presentan heterocigocidad para la mutación *MTHFR* 677T y que la madre y la hija son heterocigotas compuestas 677C/677T – 1298A/1298C. Los niveles de folatos intraeritrocitarios y plasmáticos son normales y sólo el padre presenta niveles levemente incrementados de homocisteinemia. Estos resultados sugieren una interacción entre factores genéticos y nutricionales previamente implicados en la patogénesis de los DTN que podrían estar asociados adicionalmente a la recurrencia de este cuadro malformativo.

Palabras clave: *anencefalia, defectos, tubo, neural, Nuevo León, México*

Abstract

A family is presented it would originate of the south of Nuevo León with recurrence of neural tube defects (NTD) whose products survivors have been achieved after the treatment pre-conceptional with folate. After the clinical, biochemical and molecular evaluations, it is found that the members present heterocigosity for the mutation *MTHFR* 677T and that the mother and the daughter are compound heterozygotes 677C/677T - 1298A/1298C. The levels of red cells folates and plasmatic they are normal and the father only presents slightly increased levels of homocystenaemia. These results suggest an interaction among genetic and nutritional factors previously implied additionally in the pathogenesis of the NTD that could be associate to the recurrrence of this defect.

Key words: *anencephaly, defects, neural, tube, Nuevo León, México*

Referencias

1. Lemire RJ. Neural tube defects. *JAMA*1988;259:558-562.
2. International Centre for Birth Defects, EUROCAT 1998 . World Atlas of Birth Defects. Geneva: World Health Organization; pp. 20-31.
3. Martínez de Villarreal LE, C Ayala-Alvarado y C Limón-Benavides 1999. Defectos congénitos y mortalidad infantil en el estado de Nuevo León. *Medicina Universitaria*; 1:113-117.
4. Villarreal-Pérez JZ, JF González-Guerreo, JI Wong-Rios y LE Martínez de Villarreal 1999. Actualización y reporte sobre los defectos congénitos en el Estado de Nuevo León. Secretaría Estatal de Salud de Nuevo León. Monterrey, México
5. Wang Y, Y Wu, G Zhou, C Xu and K Xiao 1996. An estimate of recurrence risk for neural tube defects in China. *Hua Hsi I Ko Ta Hsueh Hsueh Pao*, 27:196-198.
6. Carter CO and JAF Roberts 1967. The risk of recurrence after two children with central-nervous-system malformations. *Lancet*, 1:306-308.
7. van der Put NM, RP Steegers-Theunissen, P Frosst, FJ Trijbels, TK Eskes, LP van den Heuvel, EC Mariman, M den Heyer, R Rozen and HJ Blom.1995. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet*; 346: 1070-1071.
8. MRC Vitamin study research group. 1991. Prevention of neural-tube defects results of the Medical Reserach Council Vitamin Study. *Lancet*; 338:131-137.
9. Czeizel AE and I Dudas 1992. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med*; 327:1832-1835.
10. Kang SS, PW Wong, A Susmano, J Sora, M Norusis and N Ruggie.1991. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase. An inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet*; 48: 536-545.
11. Engbersen AM, DG Franken, GH Boers, EM Stevens, FJ Trijbels and HJ Blom.1995. Thermolabile 5,10-mehylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet*; 56:142-150.
12. Rosenquist TH, SA Ratashak and J Selhub.1996. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 93:15227-15232.
13. Vanaerts LA, HJ Blom, RA Deabreu, FJ Trijbels and TK Eskes.1994. Copius Peereboom-Stegeman JH, Noordhoek J. Prevention of neural tube defects by and toxicity of L-homocysteine in cultured postimplantation rat embryos. *Teratology*; 50:348-360.
14. Mutchinick OM, MA Lopez, L Luna, J Waxman and VE Babinsky.1999. High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Mol Genet Metabol*; 68:461-467.
15. van der Put NM, F Gabreels, EM Stevens, JA Smeitink, FJ Trijbels, TK Eskes, LP van den Heuvel and HJ Blom.1998. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet*, 62:1044-1051.
16. Thompson MW, RR McInnes y HF Willard. 1996. Thompson & Thompson Genética en Medicina. 4ª ed. Barcelona: Masson, SA. p. 337-350.

17. Wald NJ and A Kennard 1996. Prenatal screening for neural tube defects and Down syndrome. In: Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. [DL Rimoin, JM Connor and RE Pyeritz] Third edition. New York: Churchill-Livingstone; pp. 545-562.
18. Shaffer LG, ML Marzita, J Bodurtha, A Newlin and WE Nance.1990. Evidence for a major gene in familial anencephaly. *Am J Hum Genet*; 36:97-101.
19. International Centre for Birth Defects, *Op.cit*
20. Mutchinick OM *et. al.*, *Op.cit*
21. van der Put NM, RP Steegers-Theunissen *et. al.*, *Op.cit.*
22. Ou CY, RE Stevenson, VK Brown, CE Schwartz, WP Allen, MJ Khoury, R Rozen. GP Oakley Jr and MJ AdamsJr.1996. 5,10 Methylene tetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. *Am J Med Genet*; 63:610-614.
23. Whitehead AS, P Gallagher, JL Mills, PN Kirke, H Burke, AM Molloy, DG Weir, DC Shields, JM Scott. 1995. A genetic defect in 5,10 methylene tetrahydrofolate reductase in neural tube defects. *QJM*; 88:763-766.
24. Shields DC, PN Kirke, JL Mills, D Ramsbottom, AM Molloy, H Burke, DG Weir, JM Scott and AS Whitehead.1999. The "thermolabile" variant of methylene tetrahydrofolate reductase and neural defect: An evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. *Am J Hum Genet*; 64:1045-1055.
25. Christensen B, L Arbour, P Tran, D Leclerc, N Sabbaghian, R Platt, BM Gilfix, DS Rosenblatt, RA Gravel, P Forbes and R Rozen 1999. Genetic polymorphisms in methylene tetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Med Genet*; 84:151-157.
26. Papapetrou C, SA Lynch, J Burn and YH Edwards 1996. Methylene tetrahydrofolate reductase and neural tube defects. *Lancet*; 348:58.
27. Wilcken DE and XL Wang 1996. Relevance to spina bifida of mutated methylene tetrahydrofolate reductase. *Lancet*; 347:340.
28. Mornet E, F Muller, A Lenvoise-Furet, AL Delezoide, JY Col, B Simon-Bouy and JL Serre 1997. Screening of the C677T mutation on the methylene tetrahydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects. *Hum Genet*; 100:512-514.
29. Speer MC, G Worley, JF Mackey, E Melvin, WJ Oakes and TM George.1997. The thermolabile variant of methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) is not a major risk factor for neural tube defect in American Caucasians. *Neurogenetics*; 1:149-150.
30. de Franchis R, A Buoninconti, C Mandato, A Pepe, MP Sperandeo, R Del Gado, V Capra, E Salvaggio, G Andria and P Mastroiacovo.1998. The C677T mutation of the 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase gene is a moderate risk factor for spina bifida in Italy. *J Med Genet*; 35:1009-1013.
31. Shaw GM, R Rozen, RH Finnell, CR Wasserman and EJ Lammer.1998. Maternal vitamin use, genetic variation of infant methylene tetrahydrofolate reductase, and risk for spina bifida. *Am J Epidemiol*; 148:30-31.

32. Koch MC, K Stegmann, A Ziegler, B Schroter and A. Ermert 1998. Evaluation of the MTHFR C677T allele and the MTHFR gene locus in a German spina bifida population. *Eur J Pediatr*; 157:487-492.
33. Ubbink JB, A Christianson, MJ Bester, MI Van Allen, PA Venter, R Delport, HJ Blom HJ, A van der Merwe, H Potgieter and WJ Vermaak 1999. Folate status, homocysteine metabolism, and methylene tetrahydrofolate reductase genotype in rural South African blacks with a history of pregnancy complicated by neural tube defects. *Metabolism*; 48:269-274.
34. Boduroglu K, M Alikasifoglu, B Anar and E Tuncbilek 1999. Association of the 677C-->T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Turkish patients with neural tube defects. *J Child Neurol*; 14:159-161.
35. van der Put NM, F Gabreels, *et. al. Op. cit.*
36. *Idem.*
37. Locksmith GJ and P Duff 1998. Preventing neural tube defects: The importance of the periconceptional folic acid supplement. *Obstet Gynecol*; 91:1027-1034.
38. van der Put NM, F Gabreels, *et. al. Op. cit.*
39. Frosst P, HJ Blom, R Milos, P Goyette, CA Sheppard, RG Matthews, GJ Boers, M den Heijer, LA Kluijtmans, LP van den Heuvel and R Rozen.1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Gene* ;10:111-113.
40. Zhao Q, RR Behringer and B de Crombrughe 1996. Prenatal folic acid treatment suppresses acrania and meroanencephaly in mice mutant for the Cart1 homeobox gene. *Nat Genet*;13:275-283.
41. Carter M, S Ulrich, Y Oofuji, DA Williams and ME Ross.1999. Crooked tail (Cd) models human folate-responsive neural tube defects. *Hum Mol Genet*; 8:2199-2204