

**CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS,  
PREVENTIVAS Y METABÓLICAS DE LOS  
DEFECTOS DEL TUBO NEURAL EN LA  
ISLA DE MALLORCA.**







**Título:**

**CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS,  
PREVENTIVAS Y METABÓLICAS DE LOS  
DEFECTOS DEL TUBO NEURAL EN LA  
ISLA DE MALLORCA.**

**DEPARTAMENT DE PEDIATRIA, OBSTETRÍCIA I  
GINECOLOGIA I MEDICINA PREVENTIVA.  
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA.  
FACULTAT DE MEDICINA.**

Tesis presentada por la licenciada María José Gibert Castañer  
para optar al grado de Doctora en Medicina y Cirugía.  
Dirigida por el Profesor Jordi Xercavins Montosa.

Barcelona, septiembre 2003.



*A mi familia*

# ÍNDICE



<b>1 PREÁMBULO .....</b>	<b>16</b>
1.1 PLANTEAMIENTO GENERAL.....	16
1.2 JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO .....	17
1.3 OBJETIVOS.....	19
1.4 DESARROLLO.....	19
1.5 ESTRUCTURA.....	21
1.6 SUBVENCIONES.....	21
1.7 PRESENTACIONES PREVIAS DE RESULTADOS .....	22
1.8 AGRADECIMIENTOS .....	23
1.9 BIBLIOGRAFÍA .....	23
<b>2 CLÍNICA, PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL .....</b>	<b>25</b>
2.1 TIPOS DE ANOMALÍAS DEL TUBO NEURAL .....	25
2.2 ANENCEFALIA.....	25
2.3 INIENCEFALIA .....	26
2.4 ENCEFALOCELE .....	26
2.5 CRANEORRAQUISQUISIS.....	28
2.6 AGENESIA DEL SACRO.....	28
2.7 ESPINA BÍFIDA .....	29
2.7.1 <i>Clasificación y generalidades</i> .....	29
2.7.2 <i>Espina bífida abierta</i> .....	29
2.7.3 <i>Espina bífida oculta</i> .....	30
2.7.4 <i>Clínica del mielomeningocele</i> .....	31
2.7.4.1 Clínica neurológica.....	31
2.7.4.1.1 Clínica neurológica local.....	31
2.7.4.1.2 Clínica neurológica a distancia.....	32
2.7.4.2 Clínica extraneurológica.....	34
2.7.5 <i>Pronóstico vital del mielomeningocele</i> .....	37
2.7.6 <i>Manejo del mielomeningocele</i> .....	37
2.7.6.1 Manejo prenatal .....	37
2.7.6.2 Manejo intraparto.....	38
2.7.6.3 Manejo postparto .....	41
2.8 BIBLIOGRAFÍA .....	42
<b>3 LOS COSTES DE LA ESPINA BÍFIDA.....</b>	<b>47</b>
3.1 INTRODUCCIÓN .....	47
3.2 EL COSTE ECONÓMICO DE LA ESPINA BÍFIDA .....	47
3.3 LOS COSTES PERSONALES Y SOCIALES DE LA ESPINA BÍFIDA .....	49
3.4 BIBLIOGRAFÍA .....	49
<b>4 NEURULACIÓN HUMANA Y ANOMALÍAS DERIVADAS.....</b>	<b>51</b>
4.1 INTRODUCCIÓN .....	51
4.2 CONCEPTOS RELATIVOS A LA NEURULACIÓN .....	51
4.2.1 <i>Neurulación primaria</i> .....	51
4.2.2 <i>Neurulación secundaria</i> .....	55
4.2.3 <i>Desarrollo craneocaudal de la neurulación</i> .....	56
4.2.3.1 Teoría de la cremallera.....	56
4.2.3.2 Teoría de los múltiples puntos de cierre.....	57
4.3 DEFINICIÓN DE LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL .....	58

4.4 PATOGENIA DE LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL .....	61
4.4.1 <i>Etapa afectada de la neurulación</i> .....	61
4.4.2 <i>Momento de la apertura del tubo neural</i> .....	62
4.4.3 <i>Mecanismo de producción</i> .....	62
4.4.4 <i>Anomalías asociadas</i> .....	62
4.5 BIBLIOGRAFÍA .....	65
<b>5 NIVELES PREVENTIVOS .....</b>	<b>66</b>
5.1 CONCEPTO DE PREVENCIÓN .....	67
5.2 LOS NIVELES DE PREVENCIÓN Y SU APLICACIÓN A LAS ALTERACIONES DE LA NEURULACIÓN .....	67
5.3 BIBLIOGRAFÍA .....	67
<b>6 EL DIAGNÓSTICO PRENATAL DE LAS ANOMALÍAS DEL TUBO NEURAL.....</b>	<b>69</b>
6.1 INTRODUCCIÓN .....	69
6.2 CONCENTRACIONES DE ALFAPETOPROTEÍNA EN LAS ANOMALÍAS DE CIERRE DEL TUBO NEURAL .....	69
6.2.1 <i>Alfafetoproteína: origen, estructura y función</i> .....	69
6.2.2 <i>Fundamentos del diagnóstico mediante alfafetoproteína</i> .....	70
6.2.3 <i>El cribado bioquímico: la alfafetoproteína en suero materno</i> .....	71
6.2.3.1 Edad gestacional .....	73
6.2.3.2 Peso materno.....	73
6.2.3.3 Raza .....	73
6.2.3.4 Diabetes mellitus insulino dependiente.....	74
6.2.3.5 Hábito tabáquico.....	74
6.2.3.6 Gestación múltiple .....	74
6.2.3.7 Técnicas de reproducción asistida.....	74
6.2.4 <i>El diagnóstico bioquímico de los defectos del tubo neural</i> .....	75
6.3 EL CRIBADO ECOGRÁFICO .....	77
6.4 LA DISYUNTIVA ENTRE LOS CRIBADOS BIOQUÍMICO Y ECOGRÁFICO .....	79
6.5 EL DIAGNÓSTICO DEL ENCEFALOCELE .....	80
6.6 NECESIDAD DEL ESTUDIO DEL LÍQUIDO AMNIÓTICO EN LOS CASOS CON ALFAPETOPROTEÍNA ELEVADA EN SUERO MATERNO .....	80
6.7 PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	82
6.7.1 <i>Diagnóstico de las anomalías del tubo neural en el primer trimestre</i> .....	82
6.7.2 <i>La cirugía intrauterina y la resonancia nuclear magnética</i> .....	83
6.8 BIBLIOGRAFÍA .....	83
<b>7 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ANOMALÍAS DEL TUBO NEURAL.....</b>	<b>87</b>
7.1 LOS REGISTROS DE DEFECTOS CONGÉNITOS COMO FUENTES DE DATOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	87
7.2 PREVALENCIA DE LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL Y FACTORES MODULADORES .....	89
7.2.1 <i>La comparación de las frecuencias entre registros</i> .....	89
7.2.2 <i>La medida de las frecuencias de las anomalías congénitas</i> .....	91
7.2.3 <i>Variaciones temporoespaciales en la prevalencia de los defectos del tubo neural</i> .....	92
7.2.4 <i>Impacto de las medidas preventivas sobre la prevalencia de las anomalías del tubo neural</i> .....	97

7.2.5 Otros factores que modifican la prevalencia de los defectos del tubo neural .....	103
7.2.5.1 Factores étnicos y raciales .....	103
7.2.5.2 Altitud.....	104
7.2.5.3 Variaciones estacionales .....	104
7.2.5.4 Edad de los progenitores.....	105
7.2.5.5 Paridad.....	105
7.2.5.6 Abortos y muertes fetales previas .....	105
7.2.5.7 Intervalo intergenésico.....	105
7.2.5.8 Embarazos múltiples.....	106
7.2.5.9 Edad gestacional y peso al nacimiento.....	106
7.2.5.10 Sexo fetal .....	106
7.2.5.11 Antecedentes familiares.....	107
7.2.5.12 Condición socioeconómica .....	108
7.2.5.13 Altas temperaturas .....	108
7.2.5.14 Diabetes .....	110
7.2.5.15 Tiroidopatías .....	110
7.2.5.16 Peso materno.....	110
7.2.5.17 Estrés .....	111
7.2.5.18 Exposición a campos electromagnéticos.....	111
7.2.5.19 Exposición a agentes químicos .....	111
7.2.5.19.1 Exposición laboral materna .....	112
7.2.5.19.2 Exposición laboral paterna .....	112
7.2.5.19.3 Plomo .....	113
7.2.5.19.4 Agente naranja.....	113
7.2.5.19.5 Proximidad a vertederos .....	113
7.2.5.19.6 Glicoléteres.....	113
7.2.5.19.7 Fármacos .....	114
7.3 BIBLIOGRAFÍA .....	116

## **8 DEFECTOS DEL TUBO NEURAL EN LA ISLA DE MALLORCA: REPERCUSIÓN DE LAS PREVENCIÓNES PRIMARIA Y SECUNDARIA SOBRE SUS CIFRAS DE FRECUENCIA Y CARACTERÍSTICAS MÁS DESTACADAS .....**

8.1 INTRODUCCIÓN .....	121
8.2 PREVALENCIAS TOTALES DE LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL EN LA ISLA DE MALLORCA Y COMPARACIÓN CON LAS PREVALENCIAS DE UNA SELECCIÓN DE ANOMALÍAS CONGÉNITAS Y LAS DE LOS REGISTROS ESPAÑOLES DE BASE POBLACIONAL.....	122
8.2.1 <i>Material y métodos</i> .....	122
8.2.2 <i>Resultados</i> .....	125
8.3 REPERCUSIÓN DE LA PREVENCIÓN PRIMARIA SOBRE LAS CIFRAS DE FRECUENCIA DE LAS ANOMALÍAS DEL TUBO NEURAL .....	127
8.3.1 <i>Material y métodos</i> .....	128
8.3.2 <i>Resultados</i> .....	128
8.4 REPERCUSIÓN DE LA PREVENCIÓN SECUNDARIA SOBRE LAS CIFRAS DE FRECUENCIA DE LAS ANOMALÍAS DEL TUBO NEURAL.....	129
8.4.1 <i>Material y métodos</i> .....	129
8.4.2 <i>Resultados</i> .....	132
8.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL NACIDOS DE MADRES RESIDENTES EN MALLORCA ENTRE 1980 Y 2002 .....	132
8.5.1 <i>Material y métodos</i> .....	132
8.5.2 <i>Resultados</i> .....	135
8.5.2.1 Características clínicas.....	135
8.5.2.2 Características sociodemográficas .....	138
8.5.2.3 Características diagnósticas .....	139

8.5.2.4 Características de su manejo.....	140
8.5.2.5 Características de la prevención primaria .....	141
8.6 DISCUSIÓN.....	142
8.7 BIBLIOGRAFÍA .....	146
<b>9 LAS VERTIENTES FISIOLÓGICA Y PATOLÓGICA DEL METABOLISMO DEL FOLATO Y DE LA HOMOCISTEÍNA.....</b>	<b>148</b>
9.1 INTRODUCCIÓN.....	148
9.2 EL ÁCIDO FÓLICO.....	148
9.2.1 <i>Concepto y estructura química</i> .....	148
9.2.2 <i>Absorción, transporte, almacenamiento y eliminación</i> .....	149
9.2.3 <i>Funciones metabólicas</i> .....	151
9.2.4 <i>Requerimientos</i> .....	154
9.2.5 <i>Cifras de frecuencia de la deficiencia de folatos</i> .....	155
9.2.6 <i>Etiología de la deficiencia de folatos</i> .....	158
9.2.7 <i>Clínica de la deficiencia de folatos</i> .....	158
9.2.7.1 <i>Enfermedades cardiovasculares</i> .....	159
9.2.7.2 <i>Enfermedades neuropsiquiátricas</i> .....	160
9.2.7.3 <i>Neoplasias</i> .....	162
9.2.7.4 <i>Enfermedades gestacionales</i> .....	162
9.3 LA VITAMINA B <sub>12</sub> .....	163
9.3.1 <i>Concepto y estructura química</i> .....	163
9.3.2 <i>Absorción, transporte, almacenamiento y eliminación</i> .....	164
9.3.3 <i>Funciones metabólicas</i> .....	166
9.3.4 <i>Requerimientos</i> .....	166
9.3.5 <i>Cifras de frecuencia de la deficiencia de cobalamina</i> .....	166
9.3.6 <i>Etiología de la deficiencia de cobalamina</i> .....	167
9.3.7 <i>Clínica de la deficiencia de cobalamina</i> .....	167
9.4 LA VITAMINA B <sub>6</sub> .....	168
9.4.1 <i>Concepto y estructura química</i> .....	168
9.4.2 <i>Absorción, transporte, almacenamiento y eliminación</i> .....	168
9.4.3 <i>Funciones metabólicas</i> .....	169
9.4.4 <i>Requerimientos</i> .....	169
9.4.5 <i>Cifras de frecuencia de la deficiencia de</i> .....	170
<i>piridoxina</i> .....	170
9.4.6 <i>Etiología de la deficiencia de piridoxina</i> .....	170
9.4.7 <i>Clínica de la deficiencia de piridoxina</i> .....	170
9.5 EL METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA Y SU REGULACIÓN.....	171
9.5.1 <i>Conocimientos actuales</i> .....	171
9.5.2 <i>Perspectivas de futuro en la investigación del metabolismo de la homocisteína</i> .....	175
9.6 LA AGRESIÓN OXIDATIVA Y SU VÍNCULO CON EL METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA .....	177
9.6.1 <i>¿Qué es la agresión oxidativa?</i> .....	177
9.6.2 <i>El papel del metabolismo de la homocisteína en la agresión oxidativa..</i>	179
9.6.3 <i>La asociación entre los defectos del tubo neural y la agresión oxidativa</i>	181
9.7 BIBLIOGRAFÍA .....	181
<b>10 PAPEL DEL METABOLISMO DEL FOLATO EN LA ETIOPATOGENIA DE LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL.....</b>	<b>187</b>

10.1 INTRODUCCIÓN .....	187
10.2 ESTUDIOS SOBRE LA UTILIDAD DE LOS FOLATOS PARA LA PREVENCIÓN PRIMARIA DE LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL .....	188
10.2.1 <i>La interpretación de los estudios según la Medicina Basada en la Evidencia</i> .....	188
10.2.2 <i>Estudios observacionales</i> .....	188
10.2.3 <i>Estudios experimentales y cuasi-experimentales</i> .....	197
10.2.4 <i>Conclusiones sobre el efecto preventivo del ácido fólico</i> .....	199
10.3 OTRAS REPERCUSIONES DE LOS SUPLEMENTOS CON ÁCIDO FÓLICO .....	199
10.3.1 <i>Abortos espontáneos y embarazos múltiples</i> .....	199
10.3.2 <i>Enmascaramiento y precipitación de la clínica neurológica del déficit de cobalamina</i> .....	202
10.3.3 <i>Efectos sobre el umbral convulsivo e interferencia con fármacos antiepilépticos</i> .....	203
10.4 METABOLISMO DEL FOLATO EN LAS MADRES DE HIJOS CON DEFECTOS DEL TUBO NEURAL .....	203
10.4.1 <i>Estudios en sangre</i> .....	204
10.4.2 <i>Absorción de folatos</i> .....	211
10.5 BASE GENÉTICA DE LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL .....	213
10.5.1 <i>Fundamentos</i> .....	213
10.5.2 <i>Genes candidatos</i> .....	213
10.5.2.1 Gen de la metilén-tetrahidrofolato reductasa .....	213
10.5.2.1.1 Polimorfismo C677T .....	214
10.5.2.1.2 Polimorfismo A1298C.....	215
10.5.2.2 Gen de la metionina sintetasa.....	216
10.5.2.3 Gen de la metionina sintetasa reductasa.....	217
10.5.2.4 Gen de la metilén-tetrahidrofolato deshidrogenasa/metilén-tetrahidrofolato ciclohidrolasa/formil-tetrahidrofolato sintetasa .....	217
10.5.2.5 Gen de la cistationina $\beta$ -sintetasa.....	218
10.5.2.6 Gen de la serina hidroximetiltransferasa .....	218
10.5.2.7 Conclusiones.....	218
10.6 LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL APLICADA A LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL .....	219
10.6.1 <i>Indicios sobre la embriotoxicidad de la homocisteína</i> .....	220
10.6.2 <i>Rol de los genes del metabolismo del folato y la homocisteína en los modelos animales</i> .....	221
10.6.3 <i>Repercusión de la experimentación animal en el conocimiento de los defectos humanos del tubo neural</i> .....	221
10.7 BIBLIOGRAFÍA .....	222
<b>11 PREVENCIÓN PRIMARIA DE LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL EN LAS PACIENTES ATENDIDAS EN UN HOSPITAL MALLORQUÍN DE REFERENCIA .....</b>	<b>228</b>
11.1 INTRODUCCIÓN .....	228
11.2 MATERIAL Y MÉTODOS .....	229
11.3 RESULTADOS .....	230
11.3.1 <i>Estudio del año 1998</i> .....	231
11.3.2 <i>Estudio del año 2002</i> .....	234
11.3.3 <i>Evolución de la ingesta de suplementos con folatos entre 1998 y 2002</i> .....	238
11.4 DISCUSIÓN .....	240
11.5 BIBLIOGRAFÍA .....	242

## 12 VALORACIÓN ANALÍTICA DEL METABOLISMO DEL FOLATO Y DE LA HOMOCISTEÍNA ..... 245

12.1 INTRODUCCIÓN .....	245
12.2 VALORACIÓN DEL STATUS DE FOLATOS Y COBALAMINA.....	245
12.2.1 <i>Metabolismo y formas circulantes</i> .....	245
12.2.1.1 Folatos .....	245
12.2.1.2 Vitamina B <sub>12</sub> .....	245
12.2.2 <i>Utilidad de las mediciones en sangre</i> .....	246
12.2.2.1 Folatos sérico e intraeritrocitario .....	246
12.2.2.2 Cobalamina sérica.....	247
12.2.3 <i>Variabilidad biológica</i> .....	248
12.2.3.1 Folatos .....	248
12.2.3.1.1 Causas fisiológicas .....	248
12.2.3.1.2 Causas patológicas.....	249
12.2.3.1.3 Causas farmacológicas .....	249
12.2.3.1.4 Causas genéticas.....	250
12.2.3.2 <i>Cobalamina</i> .....	251
12.2.3.2.1 Causas fisiológicas .....	251
12.2.3.2.2 Causas patológicas.....	251
12.2.3.2.3 Causas farmacológicas .....	251
12.2.4 <i>Métodos para la valoración del status de folatos y cobalamina</i> .....	252
12.2.4.1 Consideraciones generales .....	252
12.2.4.2 Prueba de la supresión de la desoxiuridina .....	252
12.2.4.3 Prueba del ácido formiminoglutámico .....	253
12.2.4.4 Ensayos con vitaminas.....	253
12.2.4.5 Ensayos metabólicos.....	254
12.2.4.6 Conclusiones.....	255
12.2.5 <i>Método de cuantificación del folato y de la cobalamina utilizado en esta tesis</i> .....	256
12.2.5.1 Condiciones preanalíticas .....	256
12.2.5.2 Fundamento de la técnica.....	257
12.2.5.3 Procedimiento .....	258
12.2.5.4 Evaluación .....	259
12.3 CUANTIFICACIÓN DE LA HOMOCISTEÍNA .....	260
12.3.1 <i>Metabolismo y formas circulantes</i> .....	260
12.3.2 <i>¿Qué es la homocisteína total?</i> .....	260
12.3.3 <i>Variabilidad biológica</i> .....	261
12.3.3.1 Edad y sexo.....	261
12.3.3.2 Etnia.....	262
12.3.3.3 Ciclo menstrual, embarazo y uso de hormonales sexuales.....	262
12.3.3.4 Dieta .....	263
12.3.3.5 Estaciones .....	263
12.3.3.6 Consumo de café.....	265
12.3.3.7 Hábitos tóxicos .....	265
12.3.3.8 Ejercicio físico .....	265
12.3.3.9 Postura .....	265
12.3.3.10 Éstasis venoso.....	265
12.3.3.11 Insuficiencia renal.....	265
12.3.3.12 Diabetes mellitus.....	266
12.3.3.13 Hipotiroidismo .....	266
12.3.3.14 Trasplantes .....	266
12.3.3.15 Procesos hiperproliferativos.....	266
12.3.3.16 Artritis reumatoide.....	266
12.3.3.17 Hipertensión arterial .....	267
12.3.3.18 Enfermedades cardiovasculares y neuropsiquiátricas .....	267
12.3.3.19 Fármacos.....	267
12.3.3.20 Trisomía 21 .....	267
12.3.3.21 Factores genéticos.....	268
12.3.3.22 Conclusiones sobre la variabilidad biológica.....	268

12.3.4 Procedimientos de medida de la homocisteína total utilizados en esta tesis .....	268
12.3.4.1 Condiciones preanalíticas .....	269
12.3.4.2 Consideraciones generales sobre los procedimientos de medida de la homocisteína .....	273
12.3.4.2.1 Reducción de los enlaces disulfuro .....	273
12.3.4.2.2 Derivatización de la homocisteína .....	273
12.3.4.2.3 Codeterminación de otros aminotioles .....	273
12.3.4.3 Cromatografía en fase líquida de alta resolución .....	273
12.3.4.3.1 Fundamentos .....	273
12.3.4.3.2 Procedimiento .....	274
12.3.4.3.3 Evaluación .....	276
12.3.4.4 Inmunoensayo de fluorescencia polarizada .....	277
12.3.4.4.1 Fundamentos .....	277
12.3.4.4.2 Procedimiento .....	278
12.3.4.4.3 Evaluación .....	279
12.3.4.5 Cuantificación de la homocisteína total: ¿HPLC TAP/ABD-F o FPIA? .....	279
12.4 EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS EN ESTA TESIS .....	280
12.5 VARIABILIDAD BIOLÓGICA DE LA CISTEÍNA .....	282
12.6 ESCRUTINIO DEL POLIMORFISMO C677T .....	283
12.6.1 El polimorfismo C677T .....	283
12.6.2 Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa .....	283
12.6.3 Procedimiento .....	285
12.6.3.1 Purificación del ácido desoxirribonucleico .....	285
12.6.3.2 Reacción en cadena por la polimerasa .....	286
12.6.3.3 Digestión .....	288
12.6.3.4 Lectura e interpretación de los resultados .....	289
12.6.3.5 Precauciones para disminuir los diagnósticos falsos .....	289
12.7 BIBLIOGRAFÍA .....	289
<b>13 CARACTERIZACIÓN DEL METABOLISMO HOMOCISTEÍNA-FOLATO EN MADRES DE DEFECTOS DEL TUBO NEURAL DE MALLORCA: NUESTRA CASUÍSTICA.....</b>	<b>297</b>
13.1 INTRODUCCIÓN .....	297
13.2 MATERIAL Y MÉTODOS .....	298
13.2.1 Participantes .....	298
13.2.2 Métodos analíticos .....	299
13.2.3 Métodos estadísticos .....	300
13.3 RESULTADOS .....	300
13.4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	304
13.5 BIBLIOGRAFÍA .....	306
<b>14 CONCLUSIONES FINALES .....</b>	<b>309</b>
<b>CURRÍCULUM VITAE DE LA AUTORA .....</b>	<b>313</b>

# 1 Preámbulo

*Un profesional es tanto más eficiente cuanto mayores sean sus conocimientos científicos y más organizados se hallen en su mente.*

*(A. Senra Varela, M. P. Senra Varela)*

## 1.1 Planteamiento general

Los defectos de cierre del tubo neural (DTNs) son una anomalía del desarrollo del sistema nervioso central y de sus cubiertas. Los más frecuentes son la anencefalia y la espina bífida. Estas anomalías tienen una prevalencia total aproximada de 1% nacimientos, y constituyen las malformaciones estructurales más frecuentes después de las cardiopatías congénitas.

Aunque la mortalidad de los pacientes con espina bífida ha ido disminuyendo con el advenimiento de los avances diagnóstico-terapéuticos, la calidad de vida de los mismos no ha mejorado de forma paralela. Además, la minusvalía propia de esta enfermedad es susceptible de progresar al envejecer, creando inconvenientes crecientes no sólo para el enfermo sino para su entorno más próximo.

El tubo neural se forma durante la vida intrauterina, dando lugar al encéfalo y a la médula espinal. La embriogénesis de esta estructura concluye aproximadamente a los 26-30 días postovulación<sup>1</sup>, esto es, antes de que cualquier mujer sea apenas consciente de su estado de gestación. De ahí, la necesidad de que cualquier actuación preventiva tenga que iniciarse antes de la concepción.

Las controversias existentes sobre los DTNs son múltiples. Aunque su patología se atribuye a un cierre anormal del tubo neural, algunos autores creen que un tubo neural cerrado se puede reabrir en algunos casos<sup>2</sup>. Tampoco se ha esclarecido la razón subyacente a la variedad clínica exhibida por estas anomalías. La teoría de la cremallera<sup>3</sup> según la cual el tubo neural se cierra de forma continua en su porción media y después en sus extremos o neuroporos ha sido sustituida por la teoría de los múltiples puntos de cierre<sup>4,5</sup>. Esta última hipótesis, que equipara la embriogénesis del tubo neural de los ratones con los humanos<sup>6</sup>, permite clasificar los DTNs de acuerdo con el punto o puntos de cierre involucrados. En este contexto, es posible que el cierre de cada punto se vea regulado por distintos genes, cada uno con diferente susceptibilidad a factores exógenos (nutrientes o teratógenos).

La prevención primaria exitosa de estas malformaciones con ácido fólico, confirmada por estudios de elevada calidad, ha constituido el punto de partida de numerosas investigaciones sobre el metabolismo del folato y de la homocisteína (Hcy). Ya sea a causa de la heterogeneidad etiológica de los DTNs, de la falta de marcadores del status de folatos lo suficientemente sensibles y específicos, o de un enfoque demasiado simplista de este problema, la investigación sobre la etiopatoge-



nia de estas enfermedades, si bien ha sido y es muy intensa, no ha fructificado de forma enteramente satisfactoria.

La caracterización de este problema de salud en la isla de Mallorca desde múltiples perspectivas constituye el objeto de esta tesis. En ella se trata desde la epidemiología y la prevención de los DTNs hasta el estudio metabólico de las madres de los afectados. Esperamos que este enfoque que, por variado, ha sido muy laborioso, contribuya al planteamiento de dudas razonables y, por consiguiente, de hipótesis novedosas que nos permitan superar las hipótesis caducas y avanzar en el conocimiento de estas enfermedades tan invalidantes.

## 1.2 Justificación del proyecto

Nuestro interés por los DTNs en Mallorca surgió en 1997 a partir de las constataciones que siguen:

- Prevalencia de los DTNs en Mallorca aparentemente superior a otras áreas del Estado Español.
- Morbimortalidad importante de los afectados.
- Existencia de una estrategia de prevención primaria eficaz.
- Desconocimiento del mecanismo de acción de la prevención primaria.
- Posibilidad teórica de optimizar la prevención mediante la prescripción dirigida de folatos a la población de mujeres fértiles de riesgo elevado (p. ej. mujeres hiperhomocisteinémicas).

Una primera aproximación, mediante la consulta de los informes de alta con los códigos 740-759 (malformaciones congénitas de la novena revisión de la Clasificación Internacional de Enfermedades de la Organización Mundial de la Salud) del centro en el que trabajo (Hospital Son Dureta, centro de referencia para la Comunitat Autònoma Illes Balears) nos confirmó la pertinencia de seguir investigando sobre la importancia cuantitativa de los DTNs. De hecho, la falta de un registro de defectos congénitos en el archipiélago balear ha constituido un lastre importante para la realización de esta tesis, ya que antes de investigar la etiopatogenia de los DTNs desde la perspectiva bioquímica creíamos conveniente establecer unas bases epidemiológicas sobre las que construir el resto de la investigación. Al contrario, la centralización asistencial isleña durante la década de los 90 ha propiciado la confección de una base de datos de anomalías congénitas mayores.

La prescripción rutinaria de ácido fólico a nuestras gestantes (a raíz de la publicación de los resultados favorables de dos estudios experimentales, del Medical Research Council Vitamin Study Group<sup>7</sup> y del Programa de Planificación Familiar Húngaro<sup>8</sup>) era una iniciativa de los ginecólogos guiada, no sin oportunismo, por los fabricantes de las especialidades con folatos. En 1998 realizamos un trabajo sobre el uso de la prevención primaria en las gestantes atendidas en el Hospital Son Dureta<sup>9</sup> y objetivamos la prescripción injustificada, en calidad y cantidad, de los suplementos con folatos. El ácido folínico era objeto de monografías numerosas editadas por los laboratorios y diana de innumerables parabienes, a causa de una mayor biodisponibi-

lidad que, si bien es real, todavía no ha demostrado ser necesaria para una prevención primaria eficaz. La profusión de literatura científica sobre la relación del metabolismo de los folatos con múltiples enfermedades obstétricas fomentó también la difusión del uso de estas vitaminas más allá del periodo periconcepcional. Afortunadamente, la Medicina basada en la Evidencia se va instaurando como instrumento clave que nos ayuda a discernir entre lo necesario y lo superfluo, lo cual contribuye a la erradicación de las prácticas médicas que sin ser nocivas son costosas y posiblemente baldías.

La revisión retrospectiva del texto del proyecto de tesis doctoral me retrotrae al optimismo contenido que se vivió a finales de los 90 con respecto a la hiperhomocisteinemia como rasgo propio de las madres de los afectados por DTNs. Epígrafes como “Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects?” o “Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid.” provocaron la inmediata integración de la autora, investigadora neófita, en un grupo de estudio sobre este tema que se constituyó en nuestro hospital. Si se confirmaba que nuestra prevalencia total de DTNs era superior a la de otras áreas del Estado Español, no creía descabellado pensar que las alteraciones del metabolismo de la Hcy se mostrarían incluso con más vehemencia que en los estudios más novedosos del momento, máxime cuando la insularidad favorece la endogamia y, por ende, la propagación de genotipos anómalos. Pensamos que la adición de una serie de variables analíticas, que no se consideraban en la mayoría de estudios publicados en aquel momento, aumentaría el interés de nuestra investigación y nos permitiría especular sobre la etiopatogenia de las malformaciones que nos ocupan. Nuestro arrojo inicial nos impulsó a aventurar la utilidad de la Hcy como marcador de riesgo y de monitorización de la prevención primaria (ver título de nuestro proyecto becado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias, sección 1.6).

En definitiva, la visión holística que de los DTNs nos brinda esta tesis responde tanto a la inexistencia de un trabajo de base previo en nuestro entorno, como a la necesidad de vertebrar los conocimientos aportados por las distintas ramas científicas. La asunción ciega de una especialización médica excesiva puede convertirnos en meros agentes de los intereses de los laboratorios farmacéuticos y de los gestores de los centros sanitarios. En este contexto, la integración de las investigaciones básica y clínica mediante una comunicación fluida entre los profesionales de distintos niveles ha de redundar en una mejor práctica clínica y en una investigación más fecunda.

## 1.3 Objetivos

El *objetivo general* de esta tesis es caracterizar los DTNs hijos de madres residentes en Mallorca desde los puntos de vista epidemiológico, preventivo y metabólico. Para la consecución del mencionado fin nos hemos propuesto los siguientes *objetivos específicos* que son una transcripción prácticamente literal de los presentados en el proyecto de tesis:

- a) Calcular la prevalencia de los DTNs en la isla de Mallorca entre 1985 y el año anterior a la conclusión de la tesis doctoral (prevalencia total, prevalencia en nacidos vivos y mortinatos y contribución de los abortos inducidos a la prevalencia total). Clasificación de los mismos de acuerdo a los criterios de asociación o no a otros defectos (síndrome de Meckel, síndrome de bandas amnióticas o limb-body-wall complex, trisomía 18, etc.), o según la existencia de factores predisponentes o causales subyacentes.
- b) Analizar la evolución del diagnóstico prenatal de los DTNs en el intervalo de tiempo previamente especificado. Cuantificación de su repercusión sobre la prevalencia al nacimiento.
- c) Estudiar las características socioeconómicas y obstétricas de las madres de DTNs.
- d) Explorar si existe asociación entre la evolución de la prevalencia total y la toma de suplementos con folatos. Sería preciso que dicha profilaxis se evaluara en dos intervalos de tiempo separados por un año, al menos.
- e) Comparar las magnitudes analíticas relacionadas con el metabolismo del ácido fólico de los casos (madres de DTNs) con los controles (madres de niños sanos, sin enfermedades asociadas a la hiperhomocisteinemia).
- f) Valorar variables analíticas que escrutan el status de folatos durante el embarazo tanto en casos como en controles, aproximándonos de esta forma al periodo de máximo estrés del metabolismo de la Hcy: la gestación en general, y la organogénesis en particular.

## 1.4 Desarrollo

El inicio de esta tesis vino marcada por la selección y la revisión crítica de la bibliografía que me pareció más ilustrativa y rigurosa. Esta tarea ha sido ardua, a consecuencia del crecimiento exponencial de los trabajos publicados. De hecho, en la base de datos Medline, a mediados del año 2003, al buscar el término “neural tube defects” se obtenían 16 328 referencias, y al utilizar el término “homocysteine” aparecían 7751 referencias. Obviamente, he tenido que prescindir de numerosos artículos, y ello no hubiera sido necesario si el objeto de la tesis hubiera sido más concreto. La colaboración de las bibliotecarias por medio de la búsqueda de los trabajos publicados en revistas ausentes de los fondos bibliográficos del Hospital Son Dureta ha sido fundamental. Análogamente, la proliferación de documentos y bibliotecas acce-

sibles por medio de Internet ha contribuido a una revisión más exhaustiva. Una vez estudiados las revisiones y los artículos más emblemáticos, procedí a clasificar las diferentes publicaciones precedidas de sus correspondientes resúmenes y comentarios sobre los aspectos que consideraba más destacados, y a pergeñar la estructura de la tesis. Sin embargo, la constante publicación de nuevos trabajos ha precisado de una actualización bibliográfica permanente.

Los objetivos específicos enunciados en la sección anterior se han alcanzado de un modo variable, según se explica a continuación. Así, el objetivo a) se ha resuelto por medio del cálculo de las cifras de frecuencia entre 1990 y 2001, aunque la recogida de nuevos casos se ha extendido hasta el 31 de diciembre de 2002. No aportamos la casuística procedente de abortos inducidos o partos acontecidos en 2002 por no poder extender el periodo de captación hasta el año (criterio uniforme seguido para el cálculo de las prevalencias), a causa de la fecha de la presentación de esta tesis. Aunque disponemos de los casos detectados a partir de 1980, la exclusión del periodo 1980-1989 de nuestros cálculos obedece a las dudas sobre la cobertura de nuestros datos durante el mencionado intervalo, a causa de la difusión subóptima de la ecografía morfológica rutinaria, lo que ocasionaba que algunos casos diagnosticados en el sector sanitario privado al nacer no fueran remitidos al Hospital Son Dureta, debido a su alta mortalidad perinatal. Las cifras obtenidas se han especificado únicamente en forma de prevalencia total y de proporción de interrupciones voluntarias de embarazo, en aras de una mayor simplicidad. Al contrario, se ha ampliado este objetivo con la comparación de nuestras cifras con las de otras malformaciones mayores y con las de los registros de base poblacional españoles. En cuanto al objetivo b), sufre de las mismas limitaciones de cobertura que el a), sin embargo, se han incluido datos acerca del diagnóstico prenatal de los DTNs nacidos a partir de 1980. Lo mismo podemos decir con respecto al c). El objetivo d) se ha acometido en su totalidad y los años en los que la prevención primaria se ha escrutado corresponden a 1998 y a 2002. El punto e) incluía la determinación de una serie de magnitudes analíticas, a saber: Hcy, cisteína, glutatión y cisteinglicina totales en plasma; cobalamina sérica; folato en plasma y eritrocitos; polimorfismo C677T de la metilén-tetrahidrofolato reductasa. Como veremos en el capítulo correspondiente no se especifican para las participantes ni los valores de glutatión, ni de cisteinglicina, ni de folato eritrocitario. Las concentraciones de glutatión no se han transcrito, puesto que fue imposible centrifugar las muestras inmediatamente (de ahí el uso de 3-deazaadenosina) (capítulo 12). Al ser el glutatión predominantemente intracelular, mínimos grados de hemólisis pueden falsear los resultados. Además, el glutatión plasmático es sustrato de la enzima  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa que lo degrada y sus niveles habituales están en torno a 6  $\mu\text{mol/L}$ . Las medianas de las concentraciones de glutatión total obtenidas para nuestros casos y controles fueron de 1,8 y 1,5  $\mu\text{mol/L}$  respectivamente ( $p=0,015$ ), lo que respalda la presencia de una destrucción relevante *ex vivo*, circunstancia que resta rigor a nuestros resultados aunque la diferencia sea estadísticamente significativa. En la misma línea, las concentraciones de cisteinglicina se obviaron al ser este dipéptido un metabolito del glutatión. Con respecto al folato eritrocitario tampoco presentamos nuestros resultados en el capítulo correspondiente al no disponer de un número óptimo de casos con esta magnitud determinada (sólo 17) a causa de una serie de problemas técnicos. Por último, sólo nos resta decir que se desistió de la investigación mencionada en el punto f) tras la realización del pertinente estudio piloto, dado que entre los años 2000 y 2001 más del 80% de las

portadoras de un feto con DTN habían tomado folatos durante la gestación problema, circunstancia que falsea las concentraciones de la mayoría de magnitudes analíticas propuestas.

## **1.5 Estructura**

La tesis se divide en 14 episodios, incluyendo el actual, que es introductorio. El segundo trata de aspectos clínicos de los DTNs y el tercero de los costes derivados de las manifestaciones clínicas de esta enfermedad. Los capítulos 4, 5, 6 y 7 tratan de aquellos aspectos embriológicos, taxonómicos, preventivos y epidemiológicos necesarios para comprender la planificación y el desarrollo de la investigación original expuesta en el capítulo 8 sobre frecuencia, prevención y características más destacadas de los DTNs en nuestro entorno. Los episodios noveno y décimo exponen las bases conceptuales sobre las que se sustentan los DTNs y demás enfermedades folato-sensibles, ofreciendo una visión panorámica de estas enfermedades, lo cual nos será de gran utilidad a la hora de interrelacionar distintos conocimientos y plantear nuevas hipótesis. El capítulo 11 ilustra la tendencia de la prevención primaria mediante entrevista a las púerperas atendidas en nuestro centro a lo largo de cinco meses repartidos entre 1998 y 2002. El capítulo 12 expone las características de los métodos de laboratorio disponibles para la evaluación del metabolismo de los folatos y la Hcy, con especial énfasis en los utilizados en el capítulo 13 que desarrolla el objetivo específico e). Por último, el episodio 14 contiene las conclusiones finales.

## **1.6 Subvenciones**

Para la realización de las determinaciones analíticas expuestas en el capítulo 13 hemos contado con la financiación del Fondo de Investigaciones Sanitarias. El proyecto becado se denomina “Posibles etiopatogenias de los defectos del cierre del tubo neural en la población mallorquina. Utilidad de la homocisteína como marcador de riesgo y en la monitorización de terapias preventivas.” (número de expediente 99/0537).

## 1.7 Presentaciones previas de resultados

Los resultados de esta tesis se han presentado de forma parcial en las siguientes comunicaciones y sesiones:

- Prevención primaria de los DTNs en el Hospital Son Dureta. Comunicación. Reunión anual de la Sociedad Balear de Ginecología y Obstetricia. 27/11/99.
- Los defectos del tubo neural. Líneas de investigación. Sesión interservicios del Hospital Son Dureta. 24/2/00.
- DTNs y metabolismo de la homocisteína. Sesión del Servicio de Ginecología del Hospital Son Dureta. 13/3/00.
- Ácido fólico y defectos de cierre del tubo neural. Sesión de la Academia Médica Balear. 16/3/00.
- El polimorfismo C677T de la MTHFR i els defectes del tub neural. Comunicació para el fin del curso de Biomedicina Molecular de la Universitat de les Illes Balears. 3/7/00.
- Evaluación de la prevención de defectos congénitos en Mallorca (90-99). Sesión del Servicio de Ginecología del Hospital Son Dureta. 25/3/02.

Asimismo, parte de la investigación original expuesta en esta tesis se ha dado a conocer por medio de los siguientes escritos:

- Gibert MJ, Juncosa N, Martín I. Prevención primaria de los defectos del tubo neural en la población atendida en un hospital de referencia. Prog Obstet Ginecol 2000;43:13-20.
- Gibert MJ, Martín I, Juncosa N. Prevalencia total de una serie de anomalías congénitas en la isla de Mallorca durante la década de los 90. Prog Obstet Ginecol 2003;46:208-16.
- Martín I, Gibert MJ, Pastor M, Obrador A. Folatos, homocisteína y defectos del tubo neural [carta]. Med Clin (Barc) 2003;121:197-8.
- Gibert MJ, Martín I. Interrupción voluntaria del embarazo por anomalías congénitas en Mallorca en la década de los 90. Prog Obstet Ginecol. En prensa 2003.
- Gibert MJ, Martín I, Ramos M. Uso de folatos para la prevención de los defectos del tubo neural en la población atendida en un hospital de referencia [carta]. Med Clin (Barc). En prensa 2003.
- Martín I, Gibert MJ, Hernanz A, Llompart E, Malo O. Lower plasma homocysteine and serum folate, increased transsulfuration and lack of association with C677T polymorphism in mothers of neural tube defects from Majorca (Spain). Remitido a la revista Clinical Nutrition.

## 1.8 Agradecimientos

Mediante las siguientes líneas deseo reconocer la inestimable ayuda que me han prestado las siguientes personas y colectivos en la realización de esta tesis:

- Mi familia y Mariana Sarra: por su apoyo incondicional y por relevarme en mis tareas domésticas.
- Participantes del estudio presentado en el capítulo 13. A las madres de los afectados gracias, y a los controles, de nuevo gracias por su colaboración y su solidaridad con aquellas mujeres que no han tenido la gran suerte de alumbrar hijos sanos.
- Asociación Balear de Espina Bífida: Cristina Elías.
- Hospital Son Dureta: personal de Archivos, Dr. Carlos Campillo (Comité de Dirección), Sras. Carmen García y María Luisa López de Soria (Biblioteca Científica), Sra. Juana Llabrés y Dra. Inmaculada Martín (Análisis Clínicos), Dr. Francesc Puigventós (Farmacia), Dr. Rafael Ramos (Anatomía Patológica), Dr. Jordi Rosell (Genética), Sra. Carmen Toral (Análisis Clínicos), Sr. Joan Tortell (Documentación Clínica), Dr. Manuel Usandizaga (Obstetricia y Ginecología).
- Hospital de Manacor: Sr. Jaime Artero (Documentación Clínica), Dr. Andrés Calvo (Obstetricia y Ginecología).
- Atención Primaria: Sra. Francisca Pons, Dra. Maria Ramos.
- Cooperativa d'Apotecaris: Sr. Juan Carlos Estelrich.
- Institut Balear d'Estadística: Sra. Silvia Carretero.
- Registre de Defectes Congènits de Barcelona: Dr. Joaquín Salvador.
- Unitat de Planificació de Salut, Conselleria de Salut: Dra. Àngels Pujol.
- Universitat de les Illes Balears: Dra. Catalina Picó.

## 1.9 Bibliografía

1. Langman J. Periodo embrionario (cuarta a octava semanas). En: Embriología médica. 4ª ed. México: Editorial Médica Panamericana; 1985. p. 63-80.
2. Campbell LR, Sohal GS. The pattern of neural tube defects created by secondary reopening of the neural tube. *J Child Neurol* 1990;5:336-40.
3. O'Rahilly R. Developmental stages in human embryos. Disponible en URL: [http://www.natmeduse.afip.org/embryo/html/table\\_stages.html](http://www.natmeduse.afip.org/embryo/html/table_stages.html) (acceso 23/12/02).
4. Van Allen MI, Kalousek DK, Chernoff GF, Juriloff D, Harris M, McGillivray BC, y cols. Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans. *Am J Med Genet* 1993;47:723-43.
5. Van Allen MI. Multisite neural tube closure in humans. *Birth Defects: Original Article Series* 1996;30:203-25.
6. Sakai Y. Neurulation in the mouse: manner and timing of neural tube closure. *Anat Rec* 1989;223:194-203.
7. MRC Vitamin Study Group. Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991;338:131-7.
8. Czeizel AE, Dudás I, Metneki J. Pregnancy outcomes in randomised controlled trial of periconceptional multivitamin supplementation. Final report. *Arch Gynecol Obstet* 1994;255:131-9.
9. Gibert MJ, Juncosa N, Martín I. Prevención primaria de los defectos del tubo neural en la población atendida en un hospital de referencia. *Prog Obstet Ginecol* 2000;43:13-20.





## 2 Clínica, pronóstico y tratamiento de los defectos del tubo neural

### 2.1 Tipos de anomalías del tubo neural

Los defectos del tubo neural (DTNs) comprenden básicamente las siguientes entidades: anencefalia, iniencefalia, encefalocele, espina bífida y craneorraquisquis<sup>1,2</sup>. Sin embargo, existen clasificaciones mucho más complejas que introducen otras malformaciones, que a pesar de no ser propiamente anomalías del cierre del tubo neural, se asocian a ellas con cierta frecuencia<sup>3,4</sup>, esto es, los lipomas espinales, los senos neurodérmicos, las malformaciones con médula hendida, la deformidad de Arnold-Chiari, o la agenesia sacra (capítulo 4). Por otra parte, estas malformaciones se pueden dividir en abiertas y cerradas u ocultas, según la exposición del tejido neural. En las abiertas, el tejido neural está desprovisto de su cubierta cutánea, lo que conlleva la pérdida de líquido cefalorraquídeo (licuorrea) con la consiguiente repercusión en todo el sistema nervioso central (SNC); en las cerradas, la piel protege los tejidos neurales del medio externo, por lo que estos defectos suelen ser localizados. Como se verá, la licuorrea tanto a partir de un defecto abierto como de uno cerrado con la piel denudada (p.ej. algunos encefalocelos) fundamenta el diagnóstico prenatal bioquímico (capítulo 6).

### 2.2 Anencefalia<sup>2-6</sup>

Se define como un defecto extenso de la calota craneal (acrania), las meninges y el cuero cabelludo junto a un encéfalo rudimentario. Entonces, el cerebro fetal está constituido por tejido conjuntivo, vasos y neuroglía (*area cerebrovasculosa*). Generalmente, los hemisferios cerebrales y el cerebelo están ausentes, mientras que se hallan presentes restos del troncoencéfalo y núcleos cerebrales que, incluso, pueden estar bien formados. Hay hipoplasia de la hipófisis y la ausencia de córtex cerebral determina la falta de los haces piramidales espinales. Los ojos y los pabellones auriculares son prominentes, mientras que el resto de estructuras faciales parecen normales. El 50% de los casos se asocian a polihidramnios y el 20% a otras anomalías, entre las que destacan las fisuras labiopalatinas, las cardiopatías congénitas, los genitales ambiguos y la gastrosquisis<sup>7-9</sup>. Es mucho más frecuente en mujeres que en varones<sup>8-10</sup>.

La anencefalia (encéfalo retraído o “ausente”) es la consecuencia de la exposición directa de un tejido cerebral bien diferenciado, protruyente por encima de las órbitas (exencefalia) a un entorno intrauterino hostil, lo que causa su degeneración y desaparición<sup>11-3</sup>.

Este defecto es letal, o bien antenatalmente, o bien en los primeros días de vida extrauterina<sup>14-5</sup>; aunque se han descrito casos aislados de supervivencias más largas<sup>16</sup>.

## 2.3 Iniencefalia

Es una malformación de la charnela cérvico-occipital que implica al occipucio (inion) y al encéfalo (encefalia). Su diagnóstico se basa en la tríada<sup>17-9</sup> que sigue:

1. Defecto de la escama occipital con ensanchamiento del foramen magno.
2. Anomalías del arco posterior (disrafia o raquisquis) cervicales.
3. Hiperextensión cefálica con lordosis cérvico-dorsal extrema.

La disrafia se puede extender a las vértebras torácicas e incluso lumbares. Si no se asocia a anencefalia, existe la parte más anterior de la bóveda craneal<sup>5</sup>. Externamente, los fetos afectados tienen la cabeza hiperextendida y su occipucio parece fusionarse con la parte alta del raquis.

En el 50-85% de los casos, la iniencefalia acompaña a otros defectos<sup>20-2</sup>, entre los cuales destacamos la anencefalia, el encefalocele posterior, las malformaciones génito-urinarias, las cardiopatías congénitas, la hipoplasia pulmonar, la hernia diafragmática, el onfalocele, la arteria umbilical única, las fisuras labiopalatinas, la fosa nasal única y los pies zambos. No se suele asociar a cromosomopatías<sup>23</sup>.

Esta anomalía, al igual que la anencefalia, también predomina en el sexo femenino<sup>19,23</sup>. El retraso de crecimiento intrauterino<sup>19</sup> y el polihidramnios son frecuentes<sup>18</sup>.

Jeanne-Pasquier y cols. hallaron 202 descripciones de iniencefalia en la literatura médica hasta el año 2000, lo cual es indicativo de la rareza de la misma<sup>19</sup>. La letalidad de este defecto es muy alta y sólo hay constancia en la bibliografía de cinco supervivientes<sup>17,24</sup>, a pesar de que las secuelas son importantes.

La hiperextensión cefálica es causa de parto estacionado a partir de las 30 semanas de amenorrea aproximadamente. La cesárea puede obviarse en aquellos países en los que el aborto no esté legalizado mediante la inducción precoz del parto<sup>18</sup>.

## 2.4 Encefalocele<sup>2-6</sup>

Defecto de la calota que permite el paso de parte del contenido intracraneal. Constituye una tumoración cubierta por piel y puede ser pediculada o sésil, con un tamaño muy variable. Se suele situar en la línea media (cráneo bifido), pero es posible hallarlo en cualquier lugar de la bóveda o de la base craneales, en la cavidad nasal o en la nasofaringe. Las ubicaciones más frecuentes son la occipital (65% de los casos), la frontoetmoidal (25%) y la parietal (10% de los casos).

En su localización occipital emerge a la altura del inion o por debajo del mismo. Recordamos que el inion es una protuberancia del hueso occipital, situada centralmente en la parte posterior de la base del cráneo y que marca el inicio del cuello.

Los meningoencefalocelos frontoetmoidales no muestran fácilmente su unión al resto de parénquima cerebral y tampoco es fácil localizar la solución de continui-

dad ósea de la que emergen. Estas variedades se denominan también *gliomas nasales*, aunque este término induce a error, puesto que dichas lesiones no son neoformaciones; asimismo, pueden ser externos o internos (masa intranasal, obstrucción faríngea, meningitis recurrente). No es infrecuente que en el individuo afectado concurren otros defectos como hipertelorismo, labio leporino central o disfunción hipotalámica. Esta modalidad, en su forma aislada, es más frecuente en el Sudeste de Asia, mientras que la occipital es más prevalente en Occidente.

Según su contenido tisular distinguimos:

- a) Cráneo bífido oculto: o persistencia de un orificio craneal, generalmente en la línea media, que no se acompaña del desplazamiento de estructuras intracraniales. Existe una forma hereditaria, según un patrón autosómico dominante, denominada forámenes parietales persistentes o “marcas de Catlin”<sup>25</sup>.
- b) Meningocele: únicamente contiene meninges.
- c) Meningoencefalocele: incluye meninges y tejido cerebral (córtex, cerebelo, troncoencéfalo, tejido neural displásico o tejido glial). La herniación cerebelosa a través de un defecto óseo de la fosa posterior recibe la denominación de malformación de Chiari de tipo III.
- d) Encefalocistocele: constituido por el prolapso de meninges, encéfalo y parte del sistema ventricular.

Los meningoceles suelen tener buen pronóstico, mientras que los encefaloceles son causa de problemas visuales, microcefalia, retraso mental y convulsiones. Sin embargo, la mayoría de los encefaloceles pueden operarse, e incluso los más grandes suelen contener tejido neural heterotópico que se puede extirpar sin dejar secuelas funcionales graves (sólo el 30% de encefaloceles occipitales contienen córtex cerebral normal). Aproximadamente un 60% de los pacientes requieren una derivación ventricular postquirúrgica. Su perspectiva de cociente intelectual (CI) no es demasiado halagüeña y se sitúa en torno al 70. El pronóstico es más favorable en los encefaloceles anteriores (100% de supervivencia y CI superior a 80 en el 70% de los casos).

La mitad de los meningoencefaloceles se presentan aisladamente y la otra mitad se asocia a otros defectos:

- Neurológicos: es lo más frecuente. Destacan la hidrocefalia secundaria a estenosis del acueducto de Silvio, el síndrome de Dandy-Walker o la malformación de Arnold-Chiari; y la microcefalia.
- Extraneurológicos:
  - Síndromes polimalformativos, tal es el caso del síndrome de Meckel-Gruber<sup>26</sup> (entidad de herencia autosómica recesiva que integra encefalocele occipital, microcefalia, microftalmía, fisura labiopalatina, riñones poliquísticos, genitales anormales y polidactilia); del síndrome de Walker-Warburg<sup>27</sup> (herencia autosómica recesiva, se caracteriza por encefalocele occipital, microcefalia, alteraciones de la giración del córtex cerebral, ausencia de conductos auditivos externos, ceguera, fisura labiopalatina, displasia renal, genitales anormales, contracturas de extremidades, distrofia muscular y aumento de la creatinfosfoquinasa sérica); o del de Roberts<sup>28</sup> (de herencia autosómica recesiva, agrupa:

encefalocele frontal, microcefalia, microftalmía con hipertelorismo y ojos prominentes, pabellones auriculares bajos y alobulados, micrognatia, fisura labiopalatina, cardiopatías septales, riñones poliquísticos o en herradura, genitales anormales, contracturas de extremidades y retraso pondoestatural severo).

- Disrupciones: los encefaloceles no mediales son candidatos a ser secundarios a una disrupción. El síndrome de las bandas amnióticas<sup>29</sup> es el paradigma más claro. Éste no tiene causa conocida y se caracteriza por la coexistencia en un mismo feto de amputaciones de extremidades, bandas amnióticas, anencefalia/encefalocele, fisura labiopalatina, celosomía y gastrosquisis.

## 2.5 Craneorraquisquisis<sup>6</sup>

También denominada raquisquisis, es la coexistencia de anencefalia y de disrafia vertebral, al menos en la región cervical, en un mismo individuo. En la mayoría de las ocasiones, se asocia a polihidramnios y a muerte fetal anteparto. En algunos casos, los afectados pueden nacer vivos, pero fallecen al poco tiempo de su nacimiento. Las funciones neurológicas preservadas se limitan a las reflejas tronculares y espinales. Las convulsiones se presentan en ciertos casos.

La confluencia de anencefalia con disrafia cervical puede inducir a errores terminológicos, puesto que tanto se puede adscribir a iniencefalia complicada con anencefalia como a craneorraquisquisis. En estos casos, la hiperextensión cefálica decidirá su inclusión en una u otra modalidad. Como la retroflexión puede ser leve, moderada o grave, parece razonable que sólo los grados más severos se califiquen como iniencefalías y los más leves como craneorraquisquisis<sup>30</sup>.

## 2.6 Agenesia del sacro<sup>5,31-2</sup>

Puede presentarse aisladamente o incluir también la región lumbar (agenesia lumbo-sacra). Su repercusión neurológica dependerá de las vértebras ausentes. En su forma mayor o síndrome de regresión caudal, se observan algunas particularidades, como su elevada incidencia en la embriofetopatía diabética y su asociación a otras malformaciones (extrofia vesical, agenesia anal, etc.). La forma más habitual o agenesia sacra es compatible con la vida. Si se asocia a agenesia lumbar, aparecen dismetría, deformación y amiotrofia de extremidades inferiores con artrogriposis secundaria, cifosis lumbar, incontinencias urinaria y fecal; además se puede asociar a anomalías renales y luxación congénita de cadera.

En general, esta condición puede hallarse en cuatro circunstancias:

- a) En hijos de madres diabéticas.
- b) En las familias en las que existen espinas bífidas; la agenesia sacra alterna con la espina bífida según una forma de herencia autosómica dominante.

c) En un cuadro polimalformativo (VACTERAL).

d) En un cuadro de celosomía inferior y media.

## 2.7 Espina bífida<sup>2,4,6,31,33</sup>

### 2.7.1 Clasificación y generalidades

La espina bífida se debe a la ausencia de fusión (disrafia, raquisquisis) de las apófisis espinosas vertebrales. Aunque las clasificaciones existentes son múltiples, hemos escogido la que nos ha parecido más clara. Entonces, distinguimos la espina bífida quística y la oculta o cerrada. La variedad quística se subdivide en meningoceles, mielomeningoceles, lipomeningoceles/lipomielomeningoceles y mielocistoceles. Así, la *espina bífida oculta o cerrada* sólo afecta el anillo óseo vertebral, manteniéndose el resto de las estructuras vecinas en su posición anatómica normal; el *meningocele* implica además prolapso de las meninges y aparición de una tumoración a dicho nivel; el *mielomeningocele (MM)* incluye el desplazamiento de la médula espinal que se halla dentro de la tumoración meníngea.

La modalidad quística es la más frecuente (85% de los casos), mientras que la oculta supone el 15% restante. La localización predominante es la lumbar y/o sacra. El 99,5% de estas tumoraciones son dorsales y se adhieren al plano cutáneo, de aspecto normal o con angiomas planos. Una minoría (0,5%) son ventrales, siendo la modalidad más prevalente el meningocele sacro anterior, que se suele diagnosticar en las mujeres a partir de una masa pélvica, lumbalgia, dispareunia, estreñimiento o dificultades urinarias en progresión.

La espina bífida es ligeramente<sup>34</sup> más frecuente en el sexo femenino<sup>34</sup>, principalmente si el nivel de afectación es torácico<sup>9,35-7</sup>. Aproximadamente un 15% se asocian a otras malformaciones no neurales<sup>38-40</sup>, entre las que destacan por su mayor frecuencia las cardiopatías, las nefropatías, la atresia anal y las fisuras labiopalatinas<sup>41</sup>.

### 2.7.2 Espina bífida abierta

Las formas más frecuentes son el MM y el meningocele, seguidas por el lipomeningocele/lipomielomeningocele, y el mielocistocele que es una variedad rara. Las características más sobresalientes de cada una de ellas se especifican a continuación:

- a) MM: tumoración que protruye a través del defecto óseo espinal y está constituida de fuera adentro por aracnoides, médula espinal y raíces nerviosas. Su coloración es rojiza o amarillenta y está surcada por vasos finos. Es frecuente que la médula espinal finalice dentro de este saco y que se halle abierta, mostrando el canal epidural (placoda neural o placa medular). Esta categoría se asocia a otras manifestaciones, principalmente neurológicas, locales y a distancia, que ensombrecen su pronóstico.

- b) MM ulcerado: es menos frecuente y más grave que la entidad anterior, ya que la médula espinal queda descubierta por completo. Aparece como una tumoración redonda u oval de color rojo oscuro en su parte central, que corresponde a la médula sin protección. Rodeando a la anterior, existe una zona de color gris o blanco brillante, que es la piamadre. Por fuera de ella se continúa la piel del dorso, de color rojo, con frecuentes zonas telangiectásicas. Los orificios superior e inferior del epéndimo aparecen como dos fositas, una cefálica y otra caudal, situadas a ambos extremos de la placa medular. La gravedad de esta forma, dejada a su evolución espontánea, viene dada por la meningitis ascendente secundaria a la exposición tisular. Puede ocurrir que durante la vida intrauterina la placa medular se recubre por una fina capa epitelial y al nacimiento se presente como forma cerrada. La piel que cubre la tumoración es fina y transparente en su parte central, aumenta de grosor hacia la periferia y se continúa con la piel normal de alrededor. En ocasiones, cordones fibrosos atraviesan la piel central y en algunos casos el epéndimo sufre una dilatación quística en la zona de fijación, constituyendo el mielocistocele (ver más adelante).
- c) Meningocele: la disrafia espinal únicamente causa prolapso de las meninges, pero la médula espinal y sus raíces permanecen normosituadas. Su cubierta externa es normalmente cutánea. El pronóstico es mucho mejor que en el supuesto anterior, dado que no se acompaña de otras alteraciones neurológicas. Su tratamiento es quirúrgico, generalmente a los seis meses de edad si no hay peligro de ruptura de la tumoración.
- d) Lipomeningocele/lipomielomeningocele: ambos términos son sinónimos y se refieren a una masa cubierta por piel, originada en el tejido celular subcutáneo y que se extiende a la duramadre y al espacio intradural, produciendo anclaje medular a un nivel inferior y más dorsal que en condiciones normales. Dicha tumoración puede adherir las raíces nerviosas dorsales y ventrales, únicamente las dorsales, o sólo el cono medular y el filum terminale. Es más frecuentemente sésil que pediculada. Al vincularse únicamente a anomalías neurológicas locales tiene un pronóstico intermedio entre el MM y el meningocele. Antes de que aparezcan síntomas neurológicos, lo mejor es liberar la médula del lipoma mediante láser. Se prefiere intervenir a los dos o tres años de vida, puesto que a esta edad es más fácil valorar la existencia de trastornos neurológicos.
- e) Mielocistocele: dilatación terminal de la médula espinal secundaria a hidromielia (dilatación del canal ependimario). Externamente es una tumoración voluminosa cubierta por piel.

### 2.7.3 Espina bífida oculta<sup>42</sup>

Esta forma de disrafismo espinal se incluye pocas veces en los estudios de DTNs tanto a causa de su dificultad diagnóstica como por su relación dudosa con la espina bífida abierta<sup>43</sup>. Son fisuras de los arcos vertebrales sin prolapso meníngeo ni neural. Su localización más corriente es L5 y S1. Suelen afectar a una sola vértebra,

aunque en una minoría de casos el defecto es más extenso.

Externamente se asocia a alteraciones cutáneas regionales: pilosidad, nevus vasculares planos o retracciones en forma de fosillas. Los senos neurodérmicos también pueden coexistir con la espina bífida oculta, así como con los encefaloceles, y consisten en un pequeño orificio en la piel en continuidad con un canalículo que, a su vez, puede atravesar la duramadre constituyendo una puerta de entrada para aquellas bacterias causantes de meningitis. Destacamos que los signos cutáneos se localizan por encima del surco interglúteo, mientras que si son inferiores pensaremos en una entidad benigna, y extraneurológica, tal es el caso del sinus pilonidal.

Esta condición suele ser asintomática, y en los pocos casos en que se produce anclaje medular, se manifiesta mediante cualquiera de los siguientes síntomas: hipostesia, disestesia y paresia de extremidades inferiores; malposiciones de pies; incontinencia urinaria e infecciones urinarias recurrentes; lumbalgia y alteraciones posturales. El inicio de la clínica es variable, aunque es más frecuente en la adolescencia, a causa del rápido crecimiento del raquis con relación a la médula.

El diagnóstico precisa del uso de técnicas de imagen como la radiografía simple o la resonancia nuclear magnética (RNM). La resonancia nos ayuda a averiguar si la médula está anclada o hay otras lesiones medulares concomitantes como las malformaciones con médula hendida (diplo mielia o diastematomielia) y la siringomielia (cavitación parasagital de la médula espinal cuyas paredes están constituidas por tejido glial).

El tratamiento sólo es necesario en aquellos casos con médula anclada. La cirugía precoz es de elección, antes de que la sintomatología previamente descrita empeore, puesto que si bien se recupera la motilidad de las extremidades, es difícil la restitución de la función vesical perdida<sup>44-6</sup>.

## **2.7.4 Clínica del mielomeningocele**

Las importantes lesiones del SNC repercuten extensamente en el resto del organismo, por lo tanto, no es exagerado el considerar al MM como una enfermedad multiorgánica, como veremos.

### **2.7.4.1 Clínica neurológica**

Los síntomas y signos neurológicos pueden ser tanto locales o derivados directamente de la lesión medular, como a distancia o secundarios a la repercusión de la agresión primaria sobre el resto del SNC.

#### **2.7.4.1.1 Clínica neurológica local**

Se origina en la afectación de la médula espinal o de sus raíces nerviosas.

Comprende trastornos motores, sensitivos y tróficos, con sus consiguientes repercusiones ortopédicas. Su extensión depende del nivel lesional (tabla 2.1). Aun con todo, no hay una correspondencia exacta entre el nivel de la lesión determinado según los segmentos vertebrales disráficos y según la exploración física (dermatomas, miotomas). Como la médula es más corta que el canal vertebral, “a priori” parece que el nivel de afectación sensitivomotora tendría que ser más bajo (o “menor”) que el vertebral. Los estudios al respecto nos aportan resultados discordantes<sup>47-8</sup> que, probablemente, dependan de la edad del paciente, de los criterios de valoración utilizados, del peso del paciente y de la propia evolución de la enfermedad (hidromielia, médula anclada, etc.).

**Tabla 2.1.- Alteraciones neurológicas de la espina bífida según el nivel lesional medular.**

<b>Nivel lesional</b>	<b>Clínica</b>
<i>D12-L1</i>	Paresia e hipoestesia del suelo de la pelvis y de las extremidades inferiores
<i>L2-L4</i>	Luxación de la cadera Genu recurvatum Pie equinvaro
<i>L5</i>	Flexión de la cadera sin luxación Movilidad del cuádriceps conservada con ligera limitación de la flexión de la rodilla Pie valgo
<i>S1</i>	Pie en balancín Trastornos sensitivos en silla de montar y plantares
<i>S2-S4</i>	Vejiga neurógena Incontinencia anal

### 2.7.4.1.2 Clínica neurológica a distancia

En la tabla 2.2 se enumeran las alteraciones anatómicas responsables y su frecuencia, pero sus características se comentan detalladamente en los párrafos siguientes.

**Tabla 2.2.- Defectos neurológicos asociados al mielomeningocele.**

<b>Tipo de defecto</b>	<b>Porcentaje aproximado de pacientes afectados</b>
Malformación de Chiari tipo II	90%
Hidrocefalia	90%
Siringomielia	88%
Anomalías tronculares y de pares craneales	75%
Heterotopias cerebelosas	40%
Heterotopias cerebrales	40%
Polimicrogiria, paquigiria	15-30%
Agenesia del cuerpo calloso	12%



La *malformación de Chiari de tipo II* es el prolapso por debajo del foramen magno del vermis cerebeloso, del troncoencéfalo y del cuarto ventrículo. Su patogenia es controvertida, aunque la hipótesis más aceptada apunta a que la mielosquisis dorsal permite el escape de líquido cefalorraquídeo (LCR) hacia la cavidad amniótica, con el consiguiente colapso de los ventrículos embrionarios<sup>49-50</sup>. El diagnóstico confirmatorio postnatal de esta complicación se efectúa mediante corte sagital craneal obtenido con RNM. La prodigalidad con la que se indica esta técnica de imagen en estos pacientes ha causado un incremento del diagnóstico de esta condición; sin embargo, sólo si es sintomática precisa descompresión quirúrgica. Los síntomas que nos pueden orientar son los propios de la compresión troncoencefálica: estridor, disfagia, o cuadriparesia progresiva. En otras ocasiones, la clínica es más sutil y se presenta en forma de estrabismo progresivo, nistagmo, mielopatía o neumonía aspirativa. Aun con todo, son muy pocos los pacientes que requieren cirugía de este defecto después del primer año de vida. En el 80-90% de los casos se asocia a siringomielia, cuyo empeoramiento progresivo conduce a deterioro neurológico a medio plazo. La anomalía de Chiari sintomática es un factor de pronóstico adverso, ya que el 30% de los niños que desarrollan clínica troncular fallecen antes de los cinco años de vida.

La *hidrocefalia* aparece como consecuencia de la deformidad de Chiari y/o estenosis del acueducto de Silvio. El 20% de los pacientes tienen hidrocefalia al nacer y otro 70% de los mismos la desarrollan tras el cierre quirúrgico del MM. La hidrocefalia postquirúrgica se atribuye al refuerzo del obstáculo secundario a la deformidad de Arnold-Chiari y/o a la pérdida de capacidad de reabsorción del LCR por parte del saco del MM. El tratamiento consiste en la inserción de una derivación ventricular, sin embargo, los criterios de indicación de descompresión varían en los distintos servicios neuroquirúrgicos<sup>51-2</sup>. Entonces, en algunos centros se coloca la derivación en el transcurso del cierre del MM, mientras que en otros se espera a que la circunferencia cefálica aumente varios percentiles en un intervalo corto. Los neurocirujanos partidarios del uso liberal de las derivaciones argumentan que su inserción durante la cirugía del MM evita una ulterior exposición a la anestesia y evita la tensión en la zona de cierre del MM. La necesidad de descompresión es más frecuente en el MM ulcerado y en los niveles lesionales más altos<sup>48</sup>.

La *siringomielia*<sup>53</sup> se asocia a la deformidad de Chiari o a al anclaje medular en más de la mitad de las ocasiones. Su sintomatología es el resultado de la afectación progresiva de los haces espinotalámicos (alteración de las sensibilidades dolorosa y térmica), corticoespinales (debilidad y espasticidad de extremidades inferiores) y de las astas medulares anteriores (paresia, atrofia muscular segmentaria y fasciculaciones). La neurocirugía no suele revertir la sintomatología neurológica ya establecida.

En aquellos casos más severos, esto es, pacientes que sufren dificultades ventilatorias al poco tiempo de nacer, es frecuente hallar diversas anomalías al realizar la necropsia, tales como *núcleos troncoencefálicos desorganizados*. Sin embargo, otras anomalías como las *heterotopias encefálicas*, la *polimicrogiria*, la *paquigiria*, o la *agenesia del cuerpo calloso* se suelen detectar con la RNM y se atribuyen a anomalías de la migración neuronal.

Aproximadamente el 20% de afectados tienen *epilepsia* establecida<sup>54</sup>, la cual tiene base orgánica en la mayoría de los casos<sup>55</sup> (malformaciones del SNC, encefalo-

lomalacia o anoxia).

El *anclaje medular* no sería infrecuente como diagnóstico anatómico si efectuaráramos una RNM a todos estos pacientes. Afortunadamente, no todos los casos son sintomáticos, aunque la presencia de síntomas de fijación medular aumenta con el envejecimiento. Se estima que un 30% de estos individuos desarrollan “de novo” fijación medular sintomática, lo que constituye indicación de exploración quirúrgica de la médula espinal que redundará en estabilización o mejora de los síntomas en el 97% de los intervenidos<sup>56</sup>.

### 2.7.4.2 Clínica extraneurológica

La complejidad del manejo de estos pacientes radica en la aparición de una larga serie de complicaciones, es decir, la vejiga neurógena, la disfunción sexual, los trastornos de la defecación, los problemas ortopédicos, la alergia al látex, las alteraciones visuales, los déficits intelectuales, la obesidad, la talla baja y las lesiones cutáneas.

La *vejiga neurógena* causa trastornos psicosociales si hay incontinencia, y también puede repercutir sobre la función renal si hay reflujo vesicoureteral. Se calcula que el 80-90% de los pacientes padecen incontinencia urinaria. Según las raíces nerviosas afectadas habrá diferentes modalidades de vejiga neurógena, cuyas categorías obedecen a la tonicidad del detrusor y a la función del esfínter uretral externo:

- Vejiga hipotónica y esfínter relajado: producen goteo miccional permanente que se exacerba con las maniobras de Valsalva. Al no existir retención urinaria, no hay reflujo y, por lo tanto, no hay repercusión renal.
- Vejiga hipotónica y esfínter hipertónico: hay incontinencia por rebosamiento y retención urinaria, con la consiguiente repercusión renal.
- Vejiga hipertónica y esfínter relajado: se emiten chorros de orina involuntariamente, pero no hay acúmulo de orina en la vejiga.
- Vejiga hipertónica y esfínter contraído: en general, la orina se emite a gran presión de forma incontrolada, además la presión vesical aumentada causa reflujo y lesión renal subsiguiente.

Las lesiones por encima de S3 se asocian con incoordinación entre el detrusor y el esfínter uretral externo, mientras que si están por debajo de S2 la vejiga es hipotónica. Los controles nefrourológicos seriados (análisis de orina, residuo postmiccional ecográfico, pruebas de imagen, etc.) son preceptivos. Se suelen precisar fármacos anticolinérgicos, cateterización urinaria intermitente e incluso intervenciones antirreflujo. Con todas estas medidas, se alcanza la continencia social hasta en el 80% de los pacientes<sup>56</sup>. Cuando lo anterior no es efectivo, se recurre a derivaciones urinarias permanentes (vejigas sigmoideas). También se puede conseguir la continencia con la implantación de esfínteres artificiales.

La *función sexual* se ve alterada en no pocos enfermos. De hecho, en una serie japonesa sólo el 67% de los varones podían eyacular, y únicamente el 27% de los mismos consideraban que su rigidez peniana era suficiente; en cuanto a las mujeres,

sólo el 19% conseguían satisfacción con la estimulación perineal<sup>57</sup>. Además, la actividad sexual es poco frecuente en estos pacientes<sup>57-8</sup>, lo que se puede atribuir tanto a su disfunción como a las barreras sociales que se levantan ante este tipo de pacientes.

La *incontinencia anal* se ve compensada por la constipación de origen neurológico que facilita la higiene del paciente. Una defecación regular se consigue mediante el control dietético, la extracción manual, los enemas y otros fármacos laxantes.

Los *problemas ortopédicos* son variados, así los defectos por encima de L2 tienen mayor probabilidad de acompañarse de cifoescoliosis, luxación de caderas o pie zambo. La escoliosis aparece al menos en la mitad de los enfermos y requiere la fusión espinal en el 40% de los mismos<sup>56</sup>; suele manifestarse postnatalmente y empeora con el envejecimiento y a mayor altura lesional. Parece que el deterioro del control muscular secundario a la deformidad de Chiari y a la siringomielia contribuye a su aparición y progresión<sup>59</sup>. Estos trastornos dificultan la deambulación que precisará del concurso de técnicas de rehabilitación, apoyos externos e, incluso, de cirugía. Algunos individuos lograrán deambular con relativa normalidad, mientras que otros sólo lo van a hacer en su domicilio, con o sin ayuda de apoyos o bitutores. La marcha necesita que los músculos flexores de la cadera, los aductores y los cuádriceps estén fuertes. Si hay lesión por encima de L3 no se suele deambular, y por debajo de S1 se puede andar sin ayuda. Los afectados inician la marcha más tarde que los demás niños<sup>60</sup> y pueden perderla según envejecen<sup>61</sup>.

El riesgo de *alergia al látex* es mayor en estos enfermos que en otros de características similares pero con lesión medular traumática<sup>62</sup>. La sensibilización a esta sustancia se atribuye fundamentalmente a la presencia del MM<sup>63</sup>, mientras que la frecuente exposición al látex juega un papel menos destacado<sup>64</sup>. Aunque hasta el 72% de niños con espina bífida son alérgicos al látex<sup>65</sup>, se puede reducir esta cifra si se siguen las recomendaciones de la Academia Americana de Alergia, Asma e Inmunología que aconsejan evitar el uso del látex en el entorno sanitario<sup>66-8</sup>.

En una serie de 322 niños<sup>69</sup> se objetivaron *problemas oculares* en el 73%, destacando el estrabismo. Además, en el 70% de derivaciones ventriculares no funcionantes se hallaron signos papilares de hipertensión endocraneal. La aparición súbita de alteraciones de la motilidad ocular o de papiledema en estos pacientes nos hará sospechar la existencia de hidrocefalia activa.

Con respecto a la *inteligencia*, el CI promedio de estos pacientes está por debajo del poblacional, aunque se mantiene dentro de los límites de la normalidad. De hecho, los CIs del 35% de los pacientes están al menos 15 puntos por debajo de los de sus hermanos<sup>70</sup>. Las puntuaciones peores corresponden a las áreas manipulativa, aritmética y de integración visuomotora<sup>71-3</sup>. Los factores que influyen negativamente sobre la inteligencia de estos pacientes son: ventriculitis, anoxia, hidrocefalia de difícil control, porencefalia<sup>74</sup>, cirugía aplazada hasta el trigésimo día de vida o más, valores de circunferencia cefálica alejados de la media<sup>73</sup> y función motora deprimida<sup>75</sup>.

El 60% de individuos de más de seis años sufren *obesidad*. Ésta se relaciona con el nivel lesional, la capacidad de deambulación y la presencia de hidrocefalia<sup>76</sup>.

La *talla baja* también es frecuente en esta subpoblación, por lo tanto, estos pacientes se pueden ver beneficiados de la administración de hormona de crecimiento

recombinante<sup>77</sup>. En definitiva, la antropometría de estos niños se caracteriza por una disminución de la longitud de su tronco y de sus extremidades inferiores, por un aumento de la circunferencia cefálica y por unas extremidades superiores con longitud normal<sup>78</sup>. Las necesidades dietéticas de estos pacientes son inferiores a las de los individuos normales<sup>79</sup> y se ven moduladas por las características antropométricas y la tendencia a la hipoactividad.

Aproximadamente un 30% de estos pacientes tienen *lesiones cutáneas*<sup>80</sup>, entre las que destacan las úlceras por decúbito, las abrasiones y las quemaduras. Se suelen ubicar en la espalda, si hay cifosis, y en el periné. Los factores que favorecen su aparición son el retraso mental, la macrocefalia, la cifoescoliosis y la ausencia de cambios posturales<sup>81</sup>.

## 2.7.5 Pronóstico vital del mielomeningocele

Las causas específicas de mortalidad en el MM son las infecciones, las crisis comiciales y la compresión troncular. La meningitis es más frecuente en los más jóvenes, mientras que los fallecimientos más tardíos se suelen asociar a sepsis de origen urinario.

Las cifras de mortalidad más fidedignas proceden de estudios de base poblacional. Entonces, en Inglaterra y Gales, la tasa estandarizada de mortalidad en este grupo de enfermos es dos veces superior a la del resto de la población<sup>82</sup>. El escrutinio realizado en Atlanta concluyó que casi el 13% de individuos afectados nacidos entre 1979 y 1994 fallecían durante el primer año de vida, y que los factores pronósticos más adversos eran el peso al nacimiento inferior a 2500 gramos y los MMs torácicos. También se ha apreciado una tendencia a supervivencias más prolongadas en las últimas décadas, lo cual se atribuye al aborto inducido en los casos de peor pronóstico y a los avances terapéuticos<sup>83-4</sup>. Aun con todo, sólo el 75% de estos pacientes alcanzarán la edad adulta<sup>56</sup>.

## 2.7.6 Manejo del mielomeningocele

Los objetivos a medio-largo plazo en las formas graves son lograr la supervivencia del enfermo y procurar un desarrollo funcional lo más próximo posible a la normalidad, mientras que los que se pretenden conseguir a corto plazo son evitar la infección, prevenir la rotura del saco, corregir las alteraciones asociadas y conseguir una buena higiene. Los objetivos expuestos se podrán lograr mediante tres enfoques que precisan de un abordaje multidisciplinario: la cirugía intrauterina, la elección de la vía de parto más adecuada y la cirugía postnatal.

### 2.7.6.1 Manejo prenatal

La opción terapéutica más novedosa hasta el momento es la reparación intrauterina del MM. La razón de ser de este abordaje se origina en los resultados favorables obtenidos en experimentación animal<sup>85</sup> y en la “two-hit hypothesis”<sup>86</sup>, según la cual, la mielodisplasia embrionaria se ve complicada por la exposición a un medio intrauterino hostil en la etapa fetal. Por consiguiente, la cirugía prenatal reduciría los efectos deletéreos producidos por la agresión medular en la segunda mitad del embarazo<sup>87-91</sup>.

El procedimiento quirúrgico consiste en la separación de la placoda neural de la aracnoides circundante, con la consiguiente restitución de su posición fisiológica dentro del canal vertebral, y en el cierre de la solución de continuidad con duramadre. En definitiva, la técnica es análoga a la realizada convencionalmente al nacimiento, sólo que hay que acceder a la cavidad uterina tras incisión de Pfannenstiel e histerotomía<sup>52</sup>. Otras vías de abordaje menos agresivas, tal es el caso de la endosco-

pia<sup>92-3</sup>, no han mostrado hasta el momento su superioridad frente a la cirugía abierta<sup>94</sup>.

Los beneficios documentados hasta la fecha son la disminución de las incidencias de la malformación de Chiari tipo II y de la hidrocefalia que precisa descompresión<sup>52,95-6</sup>. Aun con todo, son precisos seguimientos más largos que aseguren la permanencia de estos resultados y su traducción funcional. Además, quedan por resolver una serie de inconvenientes tanto para la madre como para el feto, derivados de la manipulación operatoria uterina entre las 20 y 30 semanas de amenorrea. Quizás el refinamiento de la técnica y los avances farmacológicos puedan minimizar los efectos adversos documentados hasta el momento: oligoamnios<sup>52</sup>, prematuridad<sup>52,97</sup>, hipoplasia pulmonar<sup>98</sup>, quistes de inclusión asociados a anclaje medular<sup>99</sup> y rotura uterina<sup>52,100</sup>, entre otros. Por consiguiente, esta técnica actualmente es experimental y se realiza únicamente en cuatro centros estadounidenses<sup>101</sup>. La generalización de este procedimiento ha de fundamentarse, necesariamente, en los resultados de un ensayo clínico aleatorizado que los National Institutes of Health estadounidenses ya están organizando<sup>102</sup>.

### 2.7.6.2 Manejo intraparto

El posible efecto traumático del parto sobre el MM viene preocupando a los obstetras desde hace más de tres décadas<sup>103</sup>, tanto por la compresión neuromuscular en los casos con presentación de nalgas, más frecuente en estos fetos<sup>104-5</sup>, como por el efecto tóxico del contenido amniótico al mezclarse con el LCR<sup>106</sup>. En este contexto, sería útil esclarecer si la extracción fetal abdominal puede mejorar el futuro de estos pacientes.

En 1984, Chervenak y cols.<sup>107</sup> aconsejaron la cesárea electiva y describieron una técnica atraumática para la extracción fetal. Sin embargo, sus recomendaciones se basaban en una serie de sólo nueve nacimientos, de los que cuatro habían sido atendidos mediante cesárea al haber sido detectados prenatalmente. Además, no se proporcionaron datos clínicos objetivos sobre los participantes. Al contrario, Hadi y cols.<sup>108</sup> dudaron de la recomendación sistemática de la cesárea en estos casos, puesto que, en una serie de ocho partos vaginales de MM, ninguno de los sacos, que eran de diámetro inferior o igual a los 4 cm se rompió. En otro estudio retrospectivo<sup>109</sup> publicado en 1988 se siguieron 72 niños afectados, 32 nacidos mediante cesárea y 40 por vía vaginal, durante su primer año de vida. No se hallaron diferencias significativas entre ambos grupos al comparar la mortalidad, la incidencia de meningitis neonatal, la duración de la estancia hospitalaria inicial, el desarrollo psicomotor y la exploración neurológica. En otra serie similar<sup>110</sup>, pero con sólo 20 partos vaginales y 15 cesáreas, tampoco se encontraron cambios significativos con relación a: puntuación de Apgar, rotura del MM, derivación ventriculoperitoneal, meningitis neonatal, epilepsia, vejiga neurógena, incontinencia fecal o deformidades ortopédicas. Evidentemente, ninguno de los dos últimos trabajos permitió mantener la recomendación de cesárea electiva.

En 1991 se publicaron los resultados de la revisión que incluyó mayor número de pacientes, 208 entre dos y 18 años de edad<sup>105</sup>. Se delimitaron cuatro grupos: parto

eutócico (59%), parto vaginal de nalgas (7%), cesárea electiva (16%) y cesárea urgente (18%). Se observó que los fetos de partos vaginales con presentación de nalgas tenían una función neurológica más pobre al nacer; ello era atribuido a que en este subgrupo la disrafia era más alta, la exploración neonatal más dificultosa y la lesión de estructuras nerviosas intraparto más frecuente. Aun con todo, estos pacientes tendían a mejorar su función motora evolutivamente, pero el uso de silla de ruedas era más común en este grupo. Entonces, los autores concluyeron que la cesárea se debía reservar para los MMs con presentación podálica.

La tendencia de muchos centros de nuestro entorno a atender estos partos por vía abdominal procede de los trabajos de Luthy y Shurtleff<sup>11-2</sup> que presentaron un seguimiento prospectivo de 160 pacientes con MM quístico nacidos entre 1979 y 1988. Los participantes se reclutaron en las consultas de la Universidad de Washington (gestantes diagnosticadas prenatalmente y niños afectados). Los casos se distribuyeron en tres grupos: 78 partos vaginales, 47 cesáreas electivas y 35 cesáreas con trabajo de parto. La cesárea electiva fue ofrecida a todas las gestantes con diagnóstico prenatal de espina bífida. Las consecuencias de la vía de parto se valoraron mediante la cuantificación de los niveles motor, vertebral y de la diferencia entre ambos (nivel motor menos nivel vertebral). Los valores de las sustracciones, tras seguimiento de dos años, fueron significativamente superiores (nivel funcional mejor que nivel anatómico) en el grupo de la cesárea sin dinámica uterina (media=3,3) que en el del parto vaginal (media=1,1) y en el de la cesárea con dinámica (media=0,9) ( $p < 0,001$  para ambas comparaciones). Otros hallazgos interesantes son los valores significativamente superiores de las sustracciones en el grupo de la cesárea con bolsa íntegra si se compara con la cesárea con amniorrhexis. Ello se interpreta como que el efecto deletéreo sobre el MM procede de la presión directa miométrica no amortiguada por el líquido circundante. A los cuatro años, se mantuvieron las diferencias significativas entre el grupo de cesárea electiva y el de la vía vaginal. En la tabla 2.3 se resumen los resultados según el nivel funcional.

**Tabla 2.3.- Nivel motor del mielomeningocele a los dos y cuatro años de seguimiento según el nivel lesional y la vía de parto.**

	N	Sacro o ausencia de paresia N (%)	L4 o L5 N (%)	L3 o superior N (%)	Riesgo relativo*	IC 95%
<b>Cesárea sin DU</b>						
2 años	47	21 (45)	16 (34)	10 (21)	1,0	
4 años	39	15 (38)	14 (36)	10 (26)	1,0	
<b>Parto vaginal</b>						
2 años	78	11 (14)	43 (55)	24 (31)	<b>2,1</b>	<b>1,2-3,7</b>
4 años	68	17 (25)	27 (40)	24 (35)	1,5	0,8-2,5

N (número de casos), IC 95% (intervalo de confianza del 95% calculado según el método de Katz), DU (dinámica uterina).

\* Se compara el grupo menos afectado (nivel sacro o ausencia de paresia) con el más afectado (nivel L3 o superior). Las comparaciones son cesárea sin DU frente a parto vaginal a los dos años y a los cuatro años. Valores estadísticamente significativos resaltados en negrita.

Como se puede apreciar, la proporción de casos con mejores niveles funcionales en el grupo de la cesárea sin dinámica disminuyen al prolongar el seguimiento, pero en el grupo del parto vaginal ocurre lo contrario. Ello se atribuyó a que la disrafia vertebral era significativamente más alta en los individuos nacidos por cesárea electiva. En definitiva, los resultados favorables a la vía abdominal sin dinámica perdieron su significación a los cuatro años de seguimiento. Por último, los fetos con cifosis congénita fueron identificados por los autores como un grupo con pronóstico funcional especialmente ominoso y aconsejaron proscribir en ellos la cesárea. Estos hallazgos confusos se vieron aun más oscurecidos por la inclusión en el grupo de la cesárea electiva de aquellos fetos con buena movilidad de extremidades, hidrocefalia mínima o ausente y MM no ulcerado<sup>113</sup>, lo cual levantó numerosas sospechas de selección sesgada. Los autores defendieron la bondad de sus resultados argumentando que en el grupo de la cesárea electiva las lesiones eran más graves (pasan menos desapercibidas al cribado prenatal) y las complicaciones más frecuentes (hidromielia, anclaje medular, hipoplasia medular), lo cual se tradujo en mayor pérdida de función motora. Otro punto oscuro es el desconocimiento del tipo de atención que recibieron los participantes (hospital terciario o de otro nivel).

En la investigación de Merrill y cols.<sup>114</sup> se compararon 21 nacidos mediante parto vaginal y 15 por cesárea. El sistema de puntuación de los niveles lesionales era análogo al del estudio de Luthy y cols.<sup>111</sup>, pero no se documentaron diferencias funcionales significativas entre ambos grupos. Sin embargo, este trabajo tiene inconvenientes: su naturaleza retrospectiva, la escasez de la muestra y la heterogeneidad de los lapsos de seguimiento. Dos ventajas obvias del mismo son el nacimiento de todos los participantes en el mismo hospital terciario, por lo tanto, los criterios de manejo no varían; y la proporción similar de diagnósticos prenatales en ambos grupos.

El último estudio que valora la vía de parto fue publicado en 2002, aunque éste no era el objetivo principal de la investigación. Se compararon retrospectivamente 20 nacidos por vía vaginal con 20 nacidos por cesárea. No se detectaron cambios significativos referentes a las diferencias entre los niveles motores y óseos<sup>48</sup>.

Lamentablemente, ninguno de los trabajos citados es multicéntrico ni experimental; además su comparabilidad entre sí es limitada a causa de que la etiología de la espina bífida es heterogénea<sup>41,115</sup> (capítulos 7 y 8), de que el manejo postparto no es igual en todos los centros<sup>116</sup> y de que los intervalos de seguimiento clínico son distintos, factor que puede hacer variar los resultados de las pruebas de funcionalidad muscular<sup>117</sup>. Una vez revisados todos estos estudios, sólo nos queda decir que no hay evidencia suficiente para recomendar sistemáticamente la cesárea para extraer el feto con MM y que sólo un ensayo clínico multicéntrico podría responder esta cuestión.



### 2.7.6.3 Manejo postparto

La atención inmediata al neonato con espina bífida se concreta en las siguientes maniobras: cubrir la tumoración meníngea con un apósito empapado en suero fisiológico para evitar su rotura y mantener indemne la placa medular; colocar al paciente en decúbito prono o lateral; insertar una vía endovenosa; administrar profilaxis antibiótica parenteral; y alimentar oralmente al neonato hasta el inicio del ayuno preoperatorio. Otras actuaciones prequirúrgicas serán la realización de una ecografía cerebral y la valoración de anomalías asociadas. De todo lo anterior, se infiere que al poco tiempo de nacer el paciente ya precisará de los cuidados que sólo un hospital terciario puede brindar, por lo tanto, el centro sanitario de elección para la atención al parto de estos fetos es un hospital con servicio de neurocirugía. Aun con todo, esta recomendación emana del sentido común, dado que no conocemos ningún trabajo acerca de esta cuestión. La disminución progresiva de la prevalencia al nacimiento de estas anomalías en todo el mundo ha traído la concentración de estos pacientes en unos pocos centros de referencia<sup>113</sup>, lo que apoya razonablemente nuestra aseveración.

El tratamiento del MM es prioritario y se han descrito diferentes enfoques: cirugías precoz, diferida y tratamiento conservador.

La utilización de las distintas modalidades terapéuticas ha ido evolucionando a lo largo de las últimas décadas. Así, hace 50 años a los pacientes se les negaba la cirugía si concurrían alguno de los siguientes criterios establecidos por el Dr. John Lorber: hidrocefalia severa; parálisis total de extremidades inferiores; cifosis y/o escoliosis; disrafias extensas dorsolumbares o dorsolumbosacras; lesión cerebral sobreañadida; y defectos congénitos graves concomitantes<sup>118</sup>. Obviamente, la presencia de los mismos ensombrece el pronóstico, pero entonces surgía otro problema, puesto que el 3% de los pacientes excluidos sobrevivían más de un año. En ellos, las complicaciones en forma de meningitis supurada o la lesión progresiva neuronal oscurecían aún más su futuro. Como el uso de criterios excluyentes planteaba innumerables problemas éticos, éstos se dejaron de aplicar, objetivándose que el tratamiento quirúrgico indiscriminado aumenta la supervivencia de los pacientes independientemente de su pronóstico inicial<sup>119</sup>.

En la década de los 60 el tratamiento quirúrgico del MM se consideraba una urgencia, pero desde los resultados del estudio de Charney y cols.<sup>120</sup> se ha replanteado la cuestión. En la investigación mencionada, se compararon los resultados obtenidos al intervenir 52 niños en el transcurso de las primeras 48 horas de vida y 32 en el intervalo entre los tres y siete días postparto. Los resultados no mostraron asociación significativa entre el lapso de la intervención y la supervivencia, el desarrollo de ventriculitis, o el empeoramiento de la parálisis. Otro artículo más tardío de Brau y cols.<sup>121</sup> corroboró que la reparación del defecto espinal antes de las 48 horas de vida no reducía la ventriculitis. A raíz de estos estudios ya son muchos los centros que intervienen a estos pacientes en quirófano de cirugía programada. Como consecuencia de ello, estos niños se benefician del buen hacer de los neurocirujanos más expertos.

## 2.8 Bibliografía

1. Hunter AGW. Brain and spinal cord. En: Stevenson RE, Hall JG, Goodman RM, eds. Human malformations and related anomalies. Vol. 2. Oxford monographs on medical genetics no. 27. New York: Oxford University Press, 1993. p. 545-62.
2. Ellenbogen RG. Neural tube defects in the neonatal period. EMedicine Journal 2002;3. URL: <http://www.emedicine.com/ped/topic2805.htm> (acceso 3/1/03).
3. Corretger JM. Malformaciones del sistema nervioso central. Hidrocefalias. Craneostenosis. En: Cruz M. Tratado de Pediatría. 6ª ed. Barcelona: Espaxs; 1989. p. 1583-95.
4. Congenital Anomalies of the Central Nervous System. En: Behrman RE, Kliegman R, Jenson HB, eds. Nelson Textbook of Pediatrics. 16<sup>th</sup> ed. Missouri, EE.UU.: W.B. Saunders Company; 2000. p.1803-6.
5. Henrion R, Dumez Y, Aubry JP, Aubry MC. Anomalías del sistema nervioso central. En: Manual de diagnóstico prenatal y medicina fetal. 1ª ed. Barcelona: Masson, S.A.; 1990. p. 104-25.
6. Developmental structural disorders. En: Goetz CG, Pappert EJ, eds. Textbook of Neurology. 1st ed. Missouri, EE.UU.: W.B. Saunders Company; 1999. p.510-37.
7. David TJ, McCrae FC, Bound JP. Congenital malformations associated with anencephaly in the Fylde peninsula of Lancashire. J Med Genet 1983;20:338-41.
8. Abrate M, Baracchini P, Fulcheri E, Lapertosa G, Pantarotto MF, Mastroiacovo P. Studio epidemiologico dell'encefalia in Italia e rilievi anatomopatologici sui casi di nostra osservazione. Pathologica 1990;82:133-54.
9. Källén B, Cocchi G, Knudsen LB, Castilla EE, Robert E, Daltveit AK, y cols. International study of sex ratio and twinning of neural tube defects. Teratology 1994;50:322-31.
10. Dolk H, De Wals P, Gillerot Y, Lechat MF, Ayme S, Cornet M, y cols. Heterogeneity of neural tube defects in Europe: the significance of site of defect and presence of other major anomalies in relation to geographic differences in prevalence. Teratology 1991;44:547-59.
11. Smith MT, Huntington HW. Morphogenesis of experimental anencephaly. J Neuropathol Exp Neurol 1981;40:20-31.
12. Muller F, O'Rahilly R. Cerebral dysraphia (future anencephaly) in a human twin embryo at stage 13. Teratology 1984;30:167-77.
13. Wood LR, Smith MT. Generation of anencephaly: 1. Aberrant neurulation and 2. Conversion of exencephaly to anencephaly. J Neuropathol Exp Neurol 1984;43:620-33.
14. Baird PA, Sadovnick AD. Survival in infants with anencephaly. Clin Pediatr (Phila) 1984;23:268-71.
15. Kalucy M, Bower C, Stanley F, Burton P. Survival of infants with neural tube defects in Western Australia 1966-1990. Paediatr Perinat Epidemiol 1994;8:334-51.
16. McAbee G, Sherman J, Canas JA, Boxer H. Prolonged survival of two anencephalic infants. Am J Perinatol 1993;10:175-7.
17. Erdinçler P, Kaynar MY, Canbaz B, Kocer N, Kuday C, Ciplak N. Iniencephaly: neuroradiological and surgical features. Case report and review of the literature. J Neurosurg 1998;89:317-20.
18. Sahid S, Sepúlveda W, Dezerega V, Gutiérrez J, Rodríguez L, Corral E. Iniencephaly: prenatal diagnosis and management. Prenat Diagn 2000;20:202-5.
19. Jeanne-Pasquier C, Carles D, Alberti EM, Jacob B. Iniencephalie: à propos de 4 nouvelles observations et revue de la littérature. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 2002;31:276-82.
20. David TJ, Nixon A. Congenital malformations associated with anencephaly and iniencephaly. J Med Genet 1976;13:263-5.
21. Rodríguez MM, Reik RA, Carreño TD, Fojaco RM. Cluster of iniencephaly in Miami. Pediatr Pathol 1991;11:211-21.
22. Dogan MM, Ekici E, Yapar EG, Soysal ME, Soysal SK, Gokmen O. Iniencephaly: sonographic-pathologic correlation of 19 cases. J Perinat Med 1996;24:501-11.
23. Kulaylat NA, Narchi H. Iniencephaly: An uncommon neural tube defect. J Pediatr 2000;136:414.
24. Katz VL, Aylsworth AS, Albright SG. Iniencephaly is not uniformly fatal. Prenat Diagn 1989;9:595-9.
25. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). Parietal foramina; PFM. Baltimore, Maryland (EE.UU.): Johns Hopkins University;2003. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=168500> (acceso 4/1/03).
26. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). Meckel Syndrome; Type I; MKS1. Baltimore, Maryland (EE.UU.): Johns Hopkins University;2003. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=249000> (acceso 4/1/03).
27. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). Walker-Warburg Syndrome. Baltimore, Maryland (EE.UU.): Johns Hopkins University;2003. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=236670> (acceso 4/1/03).
28. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). Roberts Syndrome; RBS. Baltimore, Maryland (EE.UU.): Johns Hopkins University;2003. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=268300> (acceso 4/1/03).
29. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). Constricting bands, congenital. Baltimore, Maryland (EE.UU.): Johns Hopkins University;2003. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=217100> (acceso 4/1/03).
30. Chaurasia BD, Wagh KV, Goyal J. Spinal retroflexion in craniorhachischisis: its classification and limitations. Acta Anat (Basel) 1976;94:626-32.
31. Morales L, Pedrola D. Afecciones de la médula y del sistema nervioso periférico. En: Cruz M. Tratado de Pediatría. 6ª ed. Barcelona: Espaxs; 1989. p. 1739-52.
32. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). Spina bifida. Baltimore, Maryland (EE.UU.): Johns Hopkins University;2003. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=182940> (acceso 4/1/03).
33. Defectos del tubo neural: prevención y diagnóstico [videocassette]. Madrid: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (S.E.G.O.); 1996.
34. James WH. The sex ratio in spina bifida. J Med Genet 1979;16:384-8.
35. Seller MJ. Sex, neural tube defects, and multisite closure of the human neural tube. Am J Med Genet 1995;58:332-6.
36. Greene WB, Terry RC, DeMasi RA, Herrington RT. Effect of race and gender on neurological level in myelomeningocele. Dev Med Child Neurol 1991;33:110-7.

37. Källén B, Cocchi G, Knudsen LB, Castilla EE, Robert E, Daltveit AK, y cols. International study of sex ratio and twinning of neural tube defects. *Teratology* 1994;50:322-31.
38. Hall JG, Friedman JM, Kenna BA, Popkin J, Jawanda M, Arnold W. Clinical, genetic, and epidemiological factors in neural tube defects. *Am J Hum Genet* 1988;43:827-37.
39. Simpson JL, Mills J, Rhoads GG, Cunningham GC, Conley MR, Hoffman HJ. Genetic heterogeneity in neural tube defects. *Ann Genet* 1991;34:279-86.
40. Shaw GM, Jensvold NG, Wasserman CR, Lammer EJ. Epidemiologic characteristics of phenotypically distinct neural tube defects among 0.7 million California births, 1983-1987. *Teratology* 1994;49:143-9.
41. Källén B, Robert E, Harris J. Associated malformations in infants and fetuses with upper or lower neural tube defects. *Teratology* 1998;57:56-63.
42. ASBAH (Association for Spina Bifida and Hydrocephalus) Spina bifida occulta. URL (formato PDF): <http://www.asbah.org/sbocc.html> (acceso 4/1/03).
43. Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD. Neural-tube defects. *N Engl J Med* 1999;341:1509-19.
44. Yoneyama T, Fukui J, Ohtsuka K, Komatsu H, Ogawa A. Urinary tract dysfunctions in tethered spinal cord syndrome: improvement after surgical untethering. *J Urol* 1985;133:999-1001.
45. Satar N, Bauer SB, Shefner J, Kelly MD, Darbey MM. The effects of delayed diagnosis and treatment in patients with an occult spinal dysraphism. *J Urol* 1995;154(2 Pt 2):754-8.
46. Vernet O, Farmer JP, Houle AM, Montes JL. Impact of urodynamic studies on the surgical management of spinal cord tethering. *J Neurosurg* 1996;85:555-9.
47. Kollias SS, Goldstein RB, Cogen PH, Filly RA. Prenatally detected myelomeningoceles: sonographic accuracy in estimation of the spinal level. *Radiology* 1992;185:109-12.
48. Rintoul NE, Sutton LN, Hubbard AM, Cohen B, Melchioni J, Pasquariello PS, Adzick NS. A new look at myelomeningoceles: functional level, vertebral level, shunting, and the implications for fetal intervention. *Pediatrics* 2002;109:409-13.
49. McLone DG, Naidich TP. Developmental morphology of the subarachnoid space, brain vasculature, and contiguous structures, and the cause of the Chiari II malformation. *AJNR Am J Neuroradiol* 1992;13:463-82.
50. Inagaki T, Shoenwolf GC, Walker ML. Experimental model: change in the posterior fossa with surgically induced spina bifida aperta in the mouse. *Pediatr Neurosurg* 1997;26:185-9.
51. Rekate HL. To shunt or not to shunt: hydrocephalus and dysraphism. *Clin Neurosurg* 1985;32:593-607.
52. Bruner JP, Tulipan N, Paschall RL, Boehm FH, Walsh WF, Silva SR, y cols. Fetal surgery for myelomeningocele and the incidence of shunt-dependent hydrocephalus. *JAMA*. 1999;282:1819-25.
53. Spinal cord disorders. En: Beers MH, Berkow R, eds. *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*. 17<sup>th</sup> ed. New Jersey, EE.UU.: Merck & Co., Inc.; 1999. URL: <http://www.merck.com/pubs/mmanual/section14/chapter182/182d.htm> (acceso 10/1/03).
54. Bartoszesky LE, Haller J, Scott RM, Wojick C. Seizures in children with meningomyelocele. *Am J Dis Child* 1985;139:400-2.
55. Talwar D, Baldwin MA, Horbatt CI. Epilepsy in children with meningomyelocele. *Pediatr Neurol* 1995;13:29-32.
56. Bowman RM, McLone DG, Grant JA, Tomita T, Ito JA. Spina bifida outcome: a 25-year prospective. *Pediatr Neurosurg* 2001;34:114-20.
57. Hirayama A, Yamada K, Tanaka Y, Hirata N, Yamamoto M, Suemori T y cols. [Evaluation of sexual function in adults with myelomeningocele] [Artículo en japonés]. *Hinyokika Kyo* 1995;41:985-9.
58. Cass AS, Bloom BA, Luxenberg M. Sexual function in adults with myelomeningocele. *J Urol* 1986;136:425-6.
59. Samuelsson L, Eklof O. Scoliosis in myelomeningocele. *Acta Orthop Scand* 1988;59:122-7.
60. Williams EN, Broughton NS, Menelaus MB. Age-related walking in children with spina bifida. *Dev Med Child Neurol* 1999;41:446-9.
61. Bartonek A, Saraste H, Samuelsson L, Skoog M. Ambulation in patients with myelomeningocele: a 12-year follow-up. *J Pediatr Orthop* 1999;19:202-6.
62. Mertes PM, Mouton C, Fremont S, Brugerolle B, Moneret-Vautrin DA, Lavaud F, Laxenaire MC. Latex hypersensitivity in spinal cord injured adult patients. *Anaesth Intensive Care* 2001;29:393-9.
63. Hochleitner BW, Menardi G, Haussler B, Ulmer H, Kofler H, Reider N. Spina bifida as an independent risk factor for sensitization to latex. *J Urol* 2001;166:2370-3; discusión 2373-4.
64. Szepefalusi Z, Seidl R, Bernert G, Dietrich W, Spitzauer S, Urbanek R. Latex sensitization in spina bifida appear disease-associated. *J Pediatr* 1999;128:S28-S31.
65. Konz KR, Chia JK, Kurup VP, Resnick A, Kelly KJ, Fink JN. Comparison of latex hypersensitivity among patients with neurologic defects. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:950-4.
66. Task force on allergic reactions to latex. Committee report. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:16-8.
67. Cremer R, Kleine-Diepenbruck U, Hoppe A, Blaker F. Latex allergy in spina bifida patients – prevention by primary prophylaxis. *Allergy* 1998;134:344-8.
68. Nieto A, Mazon A, Pamies R, Lanuza A, Muñoz A, Estornell F, Garcia-Ibarra F. Efficacy of latex avoidance for primary prevention of latex sensitization in children with spina bifida. *J Pediatr* 2002;140:370-2.
69. Gaston H. Ophthalmic complications of spina bifida and hydrocephalus. *Eye* 1991;5(Pt 3):279-90.
70. Sella A, Foltz EL, Shurtleff DB. A three-year developmental study of treated and untreated hydrocephalic children. *J Pediatr* 1966;69:887-91.
71. Wills KE, Holmbeck GN, Dillon K, McLone DG. Intelligence and achievement in children with myelomeningocele. *J Pediatr Psychol* 1990;15:161-76.
72. Casari EF, Fantino AG. A longitudinal study of cognitive abilities and achievement status of children with myelomeningocele and their relationship with clinical types. *Eur J Pediatr Surg* 1998;8 Suppl 1:52-4.
73. Fobe JL, Rizzo AM, Silva IM, Da Silva SP, Teixeira CE, De Souza AM, Fernandes A. QI em pacientes com hidrocefalia e mielomeningocele: implicações do tratamento cirúrgico. *Arq Neuropsiquiatr* 1999;57:44-50.
74. Mapstone TB, Rekate HL, Nulsen FE, Dixon MS Jr, Glaser N, Jaffe M. Relationship of CSF shunting and IQ in children with myelomeningocele: a retrospective analysis. *Childs Brain* 1984;11:112-8.
75. Rendeli C, Salvaggio E, Sciascia Cannizzaro G, Bianchi E, Caldarelli M, Guzzetta F. Does locomotion improve the cognitive profile of children with meningomyelocele? *Childs Nerv Syst* 2002;18:231-4.

76. Mita K, Akataki K, Itoh K, Ono Y, Ishida N, Oki T. Assessment of obesity of children with spina bifida. *Dev Med Child Neurol* 1993;35:305-11.
77. Rotenstein D, Breen TJ. Growth hormone treatment of children with myelomeningocele. *J Pediatr* 1996;128:S20-S31.
78. Greene SA, Frank M, Zachmann M, Prader A. Growth and sexual development in children with meningomyelocele. *Eur J Pediatr* 1985;144:146-8.
79. Grogan CB, Ekvall SM. Body composition of children with myelomeningocele, determined by 40K, urinary creatinine and anthropometric measures. *J Am Coll Nutr* 1999;18:316-23.
80. Díaz Llopis I, Bea Muñoz M, Martínez Agullo E, López Martínez A, García Aymerich V, Forner Valero JV. Ambulation in patients with myelomeningocele: a study of 1500 patients. *Paraplegia* 1993;31:28-32.
81. Okamoto GA, Lamers JV, Shurtleff DB. Skin breakdown in patients with myelomeningocele. *Arch Phys Med Rehabil* 1983;64:20-3.
82. Lawrenson R, Wyndaele JJ, Vlachonikolis I, Farmer C, Glickman S. A UK general practice database study of prevalence and mortality of people with neural tube defects. *Clinical Rehabilitation* 2000;14:627-30.
83. Adams MM, Greenberg F, Khoury MJ, Marks JS, Oakley GP. Survival of infants with spina bifida – Atlanta 1972-79. *American Journal of Diseases of Children* 1985;139:518-23.
84. Lee-Yang CW, Paulozzi LJ. Survival of infants with spina bifida: a population study 1979-94. *Pediatric and Perinatal Epidemiology* 2001;15:374-8.
85. Michejda M. Intrauterine treatment of spina bifida: primate model. *Z Kinderchir* 1984;39:259-61.
86. Heffez DS, Aryanpur J, Hutchins GM, Freeman JM. The paralysis associated with myelomeningocele: clinical and experimental data implicating a preventable spinal cord injury. *Neurosurgery* 1990;26:987-92.
87. Millicovsky G, Lazar ML. Spina bifida: role of neural tissue damage during pregnancy in producing spinal paralysis. *Obstet Gynecol* 1995;86:300-1.
88. Meuli M, Meuli-Simmen C, Hutchins GM, Seller MJ, Harrison MR, Adzick NS. The spinal cord lesion in human fetuses with myelomeningocele: implications for fetal surgery. *J Pediatr Surg* 1997;32:448-52.
89. Drewek MJ, Bruner JP, Whetsell WO, Tulipan N. Quantitative analysis of the toxicity of human amniotic fluid to cultured rat spinal cord. *Pediatr Neurosurg* 1997;27:190-3.
90. Selcuki M, Manning S, Bernfield M. The curly tail mouse model of human neural tube defects demonstrates normal spinal cord differentiation at the level of the meningomyelocele: implications for fetal surgery. *Childs Nerv Syst* 2001;17(1-2):19-23.
91. Correia-Pinto J, Reis JL, Hutchins GM, Baptista MJ, Esteveo-Costa J, Flake AW, Leite-Moreira AF. In utero meconium exposure increases spinal cord necrosis in a rat model of myelomeningocele. *J Pediatr Surg* 2002;37:488-92.
92. Copeland ML, Bruner JP, Richards WO, Sundell HW, Tulipan NB. A Model for in utero endoscopic treatment of myelomeningocele. *Neurosurgery* 1993;33:542-4; discusión 545.
93. Bruner JP, Richards WO, Tulipan NB, Arney TL. Endoscopic coverage of fetal myelomeningocele in utero. *Am J Obstet Gynecol* 1999;189(1 Pt 1):153-8.
94. Bruner JP, Tulipan NB, Richards WO, Walsh WF, Boehm FH, Vrabcak EK. In utero repair of myelomeningocele: A comparison of endoscopy and hysterotomy. *Fetal Diagn Ther* 2000;15:83-8.
95. Tulipan N, Hernanz-Schulman M, Lowe LH, Bruner JP. Intrauterine myelomeningocele repair reverses preexisting hindbrain herniation. *Pediatr Neurosurg* 1999;31:137-42.
96. Tulipan N, Bruner JP, Hernanz-Schulman M, Lowe LH, Walsh WF, Nickolaus D, Oakes WJ. Effect of intrauterine myelomeningocele repair on central nervous system structure and function. *Pediatr Neurosurg* 1999;31:183-8.
97. Sutton LN, Adzick NS, Bilaniuk LT, Johnson MP, Crombleholme TM, Flake AW. Improvement in hindbrain herniation demonstrated by serial fetal magnetic resonance imaging following fetal surgery for myelomeningocele. *JAMA* 1999;282:1826-31.
98. Lu GC, Steinhauer J, Ramsey PS, Faye-Petersen O. Lethal pulmonary hypoplasia after in-utero myelomeningocele repair. *Obstet Gynecol* 2001;98:698-701.
99. Mazzola CA, Albright AL, Sutton LN, Tuite GF, Hamilton RL, Pollack IF. Dermoid inclusion cysts and early spinal cord tethering after fetal surgery for myelomeningocele. *N Engl J Med* 2002;347:256-9.
100. Ranzini AC, White M, Guzman ER, Scorza WE. Prenatal sonographic diagnosis of uterine rupture following open fetal surgery. *Obstet Gynecol* 1999;93(5 Pt 2):826-7.
101. Jobe AH. Fetal surgery for myelomeningocele. *N Engl J Med* 2002;347:230-1.
102. National Institutes of Health. Office of Extramural Research. NOT-HD-01-006: Notice of limited competition: Spina bifida fetal surgery centers. Bethesda, Maryland (EE.UU.): National Institutes of Health; 2001. URL: <http://grants2.nih.gov/grants/guide/notice-files/> (acceso 3/1/03).
103. Stark G, Drummond M. Spina bifida as an obstetric problem. *Dev Med Child Neurol Suppl* 1970;22:Suppl 22:157.
104. Ralis ZA. Traumatizing effect of breech delivery on infants with spina bifida. *J Pediatr* 1975;87:613-6.
105. Cochrane D, Aronyk K, Sawatzky B, Wilson D, Steinbok P. The effects of labor and delivery on spinal cord function and ambulation in patients with meningomyelocele. *Childs Nerv Syst* 1991;7:312-5.
106. Agamanolis DP, Platt MS, Vollman JH. Arnold-Chiari malformation: report of a case with contamination of ventricular and subarachnoid spaces by amniotic sac contents. *Pediatr Pathol* 1984;2:89-94.
107. Chervenak FA, Duncan C, Ment LR, Tortora M, McClure M, Hobbins JC. Perinatal management of meningomyelocele. *Obstet Gynecol* 1984;63:376-80.
108. Hadi HA, Loy RA, Long EM Jr, Martin SA, Devoe LD. Outcome of fetal meningomyelocele after vaginal delivery. *J Reprod Med* 1987;32:597-600.
109. Bensen JT, Dillard RG, Burton BK. Open spina bifida: does cesarean section delivery improve prognosis? *Obstet Gynecol* 1988;71:532-4.
110. Sakala EP, Andree I. Optimal route of delivery for meningomyelocele. *Obstet Gynecol Surv* 1990;45:209-12.
111. Luthy DA, Wardinsky T, Shurtleff DB, Hollenbach KA, Hickok DE, Nyberg DA, Benedetti TJ. Cesarean section before the onset of labor and subsequent motor function in infants with meningomyelocele diagnosed antenatally. *N Engl J Med* 1991;324:662-6.
112. Shurtleff DB, Luthy DA, Nyberg DA, Benedetti TJ, Mack LA. Meningomyelocele: management in utero and post natum. *Ciba Found Symp* 1994;181:270-80; discusión 280-6.

113. Shurtleff DB, Luthy DA, Benedetti TJ, Hicock DE, Stuntz T, Kropp RJ. The outcome of pregnancies diagnosed as having a fetus with meningomyelocele. *Z Kinderchir* 1987;42 Suppl 1;50-2.
114. Merrill DC, Goodwin P, Burson JM, Sato Y, Williamson R, Weiner CP. The optimal route of delivery for fetal meningomyelocele. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:235-40.
115. Seller MJ. Neural tube defects, chromosome abnormalities and multiple closure sites for the human neural tube. *Clinical Dysmorphology* 1995;4:202-7.
116. Wilkins-Haug L. Considerations for delivery of infants with congenital abnormalities. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1999;26:399-412, vii.
117. McDonald CM, Jaffe KM, Shurtleff DB. Assessment of muscle strength in children with meningomyelocele: accuracy and stability of measurements over time. *Arch Phys Med Rehabil* 1986;67:855-61.
118. Lorber J, Salfield SA. Results of selective treatment of spina bifida cystica. *Arch Dis Child* 1981;56:822-30.
119. McLaughlin JF, Shurtleff DB, Lamers JY, Stuntz JT, Hayden PW, Kropp RJ. Influence of prognosis on decisions regarding the care of newborns with myelodysplasia. *N Engl J Med* 1985;312:1589-94.
120. Charney EB, Weller SC, Sutton LN, Bruce DA, Schut LB. Management of the newborn with myelomeningocele: time for a decision-making process. *Pediatrics* 1985;75:58-64.
121. Brau RH, Rodríguez R, Ramírez MV, González R, Martínez V. Experience in the management of myelomeningocele in Puerto Rico. *J Neurosurg* 1990;72:726-31.



# 3 Los costes de la espina bífida

## 3.1 Introducción<sup>1</sup>

La estimación de los costes de las enfermedades tiene como objetivos la asignación de los recursos y la evaluación de las estrategias preventivas.

Las anomalías congénitas se pueden desglosar, según su patrón de consumo de recursos, en “corregibles” e invalidantes. En las primeras, existen tratamientos curativos que permiten una supervivencia normal sin secuelas; por lo tanto, los costes médicos son muy elevados durante el primer año pero se normalizan después. Los defectos invalidantes sólo disponen de tratamientos paliativos (cirugía, rehabilitación, etc.), en consecuencia, consumen gran cantidad de recursos, a pesar de que su esperanza de vida es inferior a la de la población normal (capítulo 2). El onfalocele y las obstrucciones urinarias son malformaciones “corregibles”, mientras que la espina bífida o la trisomía 21 son enfermedades invalidantes.

Los costes de las enfermedades pueden clasificarse en:

- Costes directos: tratamientos médicos y quirúrgicos, educación y rehabilitación.
- Costes indirectos: disminución de la productividad a causa de menor supervivencia y de limitaciones laborales.
- Costes personales y sociales: lucro cesante de los familiares, costes psicosociales o intangibles, adaptaciones domésticas, vehículos especiales, transporte a los centros de tratamiento.

## 3.2 El coste económico de la espina bífida

Los datos que encontramos en la literatura sobre la repercusión económica del mielomeningocele proceden de un estudio multicéntrico español<sup>2</sup> y del modelo económico de Waitzman<sup>1,3</sup>. El primero recogió información sobre 1500 pacientes entre 1986 y 1988, calculándose el coste global de la hospitalización durante los 15 años anteriores (2 953 138 \$ estadounidenses de 1988 anuales). Los servicios hospitalarios que invirtieron más recursos en estos enfermos fueron Urología, Traumatología y Rehabilitación. Los proveedores habituales de la atención sanitaria pertenecían al sector público y al nivel especializado. Por otra parte, el modelo de Waitzman nos da una aproximación más global, al considerar también otros costes no médicos, esto es, incluye los costes directos y los indirectos de cada paciente a lo largo de toda su vida, pero excluye los personales y los sociales. Este último modelo nos aporta estimaciones a la baja, puesto que es muy difícil cuantificar todas las partidas y, además, no todas las mermas tienen expresión monetaria (costes intangibles).

Como veremos, estos datos no pueden extrapolarse a nuestro entorno por varias razones:

- La unidad monetaria utilizada son los dólares estadounidenses de 1992.
- Los datos base para construir el modelo procedían de California (hospitales de agudos, MediCal o California's Medicaid Program, Departamento de Educación de California, sueldos medios, etc.).
- Las estimaciones se efectuaron para la cohorte de nacidos en California en 1988, se ajustaron según la inflación de 1992 y las diferencias entre los costes de California y el resto de los EE.UU.

Aun considerando estas limitaciones, este modelo nos orienta en cuanto al coste relativo de distintas anomalías congénitas. Según se especifica en la tabla 3.1, los costes por cada caso incidente oscilaron entre 75 000 \$ (atresia de intestino delgado) y 505 000 \$ (tronco arterioso). La espina bífida es el quinto trastorno más costoso si incluimos la parálisis cerebral, y el cuarto si sólo consideramos los defectos congénitos. Las cardiopatías congénitas aventajan en dos supuestos (tronco arterioso, ventrículo único) al mielomeningocele debido al alto coste de los tratamientos quirúrgicos y a las grandes pérdidas de productividad atribuibles a la mortalidad infantil. En cambio, la espina bífida causa menor merma de productividad al ser una anomalía no letal.

**Tabla 3.1.- Costes vitales de la parálisis cerebral y de ciertas anomalías congénitas invalidantes (EE.UU., en dólares de 1992).**

<b>Tipo de anomalía</b>	<b>Coste por caso</b>
<i>Tronco arterioso</i>	505 000 \$
<i>Parálisis cerebral</i>	503 000 \$
<i>Síndrome de Down</i>	451 000 \$
<i>Ventrículo único</i>	344 000 \$
<i>Espina bífida</i>	294 000 \$

Estimaciones de los costes vitales para los nacidos en California en 1988 ajustados por diferencias en costes entre California y el resto de EE.UU. e inflación entre 1988 y 1992.

La disminución de productividad de estos enfermos se ve influida por sus limitaciones físicas, aunque no estrictamente. Ya en la escuela, estos niños se ven discriminados según van creciendo. La progresión de la enfermedad con la edad (capítulo 2) entra en conflicto con las exigencias crecientes del sistema educativo. Los defectos visuales, la dependencia de la silla de ruedas y la incontinencia urinaria, si bien no afectan al intelecto, limitan el acceso a centros escolares con barreras arquitectónicas o con personal docente insuficiente o no preparado para atender a estos niños. La consecuencia de todo ello es que muchos de los niños mayores acaban en colegios especiales, aunque iniciaran su etapa lectiva en centros “normales”<sup>4</sup>. En diferentes trabajos realizados en el Reino Unido se ha comprobado que sólo entre un 20 y un 30% tienen un empleo, habitualmente en la rama administrativa, pero sus ingresos son inferiores al promedio de la población<sup>5,6</sup>. Tampoco hay garantía ni de un empleo estable ni acorde con la cualificación profesional si se consiguen superar los estudios secundarios<sup>7</sup>.



### 3.3 Los costes personales y sociales de la espina bífida

Como en cualquier otra enfermedad crónica, el trastorno que causa la espina bífida en la vida normal de cualquier familia se valora en toda su extensión con el transcurrir del tiempo. Así, en un estudio en el que se compararon padres de pacientes con mielomeningocele con los de controles normales se objetivó que, a la edad de 18 años de los afectados, los padres tenían más problemas de salud, principalmente psicósomáticos; el 30% aún ayudaban a sus hijos en sus tareas de cuidado personal; y era más probable que sólo uno de los progenitores tuviera un trabajo remunerado<sup>8</sup>. Tampoco extraña que el impacto familiar de la enfermedad varíe de acuerdo con los siguientes factores<sup>9</sup>: autonomía del paciente para realizar actividades cotidianas, percepción familiar del estado de salud del afectado, nivel de instrucción materno, ingresos familiares, número de adultos en la familia, proporción de adultos con empleo y frecuencia de las visitas médicas.

Esta desoladora situación legitima la investigación de nuevas estrategias preventivas y terapéuticas de la espina bífida. Los exorbitantes costes, tangibles e intangibles, individuales y colectivos, deben fomentar la concesión responsable de recursos para la investigación de esta enfermedad, de forma que el balance coste-beneficio sea favorable para todos (sanos y enfermos).

### 3.4 Bibliografía

1. Waitzman NJ, Romano PS, Scheffler RM. Estimates of the economic costs of birth defects. *Inquiry* 1994;31:188-205.
2. Bea Muñoz M, Díaz Llopis I, Martínez Agullo E, López Martínez A, García Aymerich V, Forner Valero JV. A multi-centre study of the hospital care of 1500 patients with myelomeningocele. *Paraplegia* 1994;32:561-4.
3. Waitzman NJ, Romano PS, Scheffler RM, Harris JA. Economic costs of congenital anomalies. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1995;44(37):694-9.
4. Hunt GM. Spina bífida: implications for 100 children at school. *Dev Med Child Neurol* 1981;23:160-72.
5. Lonton AP, Loughlin AM, O'Sullivan AM. The employment of adults with spina bifida. *Z Kinderchir* 1984;39 Suppl 2:132-4.
6. Tew B, Laurence KM, Jenkins V. Factors affecting employability among young adults with spina bifida and hydrocephalus. *Z Kinderchir* 1990;45 Suppl 1:34-6.
7. Smith AD. Adult spina bifida survey in Scotland: educational attainment and employment. *Z Kinderchir* 1983;38 Suppl 2:107-9.
8. Evans O, Tew B, Laurence KM. The fathers of children with spina bifida. *Z Kinderchir* 1986;41 Suppl 1:42-4.
9. McCormick MC, Charney EB, Stemmler MM. Assessing the impact of a child with spina bifida on the family. *Dev Med Child Neurol* 1986;28:53-61.



# 4 Neurulación humana y anomalías derivadas

## 4.1 Introducción

El cierre del tubo neural en los humanos acontece durante la tercera y la cuarta semanas de la embriogénesis<sup>1</sup>, esto es, la quinta y la sexta semanas de amenorrea. En los párrafos siguientes, la edad gestacional se contará exclusivamente a partir de la ovulación, a no ser que se indique lo contrario.

Dado que este capítulo sólo pretende introducir aquellos conceptos necesarios para interpretar la casuística propia expuesta en el capítulo 8, se procederá a una revisión relativamente sucinta de aquellos fenómenos implicados en la formación del tubo neural. Para este propósito nos han sido muy útiles la Embriología de Langman<sup>2</sup>, y las revisiones de los grupos de Copp<sup>3</sup> y O'Rahilly<sup>4</sup>.

## 4.2 Conceptos relativos a la neurulación

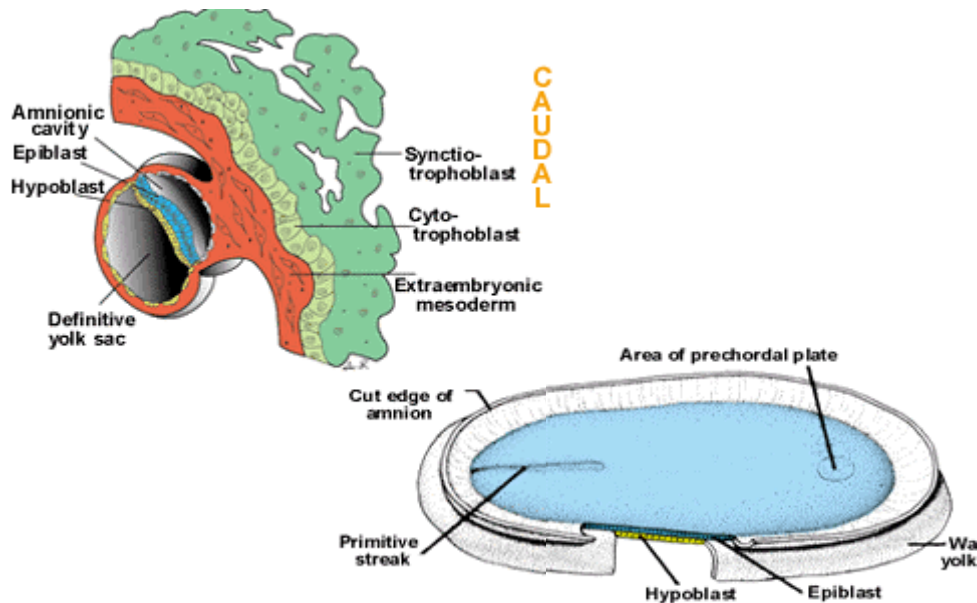
La neurulación es la formación del sistema nervioso en el embrión. Este proceso se divide en dos fases:

- a) Neurulación primaria: plegamiento de la placa neural para constituir el tubo neural (tubo neural primario). Resulta en la formación del cerebro y de la médula espinal.
- b) Neurulación secundaria: formación y canalización del cordón neural (tubo neural secundario), estructura caudal y distinta al tubo neural primario. Resulta en el desarrollo de la parte más caudal de la médula espinal.

### 4.2.1 Neurulación primaria

Al comenzar la tercera semana de desarrollo, el ectodermo es un disco aplanado, más ancho en la región cefálica que en la caudal<sup>5</sup> (figura 4.1). El sistema nervioso central (SNC) se forma a partir del ectodermo y por medio de interacción tisular entre esta lámina, la notocorda y el mesodermo paraxial subyacentes (inducción neural)<sup>6</sup>. La inducción neural coincide probablemente en el tiempo con la gastrulación. La gastrulación culmina en la formación del mesodermo y se inicia en la línea primitiva situada en la superficie del ectodermo o surco con un extremo cefálico o nódulo primitivo (de Hensen). Si observamos el proceso por medio de

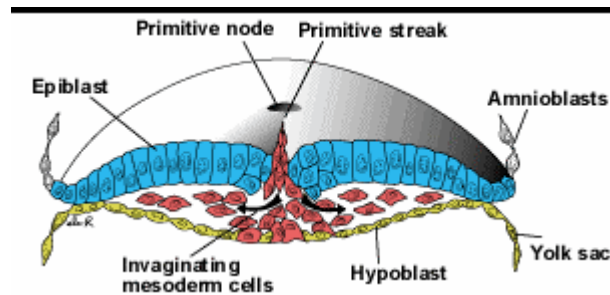
**Figura 4.1.- Embrión bilaminar (al final de la segunda semana de desarrollo, el embrión tiene dos capas yuxtapuestas: el epiblasto (ectodermo) y el hipoblasto (endodermo))<sup>5</sup>.**



Syncytiotrophoblast (sincitiotrofoblasto), cytotrophoblast (citotrofoblasto), extraembryonic mesoderm (mesodermo extraembrionario), amniotic cavity (cavidad amniótica), epiblast (epiblasto o ectodermo primitivo), hypoblast (hipoblasto o endodermo primitivo), definitive yolk sac (saco vitelino definitivo), area of prechordal plate (zona de la lámina procordal), cut edge of amnion (borde seccionado del amnion), primitive streak (línea primitiva), wall of yolk sac (pared del saco vitelino).

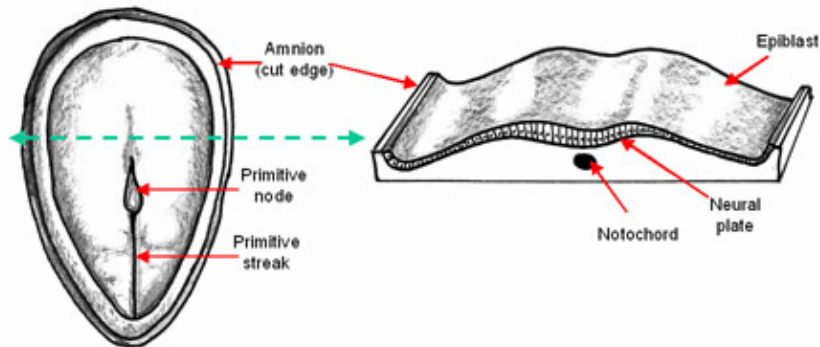
un corte que pase por la línea primitiva se aprecia que entre las capas ectodérmica y endodérmica se desarrolla una nueva hoja germinativa o mesodermo (embrión trilaminar). Se piensa que las células del ectodermo emigran en dirección a la línea primitiva y, al llegar allí, se desprenden por un proceso de invaginación<sup>5</sup> (figura 4.2). Las células invaginadas en la región de la fosita primitiva emigran en dirección cefálica hasta llegar a la lámina procordal, de forma que constituyen una prolongación a modo de tubo (prolongación cefálica o notocordal). En el decimoctavo día de desarrollo, la parte inferior de la prolongación notocordal se fusiona con el endodermo subyacente y en la zona de unión ambas capas se disgregan, la luz de la prolongación notocordal desaparece y la porción restante de esta estructura forma una lámina angosta de células, intercalada en el endodermo. Más tarde, las células notocordales proliferan y forman un cordón macizo o notocorda definitiva, que se separa del endodermo (figura 4.3)<sup>7</sup>. Hacia el decimoséptimo día, las células mesodérmicas próximas a la línea media proliferan y forman una masa engrosada de tejido o mesodermo paraxial. Al final de la tercera semana el mesodermo paraxial se separa en bloques segmentados de células epitelioides o somitas. El primer par aparece en la porción cefálica del embrión, aproximadamente a los 20 días de desarrollo. Se siguen formando en dirección caudal, de forma que a la quinta semana hay entre 22 y 24 pares. Los somitas son muy útiles para datar al embrión entre los 19 y 32 días aproximadamente<sup>8</sup>. El primordio del SNC se denomina placa neural, tiene forma de zapatilla y se presenta como un engrosamiento del ectodermo, que va hacia el encuentro de la línea primitiva y es más ancho en la región cefálica

**Figura 4.2.- Corte transversal que atraviesa la línea primitiva justo por detrás del nódulo de Hensen en un embrión presomítico de 16 días para mostrar la invaginación y migración ulterior de las células mesodérmicas<sup>5</sup>.**



Primitive node (nódulo primitivo o de Hensen), primitive streak (línea primitiva), epiblast (epiblasto o ectodermo), amnioblasts (amnioblastos), invaginating mesoderm cells (células mesodérmicas en invaginación), hypoblast (hipoblasto o endodermo).

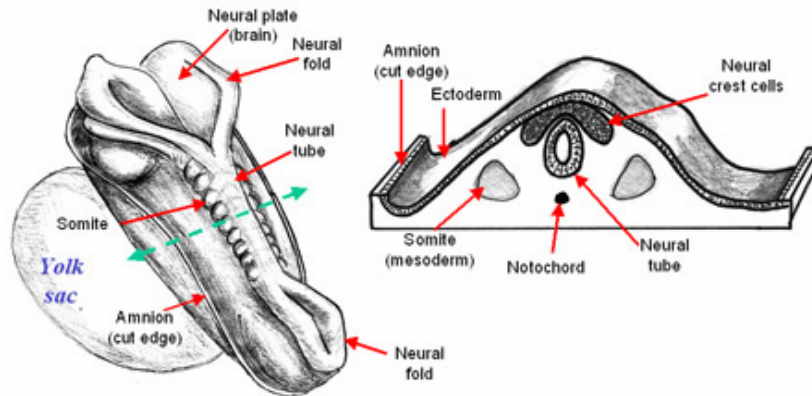
**Figura 4.3.- Embrión de 18 días visto por su cara dorsal y según un corte transversal anterior que permite ver la notocorda<sup>7</sup>.**



La gastrulación se inicia con la formación de la línea primitiva en la mitad posterior o caudal del embrión. Las células del extremo cefálico de la línea primitiva (nódulo de Hensen) migran hacia delante dentro del nódulo y constituyen la notocorda. Amnion (cut edge) (borde seccionado del amnios), primitive node (nódulo primitivo o de Hensen), primitive streak (línea primitiva), epiblast (epiblasto o ectodermo), neural plate (placa neural), notochord (notocorda).

que en la caudal. Las células de la placa neural son el resultado de la transformación de las células pluripotenciales ectodérmicas. Lateralmente a la placa neural, el ectodermo forma un área de epitelio plano, que más tarde se convertirá en la epidermis. Al finalizar la tercera semana de desarrollo, los bordes laterales de la placa neural se elevan en las áreas cervical, torácica, lumbar y sacra alta, en el límite entre la placa neural y el ectodermo superficial, mientras que la porción media da lugar al surco neural. Los pliegues neurales inician su fusión tras acercarse a la línea media, formando así el tubo neural (figura 4.4)<sup>7</sup>. La elevación, el plegamiento y la convergencia de los pliegues neurales se explica mediante la existencia de tres bisagras: una central y dos dorsolaterales (figura 4.5)<sup>9</sup>. Estas bisagras precisan de una serie de cambios morfológicos de las células neuroepiteliales de la placa neural, a saber: paso de morfología cúbica a columnar (elongación de los microtúbulos intracelulares), y de columnar a cuneiforme (contracción de los haces apicales de actina). En la región craneal, los eventos son aún más complejos<sup>10</sup>: la

**Figura 4.4.- Vista dorsal de un embrión de 22 días en el que se aprecian los somitas (9 pares), y el inicio de la formación del tubo neural<sup>7</sup>.**

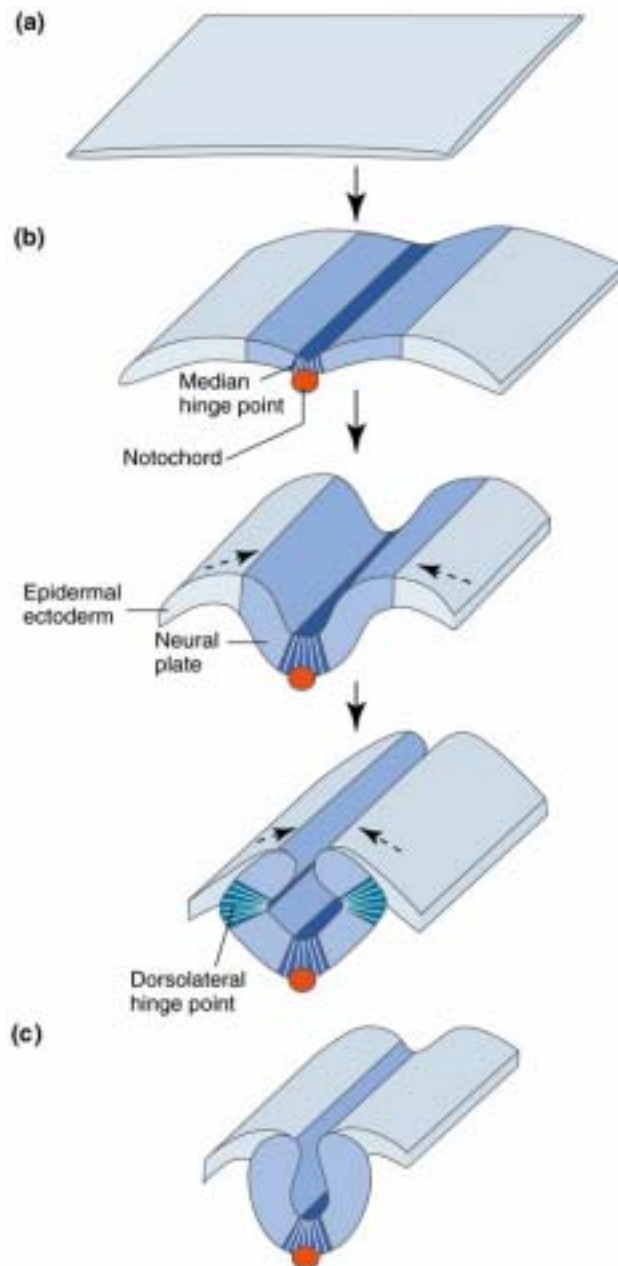


Los bordes laterales de los pliegues neurales crecen medialmente y se unen en la línea media para formar el tubo neural. Según la teoría de la cremallera, la fusión se inicia en la región cervical (segundo-sexto par de somitas) a los 20-22 días de desarrollo aproximadamente y avanza bidireccionalmente hasta que toda la placa neural se convierte en un tubo. El ectodermo de los márgenes de los pliegues neurales contiene las células que constituirán la cresta neural. Neural plate (brain) (placa neural (cerebro)), neural fold (pliegue neural), neural tube (tubo neural), somite (somita), amnion (cut edge) (borde seccionado del amnios), yolk sac (saco vitelino), ectoderm (ectodermo), neural crest cells (células de la cresta neural), mesoderm (mesodermo), notochord (notocorda).

deformación inicial de la placa neural genera pliegues neurales biconvexos que acoitan un surco neural profundo. Por consiguiente, los extremos laterales han de sufrir un cambio abrupto de su orientación para inclinarse medialmente y converger hasta su fusión. La unión de los pliegues en la línea media dorsal hace que la continuidad de la placa neural con el ectodermo de superficie se pierda y que el epitelio ectodérmico superficial de ambos lados converja en una única capa continua, de la misma forma que también se forma un tubo neural subyacente al plano cutáneo. La diferenciación de las células entre epidérmicas y neuronales se inicia justo antes de la fusión de ambos pliegues neurales y consiste en la aparición de protrusiones superficiales celulares que se interdigitarán más tarde al unirse los pliegues de ambos lados.

Las zona intermedia entre el tubo neural y el ectodermo superficial da lugar a las células de la cresta neural (figura 4.4)<sup>7</sup>. Éstas se desprenden en dirección cefalocaudal a partir del día vigesimosegundo de desarrollo y migran hacia distintas partes del cuerpo. Entonces, distinguimos la cresta neural cefálica (origina el esqueleto, el tejido conectivo, las neuronas y las células gliales faciales), los arcos faríngeos (dan lugar al timo, la dentina, los cartílagos laríngeos, los huesos maxilares y los huesecillos del oído medio), la cresta cardíaca (tejido conectivo y muscular de las grandes arterias y del septo cardíaco), la del tronco (melanocitos, ganglios de las raíces dorsales espinales, ganglios simpáticos, paraaórticos y médula suprarrenal) y la sacrovagal (ganglios parasimpáticos espláncicos).

Figura 4.5.- Elevación, plegamiento y convergencia de los pliegues neurales<sup>9</sup>.



Median hinge point (bisagra central), notochord (notocorda), epidermal ectoderm (ectodermo epidérmico), neural plate (placa neural), dorsolateral hinge point (bisagra dorsolateral).

## 4.2.2 Neurulación secundaria

La neurulación secundaria constituye un proceso totalmente diferenciado de la neurulación primaria. Se inicia una vez que el neuroporo caudal se ha cerrado. La eminencia caudal, reconocible desde los 21-22 días de desarrollo, es una masa de células neuroectodérmicas que reemplaza gradualmente la línea primitiva y a los 28-30 días se sitúa entre el extremo caudal del neuroporo posterior y la membrana cloa-

cal. La eminencia caudal da lugar a estructuras comparables a las formadas más rostralmente a partir de las tres hojas germinativas, es decir, sus derivados incluyen las porciones más distales del tubo digestivo, la notocorda, el filum terminale, el ventrículo terminal, parte del cono medular, los vasos sanguíneos y los somitas más caudales. De la eminencia caudal procede el cordón neural (o tubo neural secundario), el primordio del sistema nervioso de la parte más caudal del cuerpo. Su canal central, que ya se halla presente a niveles más cefálicos como consecuencia de la neurulación primaria, se extiende dentro del cordón neural en continuidad. A los 30 días de desarrollo el cordón neural se halla en contacto con la superficie ectodérmica. Antes de desaparecer, la eminencia caudal genera los somitas más caudales que, más tarde, originarán las vértebras sacras. La luz y el tejido neurales involucionan mientras que parte de las células neuroectodérmicas secundarias evolucionan hacia un tejido fibroso (filum terminale) comparable y en continuidad con la capa marginal (la más periférica) del tubo neural primario<sup>11</sup>. Si bien la neurulación primaria concluye a las cuatro-cinco semanas postovulatorias, la neurulación secundaria continúa al menos hasta las siete semanas.

Al finalizar el periodo embrionario la médula espinal alcanza el extremo más distal del raquis, pero durante la primera mitad de la vida prenatal asciende hacia la región lumbar.

## 4.2.3 Desarrollo craneocaudal de la neurulación

La fusión de los pliegues neurales para formar el tubo neural primario se inicia en sitios distintos según dos teorías: la clásica o de la cremallera y la de los múltiples puntos de cierre.

### 4.2.3.1 Teoría de la cremallera

Este modelo surge del estudio de embriones humanos, complementado con los hallazgos procedentes de animales. Los pliegues neurales contactan primero en la región cervical entre el segundo y el sexto par de somitas (figura 4.4)<sup>7</sup>, esto es, entre la parte más caudal del encéfalo (futuro mielencéfalo) y la médula espinal.

La fusión de los pliegues progresa después tanto en dirección cefálica como caudal. Los extremos cefálico y caudal del tubo permanecen abiertos de forma temporal (neuroporos anterior y posterior). El neuroporo anterior se cierra aproximadamente en el estadio 11 de Carnegie (18 a 20 somitas, 23-26 días de desarrollo) y el posterior en el estadio 12 de Carnegie (25 somitas, 26-30 días de desarrollo)<sup>8</sup>. Por consiguiente, el cierre del neuroporo anterior se produce a las 5<sup>+1</sup>-5<sup>+5</sup> semanas y el cierre del posterior a las 5<sup>+5</sup>-6<sup>+2</sup> semanas de amenorrea. El cierre anterior se completa mediante fusión bidireccional que procede del mesencéfalo y el diencéfalo por una parte y del telencéfalo adyacente a la placa quiasmática. Estos dos sitios de fusión se denominan labios dorsal y terminal del neuroporo anterior, respectivamente. Es posible que en la región del labio dorsal haya más de un punto de contacto y que la fusión del epitelio de superficie preceda a la del neuroepitelio. Al contrario, parece que



en el labio terminal la fusión de ambos tipos de epitelio es simultánea. La fusión central en la zona del labio terminal da lugar a la lámina terminal (estructura anatómica entre el quiasma óptico y los hemisferios cerebrales). En el estadio 13 de Carnegie el tubo neural ya está cerrado, esto es, aislado de la cavidad amniótica, y lleno de líquido endotelial. Al exceder la producción de este líquido a su reabsorción, resulta en una expansión craneocaudal con el consiguiente ensanchamiento del extremo cefálico. Otro factor que contribuye a la expansión es la actividad mitótica. Los plexos coroideos no aportan líquido, ya que no aparecen hasta dos semanas después, aproximadamente.

En la tabla 4.1 presentamos un resumen cronológicamente estructurado de la neurulación primaria.

**Tabla 4.1.- Neurulación primaria humana.**

<b>Estadios de Carnegie</b>	<b>Etapas de la neurulación</b>
<i>Estadio 8 (18 días postovulatorios)</i>	Se ven los pliegues neurales y el surco neural.
<i>Estadio 9 (20 días postovulatorios)</i>	Ya se pueden distinguir el cerebro anterior, el medio y el posterior (aún no son vesículas), aunque el surco neural está completamente abierto.
<i>Estadio 10 (22 días postovulatorios)</i>	Los pliegues neurales se empiezan a fusionar en el punto de unión entre el cerebro y la médula espinal. Las células de la cresta neural proceden principalmente del neuroectodermo.
<i>Estadio 11 (24 días postovulatorios)</i>	El neuroporo cefálico o rostral se cierra en unas pocas horas. Los dos sitios de cierre bidireccional son los labios dorsal y terminal. En el labio dorsal la fusión puede ocurrir en distintos puntos a la vez.
<i>Estadio 12 (26 días postovulatorios)</i>	El neuroporo posterior se cierra en el transcurso de un día, el nivel del cierre corresponde al 31° par de somitas (futuro nivel S2). Se inicia la neurulación secundaria (diferenciación de la parte caudal al tubo neural a partir de la eminencia caudal sin pasar previamente por la fase de placa neural).
<i>Estadio 13 (28-32 días postovulatorios)</i>	El tubo neural se ha cerrado en su totalidad.

### **4.2.3.2 Teoría de los múltiples puntos de cierre**

Van Allen y cols. establecieron una correspondencia entre los múltiples puntos de cierre observados en ratones con una serie de fetos humanos afectados por defectos del tubo neural (DTNs)<sup>12-3</sup>. La fusión del tubo neural craneal acontece en tres sitios y progresa a partir de cada punto, de forma que existen dos neuroporos anteriores. La fusión de los pliegues neurales correspondientes a la médula también es seg-

mentaria. Entonces, los puntos de cierre son los que siguen (tabla 4.2 y figura 4.6<sup>14</sup>):

- Punto 1: el primer contacto y fusión de los pliegues en aposición tiene lugar entre los pares de somitas 2 y 4, en la presunta frontera entre la médula espinal y el mielencéfalo. La progresión es bidireccional, es decir, cranealmente sobrepasa las placodas auditivas (rombencéfalo inferior) y caudalmente forma la médula espinal torácica y el neuroporo posterior. En los humanos el punto 1 parece extenderse hasta la segunda vértebra lumbar (L2).
- Punto 2: se inicia en el punto de unión entre el prosencéfalo y el mesencéfalo. Avanza también bidireccionalmente y forma dos neuroporos craneales, uno prosencefálico y otro mesencefálico. Rostralmente, este punto progresa hacia el prosencéfalo hasta que se encuentra con el punto 3. Caudalmente, progresa desde el mesencéfalo al rombencéfalo.
- Punto 3: empieza en el extremo más rostral del pliegue neural, adyacente al estomodeo o boca primitiva. Su avance es unidireccional, en dirección caudal hasta encontrarse con el punto 2 y cerrar el neuroporo prosencefálico. El extremo más craneal corresponde al labio superior facial.
- Punto 4: en el ratón se inicia en el extremo caudal del rombencéfalo y es unidireccional rostral hasta encontrarse con el punto 2, cerrando el cráneo. A diferencia del resto de los puntos, la fusión se realiza con el concurso de una membrana que eventualmente cubre el rombencéfalo. La formación de esta membrana es hoy por hoy una incógnita.
- Punto 5: presente en humanos y no en ratones, es responsable de la fusión del tubo neural entre L2 y la segunda vértebra sacra (S2). La canalización (neurulación secundaria) es la responsable de la neurulación por debajo de S2.

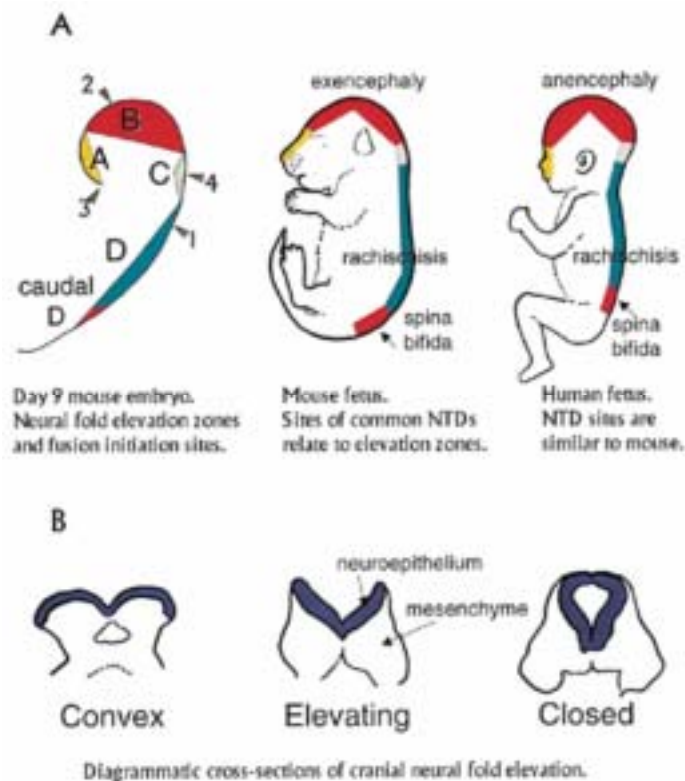
## 4.3 Definición de los defectos del tubo neural

En puridad, DTN es un término que puede aplicarse a cualquier malformación del cerebro y de la médula espinal en desarrollo. Ronald J. Lemire propone la división de los mismos entre anomalías de la neurulación y posteriores a la neurulación<sup>15</sup>. El primer grupo lo integrarían las lesiones abiertas (no cubiertas por piel), existente en torno al concepto de DTN. En este contexto, tampoco han faltado investigadores que han incluido la hidrocefalia (asociada o no a DTNs) dentro de esta

**Tabla 4.2.- Puntos de cierre del tubo neural en ratones y en humanos (modificado de M. I. Van Allen<sup>13</sup>).**

Punto de cierre	Iniciación del cierre	Dirección de la fusión
1	2°-4° par de somitas, cierre de médula rostral y caudal	↕
2	Punto de unión del prosencéfalo y del mesencéfalo	↕
3	Extremo más cefálico del tubo neural (en estomodeo)	↓
4	Cierre del rombencéfalo por una membrana	↑
5	Extremo más caudal del tubo neural primario (S2) (sólo en humanos)	↑

**Figura 4.6.- Puntos de cierre del tubo neural en el ratón y defectos más característicos según la afectación de los mismos<sup>14</sup>.**



No se representa el punto 5 por ser propio de los embriones humanos. Day 9 mouse embryo (embrión de ratón en el día 9 de desarrollo), neural fold elevation zones and fusion initiation sites (zonas de elevación de los pliegues neurales y puntos de iniciación de la fusión), mouse fetus (feto de ratón), sites of common NTDs relate to elevation zones (las localizaciones de los defectos del tubo neural más frecuentes se relacionan con las zonas de elevación), human fetus (feto humano), NTD sites are similar to mouse (las localizaciones de los defectos del tubo neural son similares a las del ratón), diagrammatic cross-sections of cranial neural fold elevations (cortes transversales esquemáticos de la elevación de los pliegues neurales craneales), convex (convexo), elevating (en elevación), closed (cerrado), neuroepithelium (neuroepitelio), mesenchyme (mesénquima).

categoría de anomalías<sup>15</sup>. Estas divergencias surgen de una taxonomía basada en criterios anatomoclínicos, al igual que ha ocurrido con otros defectos congénitos. Ello ha propiciado que la investigación epidemiológica de la etiología de los DTNs no nos haya brindado los resultados deseados. Entonces, es frecuente que un mismo DTN pueda tener diferentes etiologías (heterogeneidad etiológica) y que una misma etiología dé lugar a distintos DTNs (heterogeneidad clínica) (ver más adelante).

**Tabla 4.3.- Clasificación de los defectos del tubo neural según la etapa afectada del desarrollo embriológico (modificado de R. J. Lemire<sup>15</sup>).**

<i>Localización</i>	<i>Alteración de la neurulación (defectos abiertos)</i>	<i>Alteración postneurulación (defectos cerrados)</i>
<b><i>Craneoespinal</i></b>	Craneorraquisquisis	Iniencefalia
<b><i>Craneal</i></b>	Anencefalia	Encefalocele
<b><i>Espinal</i></b>	Meningomielocele	Lesiones lumbosacras*

\* Se subdividen según el origen tisular específico: tubo neural (espina bífida sacra, diplomielia, mielocistocele, endimoma, neurofibroma, ganglioneuroma); meninges y vértebras (meningocele, agenesia sacra, espina bífida oculta, vértebras lumbares ausentes, cordoma, condroma); otros tejidos (lipomeningocele, lipoma, seno dérmico, quiste dermoide, teratoma, hemangioma, hemangioendotelioma, fístula neurentérica, nevus cutáneo, endimoma mixopapilar, hoyuelo sacro).

La situación mencionada no deriva de la desidia de los investigadores, puesto que han sido muchos los intentos de establecer una clasificación basada en criterios etiológicos, aunque no han sido todo lo fructíferos que sería deseable<sup>16-8</sup>. En esta línea, la teoría de los múltiples puntos de cierre constituye una de las alternativas más prometedoras (sección 4.2.3.2).

En general, los estudios sobre prevención de estas anomalías con ácido fólico se suelen centrar sobre la anencefalia, el mielomeningocele, el encefalocele y la iniencefalia siempre que no sean sindrómicos (capítulo 10). Otras anomalías como la craneorraquisquisis, la espina bífida oculta o la agenesia sacra no se suelen incluir. Es posible que la omisión de las dos primeras entidades tenga que ver con su subregistro, ya que la craneorraquisquisis tiene una letalidad elevada y precoz<sup>19</sup>, y la espina bífida oculta o es asintomática o si da síntomas, éstos se suelen manifestar tardíamente. En cuanto a la agenesia sacra, es un hallazgo característico en la embriofetopatía diabética, es de herencia autosómica dominante o aparece dentro de un cuadro polimalformativo<sup>20-2</sup> (capítulo 2).

Es tentador pensar en la folato-sensibilidad como nexo de unión entre ciertas variedades de DTNs, sin embargo, que las dos terceras partes que responden a los folatos no tengan características anatomoclínicas propias, que los DTNs no sindrómicos asociados a otros defectos mayores también sean respondedores<sup>23</sup> y que, además, sea posible que otros defectos aislados no relacionados (fisuras labiopalatinas, anomalías urológicas, de extremidades, cardiopatías congénitas y trisomía 21) también lo sean (capítulo 11) resta plausibilidad a esta hipótesis.

## 4.4 Patogenia de los defectos del tubo neural

La patogenia responsable permite dividir los DTNs según la etapa afectada de la neurulación, el momento de la apertura del tubo neural (durante o después de la neurulación), el mecanismo de producción del mismo y su coexistencia con otras anomalías.

### 4.4.1 Etapa afectada de la neurulación

Parece poco probable que la inducción neural esté implicada en la mayoría de DTNs, puesto que estas malformaciones suelen implicar plegamiento o fusión defectuosa de una placa neural inicialmente normal<sup>3</sup>.

Si utilizamos el modelo de la cremallera, la hipótesis es que los DTNs son la consecuencia del fallo del cierre de los neuroporos anterior (anencefalia), posterior (espina bífida), o de la fusión de los pliegues neurales (raquisquisis, craneorraquisquisis).

Las modalidades de DTNs generadas por los fallos aislados o asociados en la fusión de los distintos puntos de cierre se especifican a continuación (tabla 4.4):

- ❑ Punto 1: espina bífida cervical y/o torácica.
- ❑ Punto 2: meroacrania o ausencia de los huesos parietales con los occipitales y el frontal intactos. Es el tipo de anencefalia más frecuente. La holoacrania afecta a los huesos parietales, occipitales y frontal (puntos 2 y 4).
- ❑ Punto 3: se concreta en faciosquisis con hendidura facial que alcanza el labio superior. La faciosquisis y la faciorraquisquisis son raras en ausencia de bandas amnióticas. Otros casos menos frecuentes de faciosquisis concomitante con anencefalia se pueden observar en la displasia frontonasal.
- ❑ Punto 4: la escama occipital está ausente y el cerebelo es anormal. Como el cierre del punto 4 está mediado por una membrana, se pueden observar diferentes gradaciones de cobertura del área occipital. Así, en la craneosquisis occipital la ausencia de dicha membrana es completa y en el encefalocele occipital la membrana está presente a diferencia de las estructuras mesodérmicas subyacentes. Este punto es el más variable en los humanos e incluso se extiende a la región cervical en algunos individuos.
- ❑ Punto 5: espinas bífidas entre L2 y S2.

La teoría de los múltiples puntos de cierre goza de mayor respaldo en la actualidad, puesto que parece explicar satisfactoriamente los distintos riesgos de recurrencia, la frecuencia de otras anomalías asociadas y la especificidad de localización de las lesiones en casos de teratogenicidad o enfermedades genéticas<sup>12-3</sup> (tabla 4.5)<sup>9</sup>. Aun con todo, Van Allen vaticina que puede haber defectos que no se puedan adscribir a ninguno de los puntos de cierre antedichos (DTNs desplazados lateralmente, espina bífida quística mediotorácica). Ello puede ocurrir especialmente en zonas de alta incidencia a causa de factores que no tengan preferencia por ningún punto de cierre, por azar, o a causa de etiologías aún no establecidas<sup>13</sup>.

## 4.4.2 Momento de la apertura del tubo neural

Para la gran mayoría de los DTNs se descarta la reapertura de un tubo neural cuya neurulación ha culminado adecuadamente (teoría hidrodinámica de Gardner, citada por Morgagni en 1761)<sup>24</sup> o, lo que es lo mismo, se cree que el fallo de la neurulación es primario (hipótesis propuesta inicialmente por von Recklinghausen en 1886)<sup>13,15</sup>.

## 4.4.3 Mecanismo de producción

Se plantean distintas posibilidades:

- Alteración in situ: constituye la posibilidad más aceptada. Consiste en un desarrollo local anómalo.
- Fallo del aporte sanguíneo: secundario a un desarrollo anormal de las carótidas internas en el caso de la anencefalia<sup>25-6</sup> y de las arterias próximas al defecto raquídeo en el caso de la espina bifida<sup>27</sup>. Esta hipótesis se fundamenta en el hallazgo de una irrigación arterial anormal en la zona del defecto y en que el desarrollo vascular arterial precede el cierre del tubo neural<sup>27</sup>.
- Hiperpresión del líquido cefalorraquídeo: se corresponde con la teoría hidrodinámica del apartado anterior<sup>28</sup>.

## 4.4.4 Anomalías asociadas

Según el cuadro clínico que presenta el individuo afectado distinguimos:

- a) DTNs aislados: un solo DTN sin otros defectos.
- b) DTNs combinados: dos o más DTNs sin otros defectos.
- c) Defectos múltiples: uno o más DTNs junto con otros defectos.

**Tabla 4.4.- Clasificación de los defectos del tubo neural según los puntos de cierre afectados y características asociadas a cada tipo (modificado de M. I. Van Allen<sup>13</sup>).**

Clase	Denominación del DTN	Puntos de cierre	Anomalías no neurológicas asociadas	Riesgo recurrencia	Etiologías específicas
<b>CRANEALES</b>	Meroacrania	2	15%	2-5%	Tabla 4.5
	Holoacrania	2,4	20%	2-5%	Tabla 4.5
	Craneorraquisquis occipital	4	Frecuente	No específico	Tabla 4.5
	Holoacrania con raquisquis cervical	2,4,1 rostral	Frecuente	No específico	Diabetes mellitus
	Faciocraneosquis	3,2,4	Siempre	¿?	Tabla 4.5
	Faciocraneorraquisquis	3,2,4,1	Siempre	¿?	Desconocidas
	Craneorraquisquis	2,4,1	60%	No específico	Diabetes mellitus, hipertermia
<b>ENCEFALOCELES</b>	Frontal	Neuroporo prosencefálico (3-2)	58%	No específico	Tailandia, Birmania
	Parietal	Neuroporo mesencefálico (2-4)	-	2-5%	-
	Occipital	4	36%	¿?	Hipertermia
	Occipito-cervical	4 y 1 rostral	-	7-8%	Tabla 4.5
<b>ESPINAS BÍFIDAS QUÍSTICAS</b>	Cérvico-torácica	1 rostral	90%	7,8%	Etnia sikh
	Toraco-lumbar	1 medio y caudal	30%	¿?	-
	Lumbar	1 caudal	-	¿?	-
	Lumbo-sacra (hasta S2)	5	Poco frecuentes	0,7%	Valproato
	Sacra (por debajo de S2)	Canalización	Poco frecuentes	¿?	Valproato, agenesia sacra (autosómica dominante), etc.

**Tabla 4.5.- Etiologías conocidas de los defectos del tubo neural y puntos de cierre afectados (modificado de M. I. Van Allen<sup>13</sup>).**

Clasificación etiológica	Causas	Puntos de cierre afectados
<b>NUTRICIONALES</b>	Deficiencia de folatos	2, 4, 1
<b>SÍNDROMES TERATOGÉNICOS (EMBRIOPATÍAS POR FACTORES AMBIENTALES)</b>	Diabetes mellitus	2, 1 caudal, 5, canalización, regresión caudal
	Hipertermia	2-4, 4 (encefalocele)
	Alcohol	2, 1
	Aminopterina	Anencefalia, encefalocele
	Carbamazepina	2, 1 caudal
	Valproato	5, canalización
	Warfarina	Encefaloceles
<b>SÍNDROMES CROMOSÓMICOS (CROMOSOMOPATÍAS)</b>	Trisomía 13	2-4, 1 caudal
	Trisomía 18	2-4, 1 caudal
	Monosomía X0	2-4, 4 (encefalocele)
	Triploidía	2-4, 1 caudal
<b>SÍNDROMES GÉNICOS (GENOPATÍAS)</b>	Displasia fronto-facio-nasal	3, neuroporo 3-2
	DTN autosómico dominante	Variable
	DTN X-ligado	Variable
	Meckel-Gruber	4
	Complejo OEIS (onfalocele-extrofia-ano imperforado-defectos espinales)	5, canalización
	Roberts-SC focomelia	Neuroporo 3-2
	Walker-Warburg	Neuroporo 2-4, 4 (encefalocele)
<b>SECUENCIAS</b>	Bandas amnióticas	3, 2-4, 4, 1 caudal, 5
	Limb-body-wall complex	3, 2-4, 4 (encefalocele), 1 caudal, 5, canalización
<b>OTROS</b>	Agnesia sacra	Canalización
	Etnia sikh	4-1 rostral, 1 rostral

Lo más común es hallar DTNs aislados. Con respecto al punto b) cualquier combinación de DTNs es posible. El grupo c) es el conjunto más complejo y ha sido subdividido en:

- Secuencias: el DTN puede ser la anomalía iniciadora (anencefalia-hipoplasia suprarrenal, espina bífida-pies zambos) o puede ser secundario a un evento primario (bridas amnióticas).
- Defectos de zona de desarrollo: defectos de línea media, regresión caudal, displasia frontonasal.
- Asociaciones: VACTERAL.
- Espectros: espectro facio-aurículo-vertebral con encefalocele y espina bífida; pentalogía de Cantrell con anencefalia.



- Síndromes: encefalocele, espina bífida y anencefalia son los DTNs más frecuentemente asociados, por este orden.
- Polimalformados no encuadrables.

La lista de síndromes bien identificados que pueden incluir un DTN es muy extensa (aquí citamos 121) (tabla 4.6), y ello sin enumerar otros muchos cuadros que se clasifican bajo otros subgrupos y dentro de la variedad de defectos múltiples.

## 4.5 Bibliografía

1. Müller F, O'Rahilly R. The development of the human brain, the closure of the caudal neuropore, and the beginning of secondary neurulation at stage 12. *Anat Embryol* 1987;176:413-30.
2. Langman J. Periodo embrionario (cuarta a octava semanas). En: *Embriología médica*. 4ª ed. México: Editorial Médica Panamericana; 1985. p. 63-80.
3. Copp AJ, Brook FA, Estibeiro P, Shum ASW, Cockroft DL. The embryonic development of mammalian neural tube defects. *Prog Neurobiol* 1990;35:363-403.
4. O'Rahilly R, Müller F. Neurulation in the normal human embryo. *Ciba Found Symp* 1994;181:70-89.
5. Langman J. Disco germinativo trilaminar (tercera semana de desarrollo). En: *Embriología médica*. 4ª ed. México: Editorial Médica Panamericana; 1985. p. 55-62.
6. Toivonen S, Tarin D, Saxen L. The transmission of morphogenetic signals from amphibian mesoderm to ectoderm in primary induction. *Differentiation* 1976;5:49-55.
7. Marvin Sodicoff. Embriology of the CNS. Disponible en: URL: <http://courses.temple.edu/neuroanatomy/lab/embryo> (acceso 16/5/03).
8. O'Rahilly R. Developmental stages in human embryos. Disponible en URL: [http://www.natmeduse.afip.org/embryo/html/table\\_stages.html](http://www.natmeduse.afip.org/embryo/html/table_stages.html) (acceso 23/12/02).
9. Yonsei University Department of Biology. Neurulation and axis induction. Disponible en: <http://biology.yonsei.ac.kr/dev> (acceso 17/5/03)).
10. Morriss-Kay GM. Growth and development of pattern in the cranial neural epithelium of rat embryos during neurulation. *J Embryol exp Morphol* 1981;65(Suppl):225-41.
11. Niewelstein RA, Hartwig NG, Vermeij-Keers C, Valk J. Embryonic development of the mammalian caudal neural tube. *Teratology* 1993;48:21-31.
12. Van Allen MI, Kalousek DK, Chernoff GF, Juriloff D, Harris M, McGillivray BC, y cols. Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans. *Am J Med Genet* 1993;47:723-43.
13. Van Allen MI. Multisite neural tube closure in humans. *Birth Defects: Original Article Series* 1996;30:203-25.
14. Juriloff DM, Harris MJ. Mouse models for neural tube defects. *Hum Mol Genet* 2000;9:993-1000.
15. Lemire RJ. Neural tube defects. *JAMA* 1988;259:558-62.
16. Khoury MJ, Erickson JD, James LM. Etiologic heterogeneity of neural tube defects. II. Clues from family studies. *Am J Hum Genet* 1982;34:980-7.
17. Park CH, Stewart W, Khoury MJ, Mulinare J. Is there etiologic heterogeneity between upper and lower neural tube defects? *Am J Epidemiol* 1982;115:538-48.
18. Khoury MJ, Erickson JD, James LM. Etiologic heterogeneity of neural tube defects: clues from epidemiology. *Am J Epidemiol* 1991;134:691-8.
19. Shiota K, Nakatsu T. Normal and abnormal neurulation in humans: Implications for pathogenesis of neural tube defects. *Neuropathology* 1998;18:415-8.
20. Morales L, Pedrola D. Afecciones de la médula y del sistema nervioso periférico. En: Cruz M. *Tratado de Pediatría*. 6ª ed. Barcelona: Espaxs; 1989. p. 1739-52.
21. Henrion R, Dumez Y, Aubry JP, Aubry MC. Anomalías del sistema nervioso central. En: *Manual de diagnóstico prenatal y medicina fetal*. 1ª ed. Barcelona: Masson, S.A.; 1990. p. 104-25.
22. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). Spina bifida. Baltimore, Maryland (EE.UU.): Johns Hopkins University; 2003. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=182940> (acceso 4/1/03).
23. Khoury MJ, Shaw GM, Moore Ca, Lammer EJ, Mulinare J. Does periconceptional multivitamin use reduce the risk of neural tube defects associated with other birth defects? Data from two population-based case-control studies. *Am J Med Genet* 1996;61:30-6.
24. Campbell LR, Sohal GS. The pattern of neural tube defects created by secondary reopening of the neural tube. *J Child Neurol* 1990;5:336-40.
25. Vogel FS, McClenahan JL. Anomalies of major cerebral arteries associated with congenital malformations of brain with special reference to pathogenesis of anencephaly. *Am J Pathol* 1952;28:701-23.
26. Vogel FS. The anatomic character of the vascular anomalies associated with anencephaly: with consideration of the role of abnormal angiogenesis in the pathogenesis of the cerebral malformation. *Am J Pathol* 1961;39:163-74.

**Tabla 4.6.- Síndromes con defectos del tubo neural integrados en su cuadro de anomalías (Dr. Joaquín Salvador, comunicación personal).**

<p><b>Síndromes teratogénicos (Embriofetopatías ambientales)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ácido retinoico</li> <li>- Ácido valproico</li> <li>- Alcohol etílico</li> <li>- Ametopterina</li> <li>- Aminopterina</li> <li>- Anticoagulantes</li> <li>- Carbamazepina</li> <li>- Cocaína</li> <li>- Diabetes mellitus materna</li> <li>- Efavirenz</li> <li>- Hipertermia</li> <li>- Rubéola materna</li> <li>- Talidomida</li> <li>- Trimetadona</li> </ul> <p><b>Síndromes cromosómicos (Cromosomopatías)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anillo del 13</li> <li>- Anillo del 22</li> <li>- Delección 13q</li> <li>- Delección 2q</li> <li>- Delección Xp</li> <li>- Duplicación 11q</li> <li>- Duplicación 13p</li> <li>- Duplicación 1q</li> <li>- Duplicación 22p</li> <li>- Duplicación 2p</li> <li>- Duplicación 3q</li> <li>- Duplicación 5q</li> <li>- Duplicación 6q</li> <li>- Duplicación 7p</li> <li>- Duplicación 8q</li> <li>- Monosomía X (Turner)</li> <li>- Tetraploidía</li> <li>- Tetrasomía parcial 22</li> <li>- Triploidía</li> <li>- Trisomía 13 (Patau)</li> <li>- Trisomía 14</li> <li>- Trisomía 14 en mosaico</li> <li>- Trisomía 15</li> <li>- Trisomía 16</li> <li>- Trisomía 18 (Edwards)</li> <li>- Trisomía 20 en mosaico</li> <li>- Trisomía 21 (Down)</li> <li>- Trisomía 8 en mosaico</li> <li>- Trisomía 9 en mosaico</li> </ul> <p><b>Síndromes de etiología heterogénea</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Beckwith-Wiedemann</li> <li>- Hipoplasia fémur-cara inusual</li> <li>- Rubinstein-Taybi</li> </ul> <p><b>Síndromes de etiología desconocida</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cérvico-óculo-acústico</li> <li>- Fémur-peroné-cúbito</li> <li>- Fried</li> <li>- Goldberg</li> <li>- Hemi 3</li> <li>- Óculo-cerebro-cutáneo</li> <li>- Pseudotrisomía 13/Donnai</li> <li>- von Voss-Cherstvoy</li> </ul> <p><b>Síndromes génicos (Genopatías)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aarskog</li> <li>- Acrocallosal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Adams-Oliver</li> <li>- Antley-Bixler</li> <li>- Apert</li> <li>- Baller-Gerold</li> <li>- Braquio-esqueleto-genital</li> <li>- Carpenter</li> <li>- Cerebro-costomandibular</li> <li>- CHILD</li> <li>- Coach</li> <li>- Cohen</li> <li>- Costilla corta-polidactilia Majewski</li> <li>- Crane-Heise</li> <li>- Disostosis acrofacial tipo Catania</li> <li>- Disostosis cleidocraneal</li> <li>- Disostosis escápulo-iliaca</li> <li>- Displasia acro-péctoro-vertebral F</li> <li>- Displasia craneotelencefálica</li> <li>- Displasia dissegmental Rolland-Desbuquois</li> <li>- Displasia dissegmental Silvermen-Handmaker</li> <li>- Displasia fronto-facio-nasal</li> <li>- Displasia ósteo-ungueal</li> <li>- Distrofia muscular de Fukuyama</li> <li>- Dubowitz</li> <li>- Ectrodactilia-obstrucción urinaria</li> <li>- Feminización testicular</li> <li>- Forámenes parietales persistentes</li> <li>- Fountain</li> <li>- Fraser</li> <li>- Freeman-Sheldon</li> <li>- Fullana</li> <li>- Goldston</li> <li>- Goltz-Gorlin</li> <li>- Gordon</li> <li>- Gorlin-Goltz</li> <li>- Hallermann-Streiff</li> <li>- Hidroretalud</li> <li>- Jarcho-Levin</li> <li>- Keutel</li> <li>- Knobloch</li> <li>- Kousseff</li> <li>- Lehman</li> <li>- LEOPARD</li> <li>- Marfan</li> <li>- Meckel-Gruber</li> <li>- Michels</li> <li>- Midas</li> <li>- Miller</li> <li>- Mohr</li> <li>- Neu-Laxova</li> <li>- Noonan</li> <li>- Óculo-encéfalo-hepato-renal</li> <li>- OEIS</li> <li>- Oto-palato-digital II</li> <li>- Pterigium múltiple</li> <li>- Pterigium poplíteo</li> <li>- Roberts</li> <li>- Ruvalcaba</li> <li>- Steinfeld</li> <li>- Toracoabdominal</li> <li>- Velo-cardio-facial</li> <li>- Verloes</li> <li>- Waardenburg I</li> <li>- Waardenburg II</li> <li>- Walker-Warburg</li> <li>- Weissenbacher-Zweymuller</li> </ul>
---	---

27. Stevenson RE, Kelly JC, Aylsworth AS, Phelan MC. Vascular basis for neural tube defects: a hypothesis. *Pediatrics* 1987;80:102-6.
28. Keen JA. The morphology of the skull in anencephalic monsters. *S Afr J Lab Clin Med* 1962;8:1-9.

# **5 Niveles preventivos**

## **5.1 Concepto de prevención**

Según Jeniceck y Cléroux<sup>1</sup>, la prevención es todo acto destinado a evitar fenómenos sanitarios esperados, por lo tanto, es la esencia misma del control de todas las enfermedades, sean infecciosas o no.

## **5.2 Los niveles de prevención y su aplicación a las alteraciones de la neurulación**

La prevención se desglosa en tres modalidades, así, la prevención primaria tiene por objeto reducir la incidencia, la secundaria la prevalencia, mientras que la terciaria disminuye la diversificación del cuadro clínico. La tabla 5.1 ilustra los distintos niveles con relación a los defectos del tubo neural.

La gama de medidas preventivas enunciadas se irán desarrollando de acuerdo con su importancia para la tesis que aquí se presenta.

## **5.3 Bibliografía**

1. Métodos epidemiológicos generales de control y erradicación de las enfermedades infecciosas y no infecciosas. En: Jeniceck M, Cléroux R. Epidemiología: Principios, técnicas, aplicaciones. 1ª ed. Barcelona: Salvat Editores, S.A.; 1987. p. 275-302.

**Tabla 5.1.- Niveles de prevención de los defectos del tubo neural.**

<i>Niveles preventivos</i>	<b>Concepto y aplicación</b>	<b>Estado (fase de la enfermedad)</b>	<b>Medidas de control (prevención)</b>					
<b>Prevención primaria</b>	<i>Concepto</i>	Salud	Medidas preventivas poblacionales					
	<i>Aplicación a los DTNs</i>	Gestantes potenciales sanas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ingesta de alimentos ricos en folatos</li> <li>- Suplementación vitamínica periconcepcional (0,4 mg diarios de ácido fólico)</li> <li>- Enriquecimiento de cereales</li> </ul>					
	<i>Concepto</i>	Presencia de factores predisponentes	Medidas específicas en sujetos predispuestos					
	<i>Aplicación a los DTNs</i>	Gestantes potenciales con: <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Antecedentes familiares de DTNs</td> <td>Suplementación vitamínica periconcepcional (4 mg diarios de ácido fólico)</td> </tr> <tr> <td>Diabetes mellitus insulino-dependiente</td> <td>Optimización del control metabólico</td> </tr> <tr> <td>Epilepsia, tratamiento antimicrobial (especialmente valproato)</td> <td>Sustitución de fármacos, si precisa, o suspensión de tratamiento</td> </tr> </table>	Antecedentes familiares de DTNs	Suplementación vitamínica periconcepcional (4 mg diarios de ácido fólico)	Diabetes mellitus insulino-dependiente	Optimización del control metabólico	Epilepsia, tratamiento antimicrobial (especialmente valproato)	Sustitución de fármacos, si precisa, o suspensión de tratamiento
Antecedentes familiares de DTNs	Suplementación vitamínica periconcepcional (4 mg diarios de ácido fólico)							
Diabetes mellitus insulino-dependiente	Optimización del control metabólico							
Epilepsia, tratamiento antimicrobial (especialmente valproato)	Sustitución de fármacos, si precisa, o suspensión de tratamiento							
<b>Prevención secundaria</b>	<i>Concepto</i>	Enfermedad en su estadio inicial	Detección precoz y tratamiento					
	<i>Aplicación a los DTNs</i>	Gestación con feto afectado de DTN	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diagnóstico prenatal de los DTNs</li> <li>- Control gestacional y atención al parto en centro hospitalario de tercer nivel</li> <li>- Cirugía intrauterina de la espina bífida</li> <li>- Interrupción voluntaria del embarazo</li> </ul>					
<b>Prevención terciaria</b>	<i>Concepto</i>	Enfermedad avanzada, irreversible, a menudo grave y de evolución crónica, con serias repercusiones sociales	Cuidados médicos y sociales de anticipación					
	<i>Aplicación a los DTNs</i>	Nacido con acrania	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cuidados mínimos postnatales</li> </ul>					
		Nacido con espina bífida	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cierre del defecto y manejo de las secuelas: hidrocefalia, retraso psicomotor, reflujo vésicoureteral, vejiga espástica, incontinencias urinaria y fecal, hipomovilidad de extremidades inferiores, alergia al látex, etc.</li> <li>- Escolarización para minusválidos, eliminación de barreras arquitectónicas, medidas para la integración social y en el mercado laboral, protección social</li> </ul>					
	Nacido con encefalocele	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cierre quirúrgico del defecto</li> <li>- Educación especial si hubiera retraso psicomotor</li> </ul>						

DTN (defecto del tubo neural).

# 6 El diagnóstico prenatal de las anomalías del tubo neural

## 6.1 Introducción

La detección de los defectos del tubo neural (DTNs) en etapas precoces de la gestación precisa de programas de escrutinio poblacional. Dichos programas pueden ser universales (dirigidos a la población general o de bajo riesgo) o selectivos (destinados al subgrupo de embarazos de alto riesgo). Independientemente de la modalidad de cribado, contamos con métodos bioquímicos (alfafetoproteína (AFP) en suero materno (SM)) y de imagen (ecografías). La capacidad discriminativa de estas pruebas se valora, al igual que la de otras exploraciones diagnósticas, mediante el índice de detección o la sensibilidad (proporción de individuos enfermos con resultados anormales) y la proporción de falsos positivos (proporción de individuos sanos con resultados anormales)<sup>1</sup>.

Puesto que la acrania es de diagnóstico fácil y precoz mediante ecografía, el objetivo príncipes del cribado tanto bioquímico como ecográfico es la detección de los fetos con espina bífida.

## 6.2 Concentraciones de alfafetoproteína en las anomalías de cierre del tubo neural

### 6.2.1 Alfafetoproteína: origen, estructura y función

La AFP es una  $\alpha$ -globulina y fue descubierta en 1956 mediante electroforesis del suero humano fetal<sup>2</sup>. La banda de esta proteína se halla en la posición  $\alpha$ 1, junto a la albúmina sérica. La AFP no se puede aislar a partir del suero del adulto humano. Bioquímicamente, es una glucoproteína cuyo peso molecular es de 70 000 daltons. Su secuencia de aminoácidos tiene gran homología con la de la albúmina, dado que el 42% de los últimos 590 residuos son idénticos<sup>3</sup>.

El gen que codifica la AFP pertenece a un “cluster” de cuatro genes situado en la región 4q11-q13 en los humanos<sup>4</sup>. La ubicación de estos genes de centrómero a telómero es: proteína de transporte de la vitamina D, afamina, AFP y albúmina. Esta familia de genes tiene una serie de características propias<sup>5</sup>: origen filogenético común a partir de un gen ancestral, expresión preferente en los hepatocitos, estructura proteica típica con tres dominios definidos por las posiciones fijas de residuos de cisteína que establecen puentes disulfuro<sup>6</sup> y función transportadora de diversos ligandos.

La síntesis de AFP se inicia fundamentalmente en el saco vitelino, así como en el endodermo del tracto gastrointestinal y en el divertículo hepático (hepatocitos primitivos). A partir de la undécima semana de amenorrea, al sufrir atresia el saco vitelino, el hígado fetal, y en menor grado, el tracto gastrointestinal, asumen su producción<sup>7</sup>. En el suero fetal, se empieza a detectar a partir de la sexta semana de gestación, y presenta un pico de concentración entre las semanas 12 y 16. Luego, sus niveles descienden gradualmente hasta que a las 32 semanas comienzan a caer rápidamente, a causa del cese de su síntesis<sup>8</sup>.

En cuanto a su función, ya se ha mencionado su probable papel como proteína transportadora de hormonas esteroideas en la sangre fetal, dada su similitud con la albúmina<sup>6</sup>, así como la sustitución de la síntesis hepática de AFP por la de albúmina en las etapas tardías del desarrollo intrauterino, a consecuencia de la represión de su producción en el hígado maduro<sup>9</sup>. Destacamos la afinidad preferencial de la AFP por los ácidos grasos poliinsaturados, que constituyen una fuente energética básica para las células en crecimiento<sup>3</sup>. También se piensa que tiene funciones inmunosupresoras, protegiendo al feto del sistema inmune materno<sup>10</sup>.

Al alcanzar las concentraciones de AFP en suero fetal un determinado umbral, se produce el paso de esta proteína al líquido cefalorraquídeo (LCR)<sup>11</sup>. Desde el segundo trimestre, el feto elimina esta proteína del suero fetal a través de la orina, el meconio y la bilis. A partir de dichas excretas, la AFP llega al líquido amniótico (LA). Sin embargo, la AFP ya es detectable en el fluido amniótico a partir de los 43 días de gestación. Ello se atribuye a la transferencia a partir del saco vitelino, del LCR antes del cierre del tubo neural, y de los capilares fetales antes de su impermeabilización a consecuencia de la queratinización cutánea<sup>12</sup>.

La AFP en SM (AFP-SM) proviene principalmente del compartimiento fetal. El paso al torrente circulatorio de la gestante se lleva a cabo atravesando el amnios, por lo tanto, su concentración es muy inferior a la fetal. Los niveles de AFP-SM aumentan hasta la semana 32, probablemente por aumento de la superficie placentaria y de la porosidad del amnios en este periodo<sup>8</sup>. La tasa de incremento de dicha proteína en el SM es del 15-20% semanal en el transcurso del segundo trimestre<sup>1</sup>.

Las diferencias de concentración de AFP en los distintos compartimientos se ilustra mediante las siguientes correspondencias: los niveles de AFP en el suero fetal se miden en mg/dL, en el LA en  $\mu\text{g/mL}$ , y en el SM en ng/mL.

## **6.2.2 Fundamentos del diagnóstico mediante alfafetoproteína**

El traspaso directo de AFP desde el torrente sanguíneo fetal (soluciones de continuidad en la superficie fetal, hematomas placentarios) o desde el sistema nervioso (DTNs) causa niveles patológicamente elevados de la misma tanto en LA como en SM. De hecho, la relación entre DTNs y AFP aumentada en el LA se estableció en 1972, gracias a las investigaciones de Brock y Sutcliffe<sup>13</sup>. Dos años más tarde, Wald y Brock<sup>14</sup> evidenciaron valores más altos de AFP-SM en las portadoras de fetos con defectos abiertos del tubo neural. Desde este momento, se inició el despistaje

bioquímico de ciertas malformaciones congénitas (celosomías y DTNs) mediante la determinación de la AFP en sangre materna, a principios del segundo trimestre de embarazo.

Las concentraciones de AFP tanto en SM como en LA se miden en múltiplos de mediana (MoM)<sup>1</sup>. La elección de la mediana en lugar de la media obedece a que la distribución de la AFP es asimétrica, desviándose hacia la derecha. Entonces, una forma de normalizar la distribución es la obtención de MoM, que es el resultado del cociente entre la concentración de AFP de una muestra determinada y la correspondiente a la mediana de la población de la misma edad gestacional. Por definición, el valor más frecuente para las gestantes sanas es de 1 MoM. Destacamos que los valores de MoM permiten la comparación de resultados procedentes de distintos laboratorios, de distintas edades gestacionales y de distintas circunstancias clínicas.

### **6.2.3 El cribado bioquímico: la alfafetoproteína en suero materno**

El Reino Unido fue pionero en la introducción del cribado bioquímico de los DTNs. De hecho, las posibilidades del cribado de los DTNs con AFP-SM se establecieron a partir del Estudio Colaborativo del Reino Unido sobre Alfafetoproteína<sup>15</sup>, publicado en 1977. Éste incluyó 146 mujeres portadoras de un feto anencéfalo, 142 de un hijo con espina bífida, 13 de uno con encefalocele, así como 18 684 embarazos únicos y 163 gemelares sin DTNs. Las conclusiones más sobresalientes fueron:

- El máximo poder discriminativo del SM está entre las 16 y 18 semanas de gestación (SG), con unas concentraciones promedio de 6,4 MoM para los fetos acráneos y de 3,8 MoM para los fetos con espina bífida abierta.
- Los MoM se fijan como unidad de medida, a consecuencia de su mayor estabilidad y facilidad de obtención.
- Es improbable que la proporción de gestaciones con DTNs a partir de un punto de corte preestablecido de MoM varíe significativamente de un laboratorio a otro o a lo largo del tiempo. Al contrario, el porcentaje de gestaciones no afectadas a partir de unos niveles determinados de AFP es susceptible de variar según la precisión de la cuantificación de la AFP y/o la datación de la gestación.
- Las sensibilidades a las 16-18 SG son del 88% para la anencefalia y del 79% para la espina bífida abierta.
- El 3% de gestaciones únicas no afectadas tendrán valores de AFP-SM entre 2 y 5 MoM, lo cual indica un considerable solapamiento de niveles de AFP en gestaciones normales y patológicas.

Cuckle<sup>1</sup> ha estimado las sensibilidades de la AFP-SM para un punto de corte de 2,5 MoM a partir de los datos de la investigación anterior<sup>15</sup> (tabla 6.1), donde se observa que el cálculo de la edad gestacional mediante biometría ecográfica mejora la sensibilidad del cribado.

**Tabla 6.1.- Porcentajes de valores de alfafetoproteína en suero materno superiores a 2,5 múltiplos de mediana según la modalidad de la anomalía de tubo neural fetal, las edades gestacionales y los métodos de cálculo de la misma.**

Modalidad de defecto de tubo neural fetal	Edad gestacional (semanas)		
	15	17	19
<i>Edad gestacional calculada según FUR</i>			
Anencefalia	74%	89%	89%
Espina bífida abierta	57%	72%	66%
Todas las espinas bífidas*	48%	60%	55%
Sin DTN	2,5%	2,5%	2,5%
<i>Edad gestacional calculada según DBP</i>			
Espina bífida abierta	73%	85%	81%
Todas las espinas bífidas*	65%	75%	72%
Sin DTN	1,9%	1,9%	1,9%

FUR (fecha de última regla), DBP (diámetro biparietal).

\* Se asume que una de cada seis espinas bífidas es cerrada, lo que se traduce en niveles normales de alfafetoproteína en suero materno.

Estos exitosos resultados favorecieron la introducción del cribado bioquímico en España una década más tarde: Madrid<sup>16</sup> (área sanitaria de la Maternidad La Paz) en 1986, Asturias<sup>17</sup> en 1987 y Baleares<sup>18</sup> en 1993, entre otros.

Para la AFP-SM se suele elegir un punto de corte que oscila entre 2 y 2,5 MoM. En general, se considera que en una población con una prevalencia intermedia de DTNs, la sensibilidad para la espina bífida abierta de un cut-off de 2 MoM es del 80% y la proporción de falsos positivos es del 4%, mientras que para 2,5 MoM tenemos una sensibilidad del 70% y un 2% de falsos positivos<sup>19</sup>.

Una investigación reciente, realizada en Australia<sup>20</sup>, que incluye 243 casos con DTNs ha servido para corroborar los índices de detección del estudio colaborativo británico<sup>15</sup>, luego, la sensibilidad de la AFP-SM para la acrania fue del 92% y para la espina bífida abierta del 76%.

La interpretación de los valores de AFP-SM se ve influida por diversos factores, que se detallan a continuación, y cuya corrección aumentará su sensibilidad.



### 6.2.3.1 Edad gestacional

El error en la datación de la gestación es la variable que con más frecuencia resta sensibilidad a la AFP-SM. La biometría ecográfica, por lo tanto, aumenta la precisión del cribado<sup>21</sup>, incluso si únicamente medimos el DBP (diámetro biparietal) y no utilizamos otros parámetros (longitud vértex-nalgas, longitud femoral)<sup>1</sup>. El DBP suele estar reducido en la espina bífida un promedio de dos semanas, lo cual subestimaría la edad gestacional, luego, a las gestaciones afectadas se les atribuiría una edad gestacional inferior, por lo tanto las concentraciones de AFP serían más altas que en las gestaciones normales, lo que aumentaría el índice de detección para estas anomalías<sup>22</sup>.

### 6.2.3.2 Peso materno

La concentración de AFP-SM es menor a mayor peso de la gestante y viceversa<sup>23</sup>. Ello se atribuye al reparto de una cantidad fija de esta proteína en distintas volúmenes. Hay fórmulas para calcular los MoM esperados para un peso dado, entonces la obtención del cociente entre los MoM observados y los esperados constituye un método útil para obtener valores de MoM independientes del peso materno<sup>1</sup>. Otro método de ajuste ponderal es la aplicación de una fórmula de corrección lineal por intervalos de peso de 50 lb (22,7 kg)<sup>24</sup>. Como aún no se ha establecido la mejor fórmula para el ajuste de la AFP-SM, la postura más razonable es el cálculo de fórmulas propias de corrección para cada programa de despistaje. Éstas se deben basar en datos de cada población diana y en la monitorización periódica del peso materno medio con el fin de modificarlas si este último varía<sup>25</sup>. En definitiva, el ajuste por peso materno es imperativo, puesto que aumenta la sensibilidad y la especificidad del cribado de los defectos abiertos del tubo neural<sup>26</sup>.

### 6.2.3.3 Raza

Las mujeres negras tienen niveles de AFP-SM un 10-15% superiores, en promedio, a los de las mujeres caucásicas<sup>27,28</sup>. Como la prevalencia de DTNs entre las gestantes negras es inferior que entre las caucásicas, es conveniente reducir los MoM obtenidos en las mujeres de raza negra en un 15%. Por otra parte, los datos con relación a las asiáticas son contradictorios, así, según Crandall y cols. no hay diferencias con respecto a las caucásicas<sup>27</sup>; y de acuerdo con O'Brien y cols. sus concentraciones son significativamente superiores<sup>29</sup>; en consecuencia, si un laboratorio recibe una alta proporción de muestras procedentes de mujeres de distintos grupos étnicos (caucásicas, negras, asiáticas o hispanas), lo mejor es el cálculo de MoM propios separadamente, con el fin de optimizar los índices de detección y reducir al máximo la proporción de falsos positivos<sup>30,31</sup>.

### **6.2.3.4 Diabetes mellitus insulino dependiente**

Hace varias décadas se documentaron en las gestantes diabéticas valores de AFP un 25% inferiores a las no diabéticas. En este contexto, era indispensable aumentar en dicho porcentaje los valores obtenidos de MoM, dado que estas pacientes tienen un riesgo superior de concebir un hijo con DTN<sup>1</sup>. Sin embargo, los valores de AFP-SM inferiores a los 0,8 MoM de las pacientes sanas aparecen únicamente en gestantes diabéticas con un pobre control metabólico (hemoglobina glicosilada superior al 9,6% al principio del embarazo)<sup>32</sup>. El progreso de la insulinización en este grupo de gestantes con la consiguiente mejoría del control glucémico ha evidenciado, en contraposición a los estudios más antiguos, la ausencia de diferencias en los MoM de AFP entre diabéticas y no diabéticas, lo cual hace innecesario el ajuste de los valores séricos en la actualidad<sup>33</sup>.

### **6.2.3.5 Hábito tabáquico**

Se han documentado niveles superiores de AFP-SM en las fumadoras, lo cual apunta a un incremento en la permeabilidad de la barrera placentaria inducida por el tabaquismo<sup>34</sup>. Como los aumentos de AFP-SM son dosis-dependientes<sup>35</sup>, el ajuste de esta magnitud analítica sólo es necesario en poblaciones con alta incidencia de tabaquismo<sup>36</sup>.

### **6.2.3.6 Gestación múltiple**

Los valores de AFP-SM son, aproximadamente, dos veces más altos en gestaciones gemelares, y en las triples son aún superiores<sup>37</sup>. Si usamos en gemelares el punto de corte convencional para gestaciones únicas de 2,5 MoM, la sensibilidad para la anencefalia será del 99% y para la espina bífida abierta del 89%, con una proporción de falsos positivos del 30%. En cambio, si el punto de corte es el doble, 5,0 MoM, las sensibilidades bajarán al 83% para la anencefalia y al 39% para la espina bífida abierta, aunque la proporción de falsos positivos descenderá al 3%<sup>38</sup>. Estos datos apoyan el uso de la ecografía de alta resolución en las gestaciones múltiples, con la finalidad de incrementar la detección sin aumentar tanto el porcentaje de falsos positivos.

### **6.2.3.7 Técnicas de reproducción asistida**

La consecución de un embarazo mediante fecundación in vitro (FIV) distorsiona los niveles de AFP, que son inferiores en este grupo con respecto al de gestaciones espontáneas<sup>39</sup>. En cambio, la embriorreducción post-FIV incrementa espectacularmente los valores de AFP-SM<sup>40</sup>. A la luz de estos hallazgos, la ecografía para el despistaje de los DTNs es la opción más aconsejable en estos casos.

## 6.2.4 El diagnóstico bioquímico de los defectos del tubo neural

Las concentraciones de AFP en el LCR superan en más de 100 veces los valores propios del LA, por consiguiente la pérdida de la misma a través de lesiones abiertas del tubo neural aumenta sus niveles en el fluido amniótico. El Estudio Colaborativo del Reino Unido sobre Alfafetoproteína<sup>41</sup> incluyó 123 fetos con espina bífida abierta y 12 804 gestaciones normales. El 97% de los líquidos amnióticos de las gestaciones con espina bífida abierta tenían niveles de AFP-LA superiores a los 3 MoM, pero no se pudo hallar un punto de corte que separara satisfactoriamente las gestaciones afectadas de las sanas.

El inicio del uso de la acetilcolinesterasa (AChE) obedeció a la necesidad de completar el estudio de aquellos casos con AFP en LA (AFP-LA) elevada, puesto que hace dos décadas era imposible confirmar algunas sospechas diagnósticas mediante técnicas de imagen. Recordamos que esta enzima destruye específicamente la acetilcolina, y se localiza en los tejidos muscular, neural y en los eritrocitos. Normalmente no se detecta en el LA, puesto que éste no contiene hematíes en suspensión. Entonces, la contaminación amniótica con sangre fetal, a causa de una amniocentesis traumática, es la causa más frecuente de niveles falsamente elevados de AChE en LA. Smith y cols. presentaron en 1979<sup>42</sup> una serie de 72 gestaciones con AFP-LA aumentada y cuantificaron la AChE, considerando que sus valores eran anormales si eran superiores o iguales a 4,5 U/L. Mediante este punto de corte identificaron los 16 DTNs incluidos en la muestra, pero dos de las 56 gestaciones restantes también alcanzaron valores anormales de AChE. El uso de un test cualitativo (electroforesis) para la detección de la AChE redujo la clasificación incorrecta de las gestaciones normales. La validación de la electroforesis proviene de los resultados de un estudio multicéntrico sobre la AChE<sup>43</sup> que halló las siguientes proporciones de resultados positivos: 99,6% (476/478) de anencefalias; 99,4% (333/335) de espinas bífidas; 75,0% (47/63) de onfaloceles; 50,0% (7/14) de otras malformaciones graves; 46,6% (34/73) de gestaciones sin malformaciones que concluyeron en aborto; y 6,4% (8/125) de gestaciones sanas con buenos resultados perinatales.

Aun con todo, los mejores resultados (equilibrio entre sensibilidad y falsos positivos) se obtienen con la combinación secuencial de la cuantificación de AFP y ulterior electroforesis de AChE en LA, sólo si los niveles de AFP-LA son iguales o superiores a 2 MoM. Según los resultados del estudio de Wald y cols.<sup>44</sup>, que incluyó 32 642 gestaciones únicas (428 con espina bífida abierta y 238 con acrania), el índice de detección para la espina bífida abierta si se sigue el mencionado protocolo secuencial fue del 96% y la proporción de falsos positivos del 0,14%, mientras que sólo hubo que realizar electroforesis de AChE al 5% de las participantes.

La electroforesis en gel de poliacrilamida para el estudio cualitativo de las isoenzimas de la colinesterasa es un método laborioso y puede generar resultados equívocos. Mediante esta técnica separativa, se evidencian dos isoenzimas distintas: la AChE o colinesterasa verdadera o específica (EC 3.1.1.7) y la pseudocolinesterasa (PChE) o colinesterasa inespecífica (EC 3.1.1.8). La primera produce una banda de

migración rápida y la segunda da una banda de migración lenta. La banda de AChE no sólo aparece en los DTNs sino en celosomías, higromas quísticos, polimalformados y muertes intrauterinas. Las densidades relativas de las bandas rápida y lenta (AChE/PChE) permiten distinguir con bastante precisión los DTNs (ratios altas o ambas bandas densas) de las celosomías (ratios bajas o banda de AChE débilmente positiva). Los puntos de corte para los cocientes de las densidades oscilan entre 0,13 y 0,3 según los distintos estudios consultados<sup>45-9</sup>. Si hay contaminación sanguínea fetal del LA es probable que aumenten los niveles de AFP-LA y aparezca un falso positivo de AChE. En el caso de contaminación con sangre materna, las concentraciones de AFP-LA no ascienden, pero la electroforesis de AChE puede darnos también un resultado positivo falso. En la rutina del laboratorio, se estudian mediante el test de Kleihauer aquellas muestras de LA macroscópicamente hemáticas, sólo si la AFP-LA y/o la AChE nos dan resultados anormales. Si la electroforesis para AChE fuera positiva, se puede repetir la electroforesis tras inhibición específica de la AChE sérica materna con BW284c51. En el caso de contaminación con sangre fetal asociada a AChE positiva, no tenemos otro modo de esclarecer la situación que repitiendo la amniocentesis o efectuando una ecografía de alta resolución.

El estudio de AChE en el tercer trimestre es menos efectivo que en el segundo, por lo tanto, se recomienda precaución en su interpretación, especialmente si la ecografía no muestra DTN o celosomía alguna. De hecho, se han documentado falsos positivos en casos de hidrocefalia aislada, polihidramnios y retraso de crecimiento intrauterino<sup>50</sup>.

En la tabla 6.2 se representan las combinaciones de resultados de AFP-LA y AChE con su interpretación consiguiente<sup>43-4,51-4</sup>.

Rasmussen Loft y cols.<sup>55</sup> publicaron en 1990 los resultados de la aplicación de un enzoinmunoensayo que utiliza un anticuerpo monoclonal (4F19) contra la isoforma cerebrospinal de la AChE. En principio, este método cuenta con las ventajas de la rapidez, lo cual le permite procesar muchas muestras el mismo día, de su interpretación inequívoca y de ofrecer un resultado cuantitativo. Se obtuvieron unos porcentajes de detección entre dos y cuatro puntos inferiores a la electroforesis, mientras que los falsos positivos fueron similares. Como se aplicó a líquidos amnióticos almacenados procedentes del mencionado estudio multicéntrico británico sobre la AChE<sup>43</sup>, los resultados obtenidos, peores que los esperados, se atribuyeron a un descenso de actividad de la AChE secundaria a la realización diferida del inmunoensayo. Por otra parte, parece que el uso de inmunoensayos específicos para la AChE y la PChE en una misma muestra pueden diferenciar las gestaciones complicadas por DTNs de las celosomías y de los falsos positivos de AFP-LA y AChE<sup>56</sup>. Estas técnicas, aunque inicialmente prometedoras, no han alcanzado, al menos hasta el momento presente, la expansión esperada.

**Tabla 6.2.- Interpretación de los resultados según los niveles de alfafetoproteína y acetilcolinesterasa en líquido amniótico.**

AFP	AChE	Interpretación
< 2 MoM	Negativa	Normalidad
	Positiva	Contaminación con sangre materna
≥ 2 MoM	Negativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Nefrosis congénita</li> <li>▪ Oligoamnios</li> </ul>
	Positiva	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Defectos del tubo neural</li> <li>- Celosomías</li> <li>- Gastrosquisis</li> <li>- Higroma quístico</li> <li>- Hidrops fetal</li> <li>- Teratoma sacrococcígeo</li> <li>- Polimalformados</li> <li>- Muerte intrauterina</li> <li>- Mal pronóstico perinatal en ausencia de malformaciones</li> <li>- Contaminación con sangre fetal</li> </ul>

AFP (alfafetoproteína), AChE (acetilcolinesterasa).

## 6.3 El cribado ecográfico

Nos centraremos fundamentalmente en el diagnóstico ecográfico de la espina bífida, dadas la sencillez y factibilidad del diagnóstico ecográfico de la acrania a partir de la 12 ó 13 semanas de amenorrea.

La sensibilidad de la ecografía del segundo trimestre<sup>20,57-68</sup>, como se verá en la tabla 6.3, es más variable de lo que sería deseable. Como era de esperar, los índices de detección han sido significativamente inferiores en los estudios multicéntricos y en las gestantes de bajo riesgo. Las investigaciones que incluyen un solo centro utilizan protocolos uniformes, hay pocos ecografistas y el sesgo de publicación puede estar presente, puesto que si los resultados que alcanzan son subóptimos, raramente éstos verán la luz en una publicación médica. Por otra parte, la selección de las gestantes de alto riesgo para DTNs se hace de acuerdo con los resultados del cribado con AFP-SM, los antecedentes familiares, la presencia de diabetes o el uso de anticomiciales. En estas pacientes, la ecografía diagnóstica se realiza con más detenimiento, los ecografistas son más experimentados y el equipo técnico es de mayor calidad.

En la tabla 6.3 no hemos incluido los resultados del estudio prospectivo Eurofetus<sup>69</sup>, dado que no especifica la proporción de espinas bífidas diagnosticadas antes de las 24 SG, sin embargo, la sensibilidad ecográfica a lo largo del embarazo para la espina bífida sin hidrocefalia es del 66,3% y del 94,6% para la que desarrolla hidrocefalia ( $\chi^2=23,1$ ;  $p<0,001$ ). Ello apunta a la importancia de la visualización del raquis junto con las estructuras craneales para el diagnóstico de la raquisquisis.

La utilización de los signos ecográficos indirectos, craneales y cerebelosos, ha facilitado enormemente la detección de la espina bífida. Entre los signos craneales contamos con la microcefalia, la ventriculomegalia y el cráneo “en limón” (hundimiento de frontales). Mientras que el signo “del plátano” (concavidad anterior de los

hemisferios cerebelosos con obliteración de la cisterna magna), la ausencia del cerebelo o su reducción de tamaño constituyen los signos cerebelosos. El artículo que describe originalmente los signos indirectos de la espina bífida abierta es de Nicolaidis y cols. y fue publicado en 1986<sup>70</sup>. Como se verá en la tabla 6.4, hemos procedido a la recopilación de los artículos más relevantes en lengua inglesa<sup>70-84</sup> para documentar el índice de detección de estos signos indirectos y posteriormente hemos separado los estudios en retrospectivos y prospectivos. Los primeros se basan en la revisión de imágenes ecográficas craneales procedentes de espinas bífidas diagnosticadas mediante signos directos, mientras que los prospectivos suelen incluir gestaciones de alto riesgo para DTNs. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que los signos “del limón” y “del plátano” suelen estar presentes únicamente en el segundo trimestre de la gestación.

**Tabla 6.3.- Sensibilidad de la ecografía del segundo trimestre en el diagnóstico de los defectos del tubo neural**

Estudio	Nº participantes	Riesgo DTN	Sensibilidad
<i>Robinson y cols. (1980)</i> <sup>57</sup> ♦	366	Alto	79% (15/19)
<i>Persson y cols. (1983)</i> <sup>58</sup> ♦	10 147	Población general	25% (2/8)
<i>Rosendahl y Kivenen (1989)</i> <sup>59</sup> ♦	9012	Población general	75% (3/4)
<i>Chitty y cols. (1991)</i> <sup>60</sup> ♦	432	Población general	100% (7/7)
<i>Constantine y McCormack (1991)</i> <sup>61</sup> ♦	4984	Población general	100% (5/5)
<i>Luck (1992)</i> <sup>62</sup> ♦	8523	Población general	100% (3/3)
<i>Shirley y cols. (1992)</i> <sup>63</sup> ♦	6366	Población general	100% (4/4)
<i>Hogge y cols. (1989)</i> <sup>64</sup> ♦	225	Alto	100% (10/10)
<i>RADIUS (1994)</i> <sup>65</sup> *	7327	Población general	60% (3/5)
<i>Chan y cols. (1995)</i> <sup>20</sup> *		Población general	75% (77/102)
<i>Levi y cols. (1995)</i> <sup>66</sup> *	15 654	Población general	33% (8/24)
<i>VanDorsten y cols. (1998)</i> <sup>67</sup> ♦	2031	Población general	100% (2/2)
		Alto	100% (3/3)
<i>Boyd y cols. (2000)</i> <sup>68</sup> *	670 766	Población general	72% (166/231)
Índices de detección combinados	<i>Población general</i>	71% (280/395)	$\chi^2=4,06$ ; p=0,04
	<i>Alto riesgo DTNs</i>	87% (28/32)	
	<i>Estudios unicéntricos</i>	83% (54/65)	$\chi^2=4,57$ ; p=0,03
	<i>Estudios multicéntricos</i>	70% (254/362)	
	<i>Todos los estudios</i>	72% (308/427)	

♦ Un centro incluido en el estudio.

\* Estudio multicéntrico.

Como se puede apreciar, los índices de detección son altos y superiores para los signos cerebelosos, mientras que la proporción de falsos positivos es baja y se atribuye siempre a los signos craneales, a excepción de la serie de Goldstein y cols.<sup>76</sup>. El estudio que incluye un mayor porcentaje de falsos positivos del signo “del limón” es el de Ball y cols.<sup>77</sup>, que obtiene unos resultados muy divergentes con relación al resto de los estudios representados. Si este último trabajo no se hubiera incluido, los falsos positivos hubieran sido inferiores al 1%.

**Tabla 6.4.- Estudios sobre cribado ecográfico de defectos del tubo neural mediante signos indirectos.**

Estudios	Índices de detección (%)		Falsos positivos (%)
	Signos craneales	Signos cerebelosos	
<b>Retrospectivos</b>			
Nicolaides y cols. (1986) <sup>70</sup>	100% (54/54)	95% (20/21)	0% (0/100)
Penso y cols. (1987) <sup>71</sup>	67% (16/24)	-	0% (0/12)
Furness y cols. (1987) <sup>72</sup>	100% (13/13)	-	-
Nyberg y cols. (1988) <sup>73*</sup>	55% (17/31)	-	0% (0/30)
Gabbe y cols. (1988) <sup>74</sup>	100% (6/6)	-	-
Benacerraf y cols. (1989) <sup>75</sup>	-	100% (23/23)	0% (0/38)
Goldstein y cols. (1989) <sup>76</sup>	70% (14/20)	100% (19/19)	3,3% (1/33)
Ball y cols. (1993) <sup>77</sup>	-	-	22% (5/23)
<i>Total retrospectivos</i>	81% (120/148)	98% (62/63)	2,5% (6/236)
<b>Prospectivos</b>			
Campbell y cols. (1987) <sup>78</sup>	100% (26/26)	96% (25/26)	1,2% (5/410)
Chambers y cols. (1988) <sup>79</sup>	75% (9/12)	-	0% (0/169)
Nyberg y cols. (1988) <sup>73*</sup>	79% (15/19)	-	1,3% (3/230)
Pilu y cols. (1988) <sup>80</sup>	-	100% (19/19)	0% (0/17)
Petrikovsky y cols. (1990) <sup>81</sup>	67% (10/15)	53% (8/15)	1,6% (5/313)
Van den Hof y cols. (1990) <sup>82</sup>	83% (108/130)	95% (124/130)	0,7% (9/1367)
Thiagarajah y cols. (1990) <sup>83</sup>	75% (18/24)	100% (22/22)	-
Blumenfeld y cols. (1993) <sup>84</sup>	-	100% (7/7)	-
<i>Total prospectivos</i>	82% (186/226)	94% (205/219)	0,9% (22/2506)

\* Se evaluaron retrospectivamente 31 y prospectivamente 19 fetos con espina bífida.

## 6.4 La disyuntiva entre los cribados bioquímico y ecográfico

Como ya hemos visto, la sensibilidad ecográfica para la espina bífida es mayor en las gestantes de alto riesgo. Huelga decir que el grupo más numeroso de estas pacientes pertenece al colectivo con AFP-SM elevada. En 1983 Persson y cols.<sup>58</sup> documentaron que los hallazgos positivos con ambos tipos de cribado no se solapaban, así, para diez casos de DTNs la AFP-SM detectó siete, la ecografía sólo cuatro, mientras que la combinación de ambas pruebas identificó a ocho. Una década más tarde un estudio australiano<sup>20</sup> confirmó estos hallazgos en una serie más extensa (tabla 6.5), además de constatar también la utilidad de la cuantificación de AFP-LA. Por otra parte, en áreas donde se carece de un programa de AFP-SM la sensibilidad diagnóstica para los DTNs es baja<sup>85</sup>. En resumen, la experiencia obtenida de los estudios más destacados apunta a que la mejor política para la población general es la combinación de las dos modalidades de despistaje. Sólo en la situación “ideal” de que el colectivo de gestantes de bajo riesgo fuera atendido por ecografistas muy experimentados, con poca presión asistencial y con buenos equipos se podría plantear el prescindir del cribado bioquímico<sup>86</sup>.

**Tabla 6.5.- Índices de detección de los distintos métodos diagnósticos de defectos del tubo neural en la población del Sur de Australia (1986-91).**

Modalidad diagnóstica	Acrania n=106	Espina bífida		Encefalocele		Total DTNs	
		Abiertos n=92	Total n=122	Abiertos n=6	Total n=15	Abiertos n=204	Total n=243
<b>AFP-SM</b>							
<i>Cribados</i>	48	58	77	4	9	110	134
<i>Detectados n (%)</i>	44 (92)	44 (76)	49 (64)	3 (75)	3 (33)	91 (83)	96 (72)
<b>Ecografía</b>							
<i>Cribados</i>	101	81	102	6	13	188	216
<i>Detectados n (%)</i>	101 (100)	71 (88)	77 (75)	3 (50)	7 (54)	175 (93)	185 (86)
<b>Amniocentesis</b>							
<i>Cribados</i>	9	27	33	1	1	37	43
<i>Detectados n (%)</i>	9 (100)	25 (93)	27 (82)	1 (100)	1 (100)	35 (95)	37 (86)
<b>Total</b>							
<i>Cribados</i>	102	85	110	6	14	193	226
<i>Detectados n (%)</i>	101 (99)	74 (87)	84 (76)	5 (83)	9 (64)	180 (93)	194 (86)

n (número de casos).

## 6.5 El diagnóstico del encefalocele

Los encefaloceles, si bien son menos frecuentes que la acrania o que la espina bífida (capítulo 7), presentan una serie de particularidades diagnósticas que merece la pena reseñar. La combinación de AFP-LA elevada y AChE detectó el 100% (5/5) de encefaloceles en la serie de Crandall y cols.<sup>51</sup>. Asimismo, su representación ecográfica no sólo consiste en signos directos sino también en indirectos, así, el signo “del limón” puede estar presente en la ecografía del segundo trimestre<sup>77</sup>. Aun con todo, no es una enfermedad de diagnóstico fácil, principalmente si es de pequeño tamaño o el defecto está cerrado. Como se ha podido objetivar en la tabla 6.5, los índices de detección más modestos corresponden al encefalocele (64%). En este caso, la ecografía aventaja al cribado, aunque las sensibilidades son bajas para ambas técnicas. El rendimiento escaso del despistaje con AFP-SM se puede atribuir al porcentaje mayoritario de defectos cerrados incluidos en este estudio (60% o 9/15). En resumen, es preceptiva la exploración cuidadosa del cráneo, tanto de su contorno como de su contenido, en las ecografías del segundo trimestre, y hay que ser consciente de las limitaciones que suponen los defectos aislados pequeños para su detección precoz.

## 6.6 Necesidad del estudio del líquido amniótico en los casos con alfafetoproteína elevada en suero materno

La mayor pericia diagnóstica de los ecografistas y el perfeccionamiento de los



equipos ultrasonográficos ha permitido identificar en la última década la causa de los valores aumentados de AFP-SM, pero es inevitable la duda sobre la omisión de un DTN en aquellos casos en que la ecografía no esclarece el origen del cribado bioquímico positivo, principalmente si las cifras de AFP-SM son muy elevadas. La necesidad de practicar una amniocentesis en estos casos ha sido motivo de debate como veremos.

A raíz del estudio multicéntrico sobre la AChE<sup>44</sup>, se pensó que la determinación secuencial de AFP-LA y AChE era la estrategia diagnóstica príncipes para detectar el máximo número posible de DTNs. La amniocentesis podía eludir las exploraciones ecográficas dificultosas en mujeres obesas y, además, nos ofrecía datos de laboratorio, siempre más objetivos que la interpretación iconográfica; entonces, la cuestión que quedaba por resolver era si los beneficios del diagnóstico bioquímico iban a compensar su alto coste y el riesgo de pérdida fetal que conllevan.

Los resultados de diversas investigaciones que se han ido publicando a lo largo de la última década han apoyado la omisión de la amniocentesis. De hecho, los ultrasonidos guiados por el cribado positivo en SM detectaban prácticamente todos los DTNs<sup>87-9</sup>. En la misma línea, Nadel y cols.<sup>90</sup> identificaron mediante ecografía los 51 defectos congénitos (DTNs y celosomías) de una serie de pacientes con niveles de AFP-SM elevados (sensibilidad del 100%, intervalo de confianza del 95% 94-100%). Estos autores calcularon, aun considerando el límite inferior del intervalo de confianza, que la probabilidad de un feto afectado por las anomalías mencionadas si la AFP-SM es superior o igual a 2 MoM alcanza el 1‰, cifra que no justifica el riesgo de pérdida fetal secundario a la amniocentesis. En contraposición, si el índice de detección de DTNs es bajo, la realización de amniocentesis puede ser una forma razonable de manejar el problema, así, el Programa Californiano de Cribado de AFP-SM<sup>91</sup> informa de una sensibilidad ecográfica del 92%, en cuyo caso los beneficios de la amniocentesis pueden superar los riesgos inherentes a la técnica.

Para finalizar, queremos mencionar el magnífico análisis de coste-beneficio realizado por Vintzileos y cols.<sup>92</sup>. Según este trabajo, la amniocentesis sólo estaría justificada en caso de dificultades técnicas de visualización ecográfica (obesidad mórbida) o en gestantes diabéticas con 4 ó más MoM de AFP-SM, puesto que el índice de detección ecográfico que se precisa en este último supuesto tendría que aproximarse al 100%. Adicionalmente, si la sensibilidad de los ultrasonidos dirigidos por la AFP-SM fuera de un 90%, la ecografía sería más eficiente que la amniocentesis, e iría acompañada de un menor número de pérdidas fetales pero del nacimiento de algunos fetos con espina bífida. Evidentemente, las conclusiones para cada área en particular dependerán de los índices de detección ecográficos, de la presencia de otros factores de riesgo (diabetes insulino dependiente, uso de anticomiciales) y de la proporción de falsos positivos que estemos dispuestos a asumir. Para delimitar una estrategia propia nos pueden ser útiles las tablas de Knight y cols.<sup>93</sup> que exponen las sensibilidades ecográficas mínimas que permiten alcanzar un balance óptimo de eficiencia en función de los niveles de AFP-SM.

En resumen, en gestantes con AFP-SM elevada y sin otros factores de riesgo adicionales para DTNs, no parece que la amniocentesis sea coste-efectiva, siempre que la sensibilidad de la ecografía se acerque al 90%, por lo tanto, para definir la política sanitaria más adecuada en nuestro medio es imperativo conocer el índice de detección de espinas bífidas que obtienen nuestros equipos de ecografistas.

## 6.7 Perspectivas de futuro

### 6.7.1 Diagnóstico de las anomalías del tubo neural en el primer trimestre

El reto del diagnóstico prenatal está en reducir al máximo la edad gestacional a la que se puede detectar una anomalía congénita. De los avances conseguidos en este terreno se derivará una disminución de las morbilidades física y psíquica para la madre en el caso de que decida interrumpir su gestación, sin embargo, quedan por dilucidar las repercusiones de una detección cada vez más temprana sobre la calidad del consejo genético (capítulos 7 y 8).

Con respecto a los DTNs, se ha conseguido adelantar el diagnóstico ecográfico al primer trimestre en el caso de la anencefalia<sup>94</sup> y más recientemente en el de la espina bífida<sup>95</sup>. En el trabajo de Blaas y cols.<sup>95</sup> se presentaron tres casos con raquisquisis de menos de diez SG cuyos diagnósticos, obviamente, se realizaron por vía transvaginal. Las pacientes estudiadas eran de alto riesgo y hubo que esperar a las 12-13 SG para interrumpir el embarazo, pues es preciso confirmar el diagnóstico y obtener un producto que sea de suficiente tamaño para poderlo estudiar anatomopatológicamente. La sospecha diagnóstica inicial se fundamentó en la presencia de signos directos, puesto que con equipos de suficiente resolución ya se visualiza el raquis a las siete semanas de amenorrea y si el defecto es grande, el diagnóstico se puede efectuar a partir de la octava semana. Lamentablemente, los signos indirectos se presentaron a partir de las 12 SG en sólo dos de los tres casos. Destacamos que la ecografía tridimensional no supuso ningún avance en estos supuestos. Como se puede deducir, estos diagnósticos tan precoces sólo se pueden acometer en centros de referencia y con pacientes de alto riesgo. Buisson y cols.<sup>96</sup> describen unos signos ecográficos sutiles en dos fetos que nos pueden ayudar en el diagnóstico de la espina bífida antes de las 14 SG. Estas imágenes son: el paralelismo de los pedúnculos cerebrales que es identificable en el corte del DBP; la alineación del metencéfalo y del mielencéfalo en un corte sagital; y la retracción de los huesos frontales, cuya imagen resultante se denomina cráneo “en bellota” (acorn-shaped head).

Con relación al cribado bioquímico precoz, se ha comprobado que la AFP-SM no es discriminativa entre las seis y las 14 SG<sup>97</sup>, por lo tanto, cualquier posibilidad de adelantar el despistaje mediante AFP-SM no es viable. Este inconveniente se hace especialmente patente en los novedosos programas de despistaje de aneuploidías del primer trimestre que, a diferencia de los del segundo, usan únicamente marcadores de cromosopatía, por lo que se ven obligados a prescindir de magnitudes bioquímicas que detecten las anomalías del tubo neural.

Otro recurso con el que contamos es la amniocentesis precoz a partir de las 11 semanas de amenorrea, pero los inconvenientes inherentes tanto a la técnica como a la determinación de AFP y AChE son numerosos. El estudio prospectivo multicéntrico CEMAT (Canadian early and mid-trimester amniotic fluid trial)<sup>98-9</sup> ha puesto de

manifiesto las deficiencias de esta técnica invasiva, puesto que si comparamos la amniocentesis entre las 11 y 12 SG cumplidas con la amniocentesis convencional (a partir de las 15 SG), las proporciones de pérdidas fetales, de pies equinovaros, de amniorrexis y de fallos de cultivo son significativamente más desfavorables para el grupo de la amniocentesis precoz. Por otra parte, la seguridad de la amniocentesis entre las 13 y las 14 semanas no ha sido establecida mediante estudios aleatorizados. Con relación al diagnóstico bioquímico en el LA, se han hallado valores discordantes de AFP en distintos trabajos<sup>100-1</sup> y una importante proporción de falsos positivos de AChE<sup>102-3</sup>, sin embargo una serie más reciente y numerosa de Crandall y Chua<sup>104</sup> avala la utilidad tanto de la AFP como de la AChE entre las 13 y las 15 SG. Vista la situación, la única expectativa posible se sitúa en la amniocentesis a inicios del segundo trimestre, aunque habrá que esperar la publicación de series más extensas y la confirmación de la seguridad de la amniocentesis en las mencionadas semanas de amenorrea.

## 6.7.2 La cirugía intrauterina y la resonancia nuclear magnética

Las experiencias sobre cirugía intrauterina del mielomeningocele<sup>105-6</sup> (capítulo 2) han facilitado la introducción de la resonancia nuclear magnética con el fin de obtener información más precisa sobre la ubicación de la lesión<sup>107</sup>. De hecho, el nivel de la lesión puede ser de ayuda a la hora de decidir la mejor opción terapéutica (aborto eugenésico, cirugías fetal o postnatal)<sup>108-9</sup>. La principal ventaja de la resonancia es la obtención de imágenes de gran calidad, incluso sin sedación fetal, aunque también es susceptible de dar resultados positivos falsos<sup>110</sup>. Las perspectivas para esta exploración diagnóstica son halagüeñas, puesto que es una técnica no invasiva y su uso ya se ha extendido al campo del Diagnóstico Prenatal para la valoración de otros problemas fetales como la agenesia del cuerpo calloso, las masas torácicas o los teratomas cervicales.

## 6.8 Bibliografía

1. Cuckle HS. Screening for neural tube defects. *Ciba Found Symp* 1994;181:253-66.
2. Bergstrand CG, Czar B. Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus. *Scand J Clin Lab Invest* 1956;8:174.
3. Deutsch HF. Chemistry and biology of alpha-fetoprotein. *Adv Cancer Res* 1991;56:253-312.
4. Harper ME, Dugaiczky A. Linkage of the evolutionarily-related serum albumin and alpha-fetoprotein genes within q11-22 of human chromosome 4. *Am J Hum Genet* 1983;35:565-72.
5. Song YH, Naumova AK, Liebhaber SA, Cooke NE. Physical and meiotic mapping of the region of human chromosome 4q11-q13 encompassing the vitamin D binding protein DBP/Gc-globulin and albumin multigene cluster. *Genome Res* 1999;9:581-7.
6. Law SW, Dugaiczky A. Homology between the primary structure of alpha-fetoprotein, deduced from a complete cDNA sequence, and serum albumin. *Nature* 1981;291(5812):201-5.
7. Jones EA, Clement-Jones M, James OF, Wilson DI. Differences between human and mouse alpha-fetoprotein expression during early development. *J Anat* 2001;198(Pt 5):555-9.
8. Speroff L, Glass RH, Kase NG. *Endocrinología ginecológica e infertilidad*. 1ª ed. Madrid: Waverly Hispánica, S.A.; 2000. p. 275-335.
9. Abelev GI. [25 years of the study of alpha-fetoprotein] [Artículo en ruso]. *Ontogenez* 1989;20:607-15.
10. Murgita RA. The immunosuppressive role of alpha-fetoprotein during pregnancy. *Scand J Immunol* 1976;5:1003-14.
11. Christiansen M, Hogdall CK, Hogdall EV. Alpha-fetoprotein in human fetal cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 2000;291:35-41.

12. Ishiguro T, Sakaguchi H, Sugitachi I. Developmental changes of amniotic fluid alpha-fetoprotein subfractions in early gestation. *Am J Reprod Immunol* 1983;3:61-4.
13. Brock DJH, Sutcliffe RG. Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. *Lancet* 1972;1:197.
14. Wald NJ, Brock DJH, Bonnar J. Prenatal diagnosis of spina bifida and anencephaly by maternal serum alpha-fetoprotein measurements. *Lancet* 1974;765.
15. Wald NJ, Cuckle H, Brock JH, Peto R, Polani PE, Woodford FP. Maternal serum-alpha-fetoprotein measurement in antenatal screening for anencephaly and spina bifida in early pregnancy. Report of U.K. collaborative study on alpha-fetoprotein in relation to neural-tube defects. *Lancet* 1977;25;1(8026):1323-32.
16. Granel R, González A, Grassa A, Molano J. Detección prenatal de los Defectos del Tubo Neural y otras malformaciones fetales. *Progresos en Diagnóstico Prenatal* 1991;3:30-6.
17. Cándenas M, Villa R, Fernández Collar R, Moína MJ, Pintado S, García Saez F, Álvarez FV. Maternal serum alpha-fetoprotein screening for neural tube defects. Report of a program with more than 30000 screened pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995;74:266-9.
18. Ferrer M, Olmos I, Serna M, Martín I. Experiencia de un programa de cribaje para el diagnóstico de los defectos del tubo neural y cromosopatías. *Progresos en Diagnóstico Prenatal* 1996;8:178-83.
19. Fan DF, Silverman JF. Maternal Serum Screening for Open Neural Tube Defect and Down Syndrome. *J Biomed Lab Sci* 1998;10:1-11.
20. Chan A, Robertson EF, Haan EA, Ranieri E, Keane RJ. The sensitivity of ultrasound and serum alpha-fetoprotein in population-based antenatal screening for neural tube defects. South Australia 1986-1991. *Br J Obstet Gynaecol* 1995;102:370-6.
21. Benn PA, Borgida A, Horne D, Briganti S, Collins R, Rodis JF. Down syndrome and neural tube defect screening: The value of using gestational age by ultrasonography. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:1056-61.
22. Wald N, Cuckle H, Boreham J, Stirrat G. Small biparietal diameter of fetuses with spina bifida: implications for antenatal diagnosis. *Br J Obstet Gynaecol* 1980;87:219-21.
23. Wald N, Cuckle H, Boreham J, Terzian E, Redman C. The effect of maternal weight on maternal serum alpha-fetoprotein levels. *Br J Obstet Gynaecol* 1981;88:1094-6.
24. Drugan A, Dvorin E, Johnson MP, Uhlmann WR, Evans MI. The inadequacy of the current correction for maternal weight in maternal serum alpha-fetoprotein interpretation. *Obstet Gynecol* 1989;74:698-701.
25. Neveux LM, Palomaki GE, Larrivee DA, Knight GJ, Haddow JE. Refinements in managing maternal weight adjustment for interpreting prenatal screening results. *Prenat Diagn* 1996;16:1115-9.
26. Johnson AM, Palomaki GE, Haddow JE. The effect of adjusting maternal serum alpha-fetoprotein levels for maternal weight in pregnancies with fetal open spina bifida. A United States collaborative study. *Am J Obstet Gynecol* 1990;163(1 Pt 1):9-11.
27. Crandall BF, Leberer TB, Schroth PC, Matsumoto M. Alpha-fetoprotein concentrations in maternal serum: relation to race and body weight. *Clin Chem* 1983;29:531-3.
28. Cuckle HS, Nanchahal K, Wald NJ. Maternal serum alpha-fetoprotein and ethnic origin. *Br J Obstet Gynaecol* 1987;94:1111-2.
29. O'Brien JE, Drugan A, Chervenak FA, Johnson MP, Isada NB, Hallak M, Evans MI. Maternal serum alpha-fetoprotein screening: the need to use race/ethnic specific medians in Asians. *Fetal Diagn Ther* 1993;8:367-70.
30. Byrne JL, Waller DK, Rose E, Elias S. Effect of Hispanic ethnicity on interpretation of maternal serum screening. *Fetal Diagn Ther* 1997;12:102-6.
31. Bryant-Greenwood PK, O'Brien JE, Huang X, Yaron Y, Ayoub M, Johnson MP, Evans MI. Maternal weight differences do not explain ethnic differences in biochemical screening. *Fetal Diagn Ther* 1998;13:46-8.
32. Martin AO, Dempsey LM, Minogue J, Liu K, Keller J, Tamura R, Freinkel N. Maternal serum alpha-fetoprotein levels in pregnancies complicated by diabetes: implications for screening programs. *Am J Obstet Gynecol* 1990;163(4 Pt 1):1209-16.
33. Sancken U, Bartels I. Biochemical screening for chromosomal disorders and neural tube defects (NTD): is adjustment of maternal alpha-fetoprotein (AFP) still appropriate in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)? *Prenat Diagn* 2001;21:383-6.
34. Thomsen SG, Isager-Sally L, Lange AP, Saubrey N, Schiolier V. Smoking habits and maternal serum alpha-fetoprotein levels during the second trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1983;90:716-7.
35. Bartels I, Hoppe-Sievert B, Bockel B, Herold S, Caesar J. Adjustment formulae for maternal serum alpha-fetoprotein, human chorionic gonadotropin, and unconjugated oestriol to maternal weight and smoking. *Prenat Diagn* 1993;13:123-30.
36. Spencer K. The influence of smoking on maternal serum AFP and free beta hCG levels and the impact on screening for Down syndrome. *Prenat Diagn* 1998;18:225-34.
37. Wald N, Barker S, Peto R, Brock DJ, Bonnar J. Maternal serum alpha-fetoprotein levels in multiple pregnancy. *Br Med J* 1975;1(5959):651-2.
38. Cuckle H, Wald N, Stevenson JD, May HM, Ferguson-Smith MA, Ward AM, y cols. Maternal serum alpha-fetoprotein screening for open neural tube defects in twin pregnancies. *Prenat Diagn* 1990;10:71-7.
39. Ribbert LS, Kornman LH, De Wolf BT, Simons AH, Jansen CA, Beekhuis JR, Mantingh A. Maternal serum screening for fetal Down syndrome in IVF pregnancies. *Prenat Diagn* 1996;16:35-8.
40. Rotmensch S, Celentano C, Shalev J, Vishne TH, Lipitz S, Ben-Rafael Z, Glezerman M. Midtrimester maternal serum screening after multifetal pregnancy reduction in pregnancies conceived by in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 1999;16:8-12.
41. Amniotic-fluid alpha-fetoprotein measurement in antenatal diagnosis of anencephaly and open spina bifida in early pregnancy. Second report of the U.K. Collaborative Study on Alpha-fetoprotein in Relation to Neural-tube Defects. *Lancet* 1979;2(8144):651-62.
42. Smith AD, Wald NJ, Cuckle HS, Stirrat GM, Bobrow M, Lagercrantz H. Amniotic-fluid acetylcholinesterase as a possible diagnostic test for neural-tube defects in early pregnancy. *Lancet* 1979;1(8118):685-8.
43. Amniotic fluid acetylcholinesterase electrophoresis as a secondary test in the diagnosis of anencephaly and open spina bifida in early pregnancy. Report of the Collaborative acetylcholinesterase Study. *Lancet* 1981;2(8242):321-4.

44. Wald N, Cuckle H, Nanchahal K. Amniotic fluid acetylcholinesterase measurement in the prenatal diagnosis of open neural tube defects. Second report of the Collaborative Acetylcholinesterase Study. *Prenat Diagn* 1989;9:813-29.
45. Goldfine C, Miller WA, Haddow JE. Amniotic fluid gel cholinesterase density ratios in fetal open defects of the neural tube and ventral wall. *Br J Obstet Gynaecol* 1983;90:238-40.
46. Peat D, Brock DJ. Quantitative estimation of the density ratios of cholinesterase bands in human amniotic fluids. *Clin Chim Acta* 1984;138:319-24.
47. Wald NJ, Barlow RD, Cuckle HS, Turnbull AC, Goldfine C, Haddow JE. Ratio of amniotic fluid acetylcholinesterase to pseudocholinesterase as an antenatal diagnostic test for exomphalos and gastroschisis. *Br J Obstet Gynaecol* 1984;91:882-4.
48. Kelly JC, Petrocik E, Wassman ER. Amniotic fluid acetylcholinesterase ratios in prenatal diagnosis of fetal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:703-5.
49. Dupont M, Vallet B, Brun A, Boulot P, Demaille J. Scanning gel densitometry of amniotic fluid acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase: quantification of 'faint positive' bands in fetal malformations. *Biol Neonate* 1995;67:244-7.
50. Suchy SF, Yeager MT. False-positive amniotic fluid acetylcholinesterase analysis in the third trimester. *Prenat Diagn* 1993;13:363-9.
51. Crandall BF, Kasha W, Matsumoto M. Prenatal diagnosis of neural tube defects: experiences with acetylcholinesterase gel electrophoresis. *Am J Med Genet* 1982;12:361-6.
52. Dupont M, Boulot P. Faint-positive amniotic fluid acetylcholinesterase in a case of sacrococcygeal teratoma. *Biol Neonate* 1993;63:397-8.
53. Sadovsky Y, Robbin ML, Crandall BF, Filly RA, Golbus MS. The association between 'faint-positive' amniotic fluid acetylcholinesterase and fetal malformations. *Prenat Diagn* 1993;13:1071-4.
54. Crandall BF, Chua C. Risks for fetal abnormalities after very and moderately elevated AF-AFPs. *Prenat Diagn* 1997;17:837-41.
55. Rasmussen Loft AG, Nanchahal K, Cuckle HS, Wald NJ, Hulten M, Leedham P, Norgaard-Pedersen B. Amniotic fluid acetylcholinesterase in the prenatal diagnosis of open neural tube defects and abdominal wall defects: a comparison of gel electrophoresis and a monoclonal antibody immunoassay. *Prenat Diagn* 1990;10:449-59.
56. Loft AG, Mortensen V, Hangaard J, Norgaard-Pedersen B. Ratio of immunochemically determined amniotic fluid acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase in the differential diagnosis of fetal abnormalities. *Br J Obstet Gynaecol* 1991;98:52-6.
57. Robinson HP, Hood VD, Adam AH, Gibson AA, Ferguson-Smith MA. Diagnostic ultrasound: early detection of fetal neural tube defects. *Obstet Gynecol* 1980;56:705-10.
58. Persson PH, Kullander S, Gennser G, Grenner L, Laurell CB. Screening for fetal malformations using ultrasound and measurements of alpha-fetoprotein in maternal serum. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;286(6367):747-9.
59. Rosendahl H, Kivenen S. Antenatal detection of congenital malformations by routine ultrasonography. *Obstet Gynecol* 1989;73:947-51.
60. Chitty LS, Hunt GH, Moore J, Lobb MO. Effectiveness of routine ultrasonography in detecting fetal structural abnormalities in a low risk population. *BMJ* 1991;303(6811):1165-9.
61. Constantine G, McCormack J. Comparative audit of booking and mid-trimester ultrasound scans in the prenatal diagnosis of congenital anomalies. *Prenat Diagn* 1991;11:905-14.
62. Luck CA. Value of routine ultrasound scanning at 19 weeks: a four year study of 8849 deliveries. *BMJ* 1992 Jun 6;304(6840):1474-8.
63. Shirley IM, Bottomley F, Robinson VP. Routine radiographer screening for fetal abnormalities by ultrasound in an unselected low risk population. *Br J Radiol* 1992;65(775):564-9.
64. Hogge WA, Thiagarajah S, Ferguson JE 2nd, Schnatterly PT, Harbert GM Jr. The role of ultrasonography and amniocentesis in the evaluation of pregnancies at risk for neural tube defects. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:520-3; discussion 523-4.
65. Crane JP, LeFevre M, Winborn RC, Evans JK, Ewigman BG, Bain RP, y cols. A randomized trial of prenatal ultrasonographic screening: Impact on the detection, management, and outcome of anomalous fetus. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:392-9.
66. Levi S, Schaaps JP, De Havay P, Coulon R, Defoort P. End-result of routine ultrasound screening for congenital anomalies: The Belgian Multicentric Study 1984-92. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1995;5:366-71.
67. VanDorsten JP, Hulsey TC, Newman RB, Menard MK. Fetal anomaly detection by second-trimester ultrasonography in a tertiary center. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:742-9.
68. Boyd PA, Wellesley DG, De Walle HE, Tenconi R, García-Miñaur S, Zandwijken GR, y cols. Evaluation of the prenatal diagnosis of neural tube defects by fetal ultrasonographic examination in different centres across Europe. *J Med Screen* 2000;7:169-74.
69. Grandjean H, Larroque D, Levi S. The performance of routine ultrasonographic screening of pregnancies in the Euro-fetus Study. *Am J Obstet Gynecol* 1999;446-54.
70. Nicolaidis KH, Campbell S, Gabbe SG, Guidetti R. Ultrasound screening for spina bifida: cranial and cerebellar signs. *Lancet* 1986;2(8498):72-4.
71. Penso C, Redline RW, Benacerraf BR. A sonographic sign which predicts which fetuses with hydrocephalus have an associated neural tube defect. *J Ultrasound Med* 1987;6:307-11.
72. Furness ME, Barbary JE, Verco PW. Fetal head shape in spina bifida in the second trimester. *J Clin Ultrasound* 1987;15:451-3.
73. Nyberg DA, Mack LA, Hirsch J, Mahony BS. Abnormalities of fetal cranial contour in sonographic detection of spina bifida: evaluation of the "lemon" sign. *Radiology* 1988;167:387-92.
74. Gabbe SG, Mintz MC, Mennuti MT, McDonnell AE. Detection of open spina bifida by the lemon sign: pathologic correlation. *J Clin Ultrasound* 1988;16:399-402.
75. Benacerraf BR, Stryker J, Frigoletto FD Jr. Abnormal US appearance of the cerebellum (banana sign): indirect sign of spina bifida. *Radiology* 1989;171:151-3.
76. Goldstein RB, Podrasky AE, Filly RA, Callen PW. Effacement of the fetal cisterna magna in association with myelomeningocele. *Radiology* 1989;172:409-13.

77. Ball RH, Filly RA, Goldstein RB, Callen PW. The lemon sign: not a specific indicator of meningomyelocele. *J Ultrasound Med.* 1993;12:131-4.
78. Campbell J, Gilbert WM, Nicolaidis KH, Campbell S. Ultrasound screening for spina bifida: cranial and cerebellar signs in a high-risk population. *Obstet Gynecol* 1987;70:247-50.
79. Chambers SE, Muir BB, Bell JE. "Bullet"-shaped head in fetuses with spina bifida: a pointer to the spinal lesion. *J Clin Ultrasound* 1988;16:25-8.
80. Pilu G, Romero R, Reece EA, Goldstein I, Hobbins JC, Bovicelli L. Subnormal cerebellum in fetuses with spina bifida. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158:1052-6.
81. Petrikovsky BM. 'Fruit' signs and neural tube defects. *Prenat Diagn* 1990;10:134.
82. Van den Hof MC, Nicolaidis KH, Campbell J, Campbell S. Evaluation of the lemon and banana signs in one hundred thirty fetuses with open spina bifida. *Am J Obstet Gynecol* 1990;162:322-7.
83. Thiagarajah S, Henke J, Hogge WA, Abbitt PL, Breeden N, Ferguson JE. Early diagnosis of spina bifida: the value of cranial ultrasound markers. *Obstet Gynecol* 1990;76:54-7.
84. Blumenfeld Z, Siegler E, Bronshtein M. The early diagnosis of neural tube defects. *Prenat Diagn* 1993;13:863-71.
85. Alembik Y, Dott B, Roth MP, Stoll C. Prevalence of neural tube defects in northeastern France, 1979-1992 impact of prenatal diagnosis. *Ann Genet* 1995;38:49-53.
86. DeVore GR. The Routine Antenatal Diagnostic Imaging with Ultrasound Study: another perspective. *Obstet Gynecol* 1994;84:622-6.
87. Katz VL, Seeds JW, Albright SG, Lingley LH, Lincoln-Boyea B. Role of ultrasound and informed consent in the evaluation of elevated maternal serum alpha-fetoprotein. *Am J Perinatol* 1991;8:73-6.
88. Morrow RJ, McNay MB, Whittle MJ. Ultrasound detection of neural tube defects in patients with elevated maternal serum alpha-fetoprotein. *Obstet Gynecol* 1991;78:1055-7.
89. Torreguitart M, Sánchez I, Vila I, Cabrero D, Bach C, Sabriá J. AFP superior a 2,5 MoM en el screening bioquímico del segundo trimestre: amniocentesis o estudio ecográfico. Nuestra experiencia. *Prog Diag Prenat* 2000;12:491-534.
90. Nadel AS, Green JK, Holmes LB, Frigoletto FD Jr, Benacerraf BR. Absence of need for amniocentesis in patients with elevated levels of maternal serum alpha-fetoprotein and normal ultrasonographic examinations. *N Engl J Med* 1990;323:557-61.
91. Platt LD, Feuchtbaum L, Filly R, Lustig L, Simon M, Cunningham GC. The California Maternal Serum alpha-Fetoprotein Screening Program: the role of ultrasonography in the detection of spina bifida. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:1328-9.
92. Vintzileos AM, Ananth CV, Fisher AJ, Smulian JC, Day-Salvatore D, Beazoglou T, Knuppel RA. Cost-benefit analysis of targeted ultrasonography for prenatal detection of spina bifida in patients with an elevated concentration of second-trimester maternal serum  $\alpha$ -fetoprotein. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:1227-33.
93. Knight GJ, Palomaki GE. Maternal serum alpha-fetoprotein and the detection of open neural tube defects. En: Elias S, Simpson JL, editores. *Maternal serum screening for fetal genetic disorders.* Nueva York: Churchill Livingstone; 1993. p. 41-58.
94. Rottem S, Bronshtein M, Thaler I, Brandes JM. First trimester transvaginal sonographic diagnosis of fetal anomalies. *Lancet* 1989;1:444-5.
95. Blaas H-G K, Eik-Nes, Isaksen CV. The detection of spina bifida before 10 gestational weeks using two- and three-dimensional ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000;16:25-9.
96. Buisson O, De Keersmaecker B, Senat MV, Bernard JP, Moscoso G, Ville Y. Sonographic diagnosis of spina bifida at 12 weeks: heading towards indirect signs. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002;19:290-2.
97. Wald NJ, Hackshaw A, Stone R, Densem J. Serum alpha-fetoprotein and neural tube defects in the first trimester of pregnancy. MRC Vitamin Study Research Group. *Prenat Diagn* 1993;13:1047-50.
98. Randomised trial to assess safety and fetal outcome of early and midtrimester amniocentesis. The Canadian Early and Mid-trimester Amniocentesis Trial (CEMAT) Group. *Lancet* 1998;351(9098):242-7.
99. Cytogenetic aspects of the Canadian early and mid-trimester amniotic fluid trial (CEMAT). Winsor EJ, Tomkins DJ, Kalousek D, Farrell S, Wyatt P, Fan YS, y cols. *Prenat Diagn* 1999;19:620-7.
100. Crandall BF, Hanson FW, Tennant F, Perdue ST. Alpha-fetoprotein levels in amniotic fluid between 11 and 15 weeks. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160(5 Pt 1):1204-6.
101. Nwebube NI, Lockitch G, Halstead C, Johnson J, Wilson RD. Alpha-fetoprotein values in amniotic fluid obtained during early amniocentesis (11-13 weeks). *Fetal Diagn Ther* 2002;17:25-8.
102. Drugan A, Syner FN, Greb A, Evans MI. Amniotic fluid alpha-fetoprotein and acetylcholinesterase in early genetic amniocentesis. *Obstet Gynecol* 1988;72:35-8.
103. Burton BK, Nelson LH, Pettenati MJ. False-positive acetylcholinesterase with early amniocentesis. *Obstet Gynecol* 1989;74:607-10.
104. Crandall BF, Chua C. Detecting neural tube defects by amniocentesis between 11 and 15 weeks' gestation. *Prenat Diagn* 1995;15:339-43.
105. Adzick NS, Sutton LN, Crombleholme TM, Flake AW. Successful fetal surgery for spina bifida. *Lancet* 1998;352(9141):1675-6.
106. Bruner JP, Tulipan N, Paschall RL, Boehm FH, Walsh WF, Silva SR, y cols. Fetal surgery for myelomeningocele and the incidence of shunt-dependent hydrocephalus. *JAMA* 1999;282:1819-25.
107. Mangels KJ, Tulipan N, Tsao LY, Alarcon J, Bruner JP. Fetal MRI in the evaluation of intrauterine myelomeningocele. *Pediatr Neurosurg* 2000;32:124-31.
108. Biggio JR Jr, Owen J, Wenstrom KD, Oakes WJ. Can prenatal ultrasound findings predict ambulatory status in fetuses with open spina bifida? *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:1016-20.
109. Rintoul NE, Sutton LN, Hubbard AM, Cohen B, Melchioni J, Pasquariello PS, Adzick NS. A new look at myelomeningoceles: functional level, vertebral level, shunting, and the implications for fetal intervention. *Pediatrics* 2002;109:409-13.
110. Leung EC, Sgouros S, Williams S, Johnson K. Spinal lipoma misinterpreted as a meningomyelocele on antenatal MRI scan in a baby girl. *Childs Nerv Syst* 2002;18(6-7):361-3.

# 7 Epidemiología de las anomalías del tubo neural

## 7.1 Los registros de defectos congénitos como fuentes de datos epidemiológicos

Jeniceck y Cléroux definen la epidemiología como ciencia del razonamiento objetivo en la medicina y otras ciencias de la salud, aplicado a la descripción de los fenómenos de salud, a la explicación de su etiología y a la búsqueda de los métodos de intervención más eficaces<sup>1</sup>. Por consiguiente, la epidemiología debe constituirse en nuestro aliado contra los defectos del tubo neural (DTNs), primero para documentar las cifras de frecuencia de los mismos y los factores que la modulan (epidemiología descriptiva), y después para dilucidar la etiología de estas anomalías (epidemiología analítica), lo cual contribuirá a la creación y a la aplicación de los medios de intervención más efectivos y eficientes que posibiliten, si no su erradicación, una importantísima reducción de su frecuencia.

Los registros de defectos congénitos surgen al albur de la gran morbimortalidad infantil causada por las anomalías congénitas y por la importancia de las secuelas que dejan en los afectados. El punto de partida fue la epidemia de defectos congénitos causada por la talidomida<sup>2,3</sup> que desencadenó su aparición y ulterior expansión. Los objetivos de los registros, según Cordero, son: la vigilancia epidemiológica, la realización de estudios analíticos y la gestión de los recursos comunitarios<sup>4</sup>.

La *vigilancia epidemiológica* es el proceso de “seguimiento” para advertir la aparición de una anomalía congénita en unas circunstancias temporoespaciales determinadas<sup>4</sup>. La vigilancia de las frecuencias de malformaciones específicas en una misma zona a lo largo del tiempo permite el estudio de las tendencias seculares y la detección de acúmulos de las mismas o “clusters”; mientras que la comparación de frecuencias entre distintas áreas geográficas permite establecer un gradiente de prevalencias que nos ayuda a priorizar la aplicación de las medidas de intervención y a formular hipótesis causales. La exhaustividad en la recolección de información tras la detección de un caso de malformación también nos ayudará a esclarecer la causa de estas enfermedades. Entonces, la vigilancia epidemiológica cumple con los fines de la epidemiología descriptiva, esto es, identificación de la proporción de individuos afectados de una enfermedad, determinación de la proporción de aquéllos que están expuestos a los factores de interés y génesis de hipótesis que conduzcan a la realización de estudios analíticos<sup>5</sup>.

La información de los registros de defectos congénitos se utiliza frecuentemente para la planificación de *estudios analíticos* que validen o descarten las hipótesis causales que se puedan formular. En este sentido, los registros pretenden la consecución de los objetivos de la epidemiología analítica o explicación del fenómeno de salud<sup>5</sup>.

Los gestores sanitarios tienen en los registros un instrumento objetivo con el

que *predecir los recursos materiales y humanos* que tendrán que desviar hacia un problema de salud concreto en términos de personal sanitario especializado, medios técnicos, centros educativos, ayudas familiares, etc. Una ventaja incontestable que nos brindan los registros es la posibilidad de auditar la eficacia y la eficiencia de las actividades de prevención primaria y secundaria, en las que estamos activamente implicados los especialistas en Obstetricia y Ginecología.

Martínez Navarro y Tello Anchuela nos proponen un concepto más amplio de la vigilancia epidemiológica, es decir, la vigilancia constituye un sistema dinámico que se utiliza para observar de cerca, y de forma permanente, todos los aspectos de conducta de la enfermedad y todos los factores que condicionan el fenómeno salud-enfermedad, mediante la identificación de hechos, la reconciliación, análisis e interpretación sistemática de los datos y la distribución de los resultados y recomendaciones necesarias<sup>6</sup>. De esta definición se derivan las siguientes actividades propias de los registros malformativos: identificación de las fuentes de datos y recogida sistemática de los que se consideren pertinentes; análisis, evaluación e interpretación de los datos; formulación de las recomendaciones sobre las medidas adecuadas que hay que tomar; distribución de la información y de las recomendaciones a los estamentos adecuados<sup>7</sup>. Así, esta definición aúna todas las misiones fundamentales de los registros, y viene a englobar los tres objetivos enunciados por Cordero.

La formulación de hipótesis requiere un número suficiente de casos con anomalías específicas y el conocimiento de sus circunstancias; de ahí que la tendencia natural de los registros es hacia la agrupación. Por lo tanto, los fines generales de los registros colectivos son el intercambio de información relativa a la prevalencia de malformaciones, la detección precoz de exposiciones a teratógenos, y la instauración de un sistema de ayuda mutua para la investigación sobre la etiología, prevención y manejo de estas enfermedades.

Los ICBDMs (International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems) constituyeron la primera agrupación internacional de registros e iniciaron su singladura en 1974 y actualmente recogen información de 35 registros distribuidos en 36 países<sup>8</sup>. Su planteamiento consiste en aglutinar registros nacionales que se utilizan como ejemplos de lo que ocurre en cada país. El EUROCAT (European Registration of Congenital Anomalies and Twins) se constituyó en 1979 y reúne a 36 registros dispersos en 17 países. Su planteamiento es reunir registros locales europeos de base poblacional<sup>9</sup>. Ambas organizaciones, si bien tienen objetivos comunes, utilizan metodologías distintas.

En España contamos con cuatro registros de base poblacional y uno de base hospitalaria. Los primeros (Asturias, Barcelona, País Vasco y Comarca del Vallés) colaboran con el EUROCAT, mientras que el de base hospitalaria, el ECEMC (Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas), es de ámbito supraautonómico y está integrado en los ICBDMs (International Clearinghouse Birth Defects Monitoring Systems), aunque también colabora con el EUROCAT como miembro asociado<sup>10</sup>. El ECEMC fue el registro pionero de entre los españoles, puesto que su actividad se inició en 1976, mientras que el resto inició su singladura entre 1990 y 1991<sup>11</sup>. Al ser el ECEMC de base hospitalaria, monitoriza los nacimientos acontecidos en 75 hospitales dispersos por todo el territorio nacional y la proporción de los mismos se halla en torno al 26% en los últimos años<sup>7</sup>. Desde la despenalización del



aborto en determinados supuestos en 1985, el ECEMC ha dejado de incluir las anomalías que han sido objeto de interrupción voluntaria de embarazo (IVE) por malformación, en consecuencia, este registro no puede documentar en toda su magnitud el impacto del diagnóstico prenatal sobre las cifras de frecuencia. Adicionalmente, los hospitales colaboradores con este programa son heterogéneos con respecto a la complejidad de la asistencia perinatal que prestan, entonces la inclusión de hospitales de referencia y de otros que remiten los casos de malformaciones a los primeros introduce una serie de factores de distorsión de difícil control. La recogida de las IVEs por parte de los registros de base poblacional, tampoco es la solución ideal, puesto que supone sobrevalorar la frecuencia real de defectos congénitos, principalmente la de aquéllos de elevada letalidad antes de alcanzar las semanas de gestación mínimas requeridas para la entrada en los registros (p.ej. trisomías autosómicas)<sup>12</sup>. Otro problema surgido recientemente a raíz de la detección cada vez más precoz de las malformaciones es la ausencia de un diagnóstico exhaustivo en el feto abortado que se atribuye a falta de concienciación de los profesionales médicos, o a las escasas dimensiones del producto; esta circunstancia puede llegar a dificultar gravemente la identificación de factores causales, con la consiguiente disminución de las posibilidades de prevención primaria<sup>13</sup>. Los rasgos metodológicos más destacados de cada uno de los registros españoles se sintetizan en la tabla 7.1.

## **7.2 Prevalencia de los defectos del tubo neural y factores moduladores**

### **7.2.1 La comparación de las frecuencias entre registros**

Como hemos mencionado previamente, una aplicación tentadora es la comparación entre los datos recogidos por los registros malformativos. Lamentablemente, esta posibilidad no está exenta de inconvenientes que están en función de diferencias en: la definición de las anomalías, en el periodo de detección, en los métodos de diagnóstico prenatal y postnatal disponibles, en la realización, el control y el registro de las IVEs eugenésicas, en la distribución de variables relacionadas

**Tabla 7.1.- Diseño y metodología actuales de los registros de defectos congénitos de España (modificado de J. Salvador y cols.<sup>11</sup>).**

<i>Características</i>		<i>RACAV</i>	<i>RDCV</i>	<i>RDCA</i>	<i>REDCB</i>	<i>ECEMC</i>
<i>Área geográfica controlada</i>		Comunidad Autónoma del País Vasco	Comarca del Vallés (Barcelona)	Principado de Asturias	Ciudad de Barcelona	75 hospitales distribuidos por todas las Comunidades Autónomas del Estado Español
<i>Sujetos del estudio</i>	<i>Neonatos</i>	RNV, RNM (≥500 g y/o ≥24 SG)	RNV, RNM (≥500 g y/o ≥22 SG)	RNV, RNM (≥500 g)	RNV, RNM (≥500 g y/o ≥23 SG)	RNV, RNM (≥500 g y/o ≥24 SG)
	<i>IVEs</i>	Hospitalarias (7 centros)	Hospitalarias (2 centros)	Hospitalarias (7 centros)	Hospitalarias (5 centros)	Parte de las efectuadas en los hospitales colaboradores
<i>% neonatos controlados por el registro</i>		96%	87%	>95%	>95%	>25%
<i>% IVEs hospitalarias controladas por el registro</i>		100%	100%	100%	100%	¿?
<i>Periodo de detección de casos</i>		Desde etapa prenatal hasta 1 año de vida	Desde etapa prenatal hasta 6 meses de vida	Desde etapa prenatal hasta 1 semana de vida	Desde etapa prenatal hasta 2-3 días de vida	Desde nacimiento hasta 3 días de vida
<i>Búsqueda activa por el personal del registro</i>		Sí	Sí	Sólo en RNM	Sí	Sí
<i>Denominador (consensuado)</i>		RNV + RNM + IVEs por defectos congénitos*				RNV+RNM contabilizados en los hospitales participantes

RACAV (Registro de Anomalías Congénitas de la Comunidad Autónoma Vasca), RDCV (Registro de Defectos Congénitos del Vallés), RDCA (Registro de Defectos Congénitos de Asturias), REDCB (Registro de Defectos Congénitos de Barcelona), IVEs (interrupciones voluntarias de embarazo), RNV (neonatos vivos), RNM (neonatos muertos), SG (semanas de gestación).

\* El cómputo del total de neonatos es proporcionado por el Instituto Vasco de Estadística (Eustat), Instituto de Estadística de Cataluña (Idescat) para El Vallés, la Sociedad Asturiana de Estudios Informáticos (SADEI) para Asturias y por el Registro Civil para Barcelona. Las fuentes de las IVEs son los registros de los Departamentos de Sanidad correspondientes, y en el caso del RDCV son los datos hospitalarios.

con la aparición de una anomalía congénita, y en la fluctuación aleatoria (causada generalmente por la comparación de tasas provenientes de periodos de observación insuficientes)<sup>11</sup>. Además, el impacto de las variables antedichas puede ser distinto para cada anomalía<sup>14</sup>. Hobbs y cols. estudiaron la metodología de los sistemas de vigilancia de base estatal estadounidenses, y concluyeron que pequeñas divergencias interestatales de las prevalencias tenían más posibilidades de ser reales que las divergencias extremas, probablemente secundarias a diferencias metodológicas<sup>14</sup>. Dada esta situación, es imperativo que los registros estandaricen sus metodologías para hacer sus resultados lo más comparables posible y, tener en cuenta que lo correcto es comparar las proporciones globales de defectos específicos considerando el cuadro clínico al que pertenecen<sup>11</sup>. Mientras tanto, el parangonar datos de múltiples registros con referencia a una selección de anomalías tiene una finalidad meramente orientativa.

## 7.2.2 La medida de las frecuencias de las anomalías congénitas

Salvo que se mencione lo contrario, utilizaremos datos de los registros de base poblacional del EUROCAT, entonces es conveniente conocer los rasgos más destacados de su metodología<sup>15</sup> que, obviamente, comparten los registros de base poblacional españoles. Los datos sobre los fetos con defectos congénitos son objeto de una búsqueda activa y su origen es múltiple: certificados de defunción, historias clínicas, servicios hospitalarios que diagnostican y/o tratan a estos pacientes (Radiología, Genética, Anatomía Patológica, Bioquímica, Pediatría, Obstetricia), etc. En la actualidad sólo se incluyen en los distintos cálculos a los fetos muertos a partir de las 20 semanas y no antes. En cuanto a las IVEs se computan únicamente las eugenésicas y no las realizadas bajo otros supuestos, independientemente de que el feto expulsado en estas últimas esté malformado o no. Esto implica que en áreas con amplia implantación del diagnóstico prenatal se contabilizarán anomalías objeto de IVEs que pasarán desapercibidas en lugares con menor implantación del mismo o donde la IVE sea ilegal, ya que algunos de estos fetos fallecerán espontáneamente antes de llegar a las 20 semanas de gestación. Otro problema es el cómputo total de nacidos aportado por los institutos de estadística correspondientes a cada área geográfica, ya que no todos incluyen los mortinatos a partir de la misma edad gestacional. La inclusión de las IVEs en los denominadores, tal y como hacen los registros españoles de base poblacional, tampoco es una práctica común dentro del EUROCAT. Sin embargo, estos dos últimos factores mencionados introducen unas diferencias mínimas en las distintas proporciones calculadas.

La frecuencia de los defectos congénitos se expresa en términos de prevalencia, que es la proporción de niños/fetos nacidos/abortados con alguna malformación. Hablar de incidencia no tiene razón de ser, ya que ésta se refiere a la ocurrencia de malformaciones entre la población de embriones susceptibles. Como muchos defectos congénitos conducen a la muerte del concebido antes de ser diagnosticados, será imposible conocer la incidencia real de los mismos. Por consiguiente, los niños/fetos malformados que se incluyen en los registros representan sólo a aquellos individuos que sobrevivieron con sus anomalías el tiempo suficiente para ser diagnosticados<sup>16</sup>.

Algunos de los indicadores que maneja el EUROCAT<sup>15</sup> son la prevalencia total y la prevalencia al nacimiento (tabla 7.2).

La diferencia entre ambos cocientes (prevalencia total menos prevalencia al nacimiento) es la contribución de los abortos inducidos o IVEs a la prevalencia total, esto es, la repercusión de las IVEs eugenésicas sobre la prevalencia al nacimiento.

**Tabla 7.2.- Cálculo de las prevalencias total y al nacimiento de los defectos congénitos.**

$$\begin{aligned}
 \text{Prevalencia total} &= \frac{\text{RNVa} + \text{RNMa} + \text{IVEa}}{\text{RNV} + \text{RNM}} \\
 \text{Prevalencia al nacimiento} &= \frac{\text{RNVa} + \text{RNMa}}{\text{RNV} + \text{RNM}}
 \end{aligned}$$

RNVa (nacido vivo afectado), RNMa (nacido muerto afectado), IVEa (aborto inducido afectado), RNV (total de nacidos vivos), RNM (total de nacidos muertos).

Queremos subrayar que la prevalencia total y la prevalencia al nacimiento son proporciones y no tasas, puesto que cuantifican la proporción de una población (neonatos totales con/sin IVEs eugenésicas) que adquiere una enfermedad (neonatos con una anomalía congénita específica con/sin abortos inducidos por la misma causa) en un periodo determinado de tiempo (múltiplos de un año). En este sentido, estas proporciones representan el riesgo o probabilidad de padecer/nacer con una anomalía congénita en el periodo de tiempo considerado.

### **7.2.3 Variaciones temporoespaciales en la prevalencia de los defectos del tubo neural**

La tabla 7.3 detalla las prevalencias totales de los DTNs, considerados globalmente, en los registros adscritos al EUROCAT<sup>17</sup>. Como los “Annual Reports” de los ICBDMs suelen incluir prevalencias al nacimiento y no totales, hemos optado por incluir en la tabla antedicha sólo datos del EUROCAT y los del ECEMC por ser un registro español. Pensamos que la inclusión de las prevalencias totales nos dará una idea más aproximada de la presencia de la enfermedad entre las poblaciones monitorizadas por los diferentes registros, puesto que los DTNs son anomalías con menor letalidad que otras entre el momento de su detección prenatal y al nacimiento<sup>12,18</sup>. Los intervalos de confianza de las prevalencias totales se han calculado según la distribución de Poisson. El fundamento de esta distribución se explica a partir de los términos “éxito” y “fracaso”, muy utilizados en probabilística por su similitud con los juegos de azar, por consiguiente, estas palabras han de entenderse en un sentido estrictamente estadístico, evitando cualesquiera otras interpretaciones. Entonces, las analogías que establecemos en las líneas siguientes tienen un fin puramente didáctico. La formación de un nuevo ser, desde los puntos de vista reproductivo y dismórfico, es un suceso para el que existen dos resultados mutuamente excluyentes: “éxito” (nacer sano) y “fracaso” (nacer con un-

**Tabla 7.3.- Prevalencias totales (x 10 000 nacimientos) de defectos del tubo neural en el lapso 80-99<sup>17</sup>.**

<i>Registro</i>	<i>1980-84*</i>	<i>1985-89*</i>	<i>1990-94*</i>	<i>1995-99*</i>	<i>p</i>
Asturias	- - -	- - -	51 36 527 13,96 (10,40-18,36)	39 32 370 12,05 (8,57-16,47)	0,487
Barcelona	- - -	- - -	37 38 824 9,53 (6,71-13,14)	53 60 424 8,77 (6,57-11,47)	0,698
País Vasco	- - -	- - -	89 80 293 11,08 (8,90-13,64)	62 64 023 9,68 (7,42-12,41)	0,414
ECEMC#	316 315 670 10,01 (8,94-11,18)	243 287 748 8,44 (7,42-9,58)	244 433 858 5,62 (4,94-6,38)	153 481 188 3,18 (2,70-3,73)	<0,001 ↓
Mainz (Alemania)	- - -	- - -	24 19 983 12,01 (7,70-17,87)	46 17 985 25,58 (18,73-34,12)	0,003 ↑
Sajonia- Anhalt (Alemania)	- - -	79 48 990 16,13 (12,77-20,10)	33 45 759 7,21 (4,96-10,13)	55 48 295 11,39 (8,58-14,82)	<0,001 ↓
Amberes (Bélgica)	- - -	- - -	40 33 127 12,07 (8,63-16,44)	58 75 626 7,67 (5,82-9,91)	0,034 ↓
Hainaut (Bélgica)	42 40 790 10,30 (7,42-13,92)	53 47 464 11,17 (8,36-14,61)	73 65 282 11,18 (8,77-14,06)	64 60 804 10,53 (8,11-13,44)	0,963
Bulgaria	- - -	- - -	- - -	72 39 124 18,40 (14,40-23,18)	-
Croacia	6 8052 7,45 (2,73-16,22)	17 30 849 5,51 (3,21-8,82)	22 33 099 6,65 (4,17-10,06)	12 31 255 3,84 (1,98-6,71)	0,406
Odense (Dinamarca)	34 23 010 14,78 (10,23-20,65)	29 24 752 11,72 (7,85-16,83)	27 29 559 9,13 (6,02-13,29)	34 28 527 11,92 (8,25-16,65)	0,316
Estrasburgo (Francia)	44 39 105 11,25 (8,18-15,10)	58 66 193 8,76 (6,65-11,33)	68 67 294 10,10 (7,85-12,81)	65 53 391 12,17 (9,40-15,52)	0,301
París (Francia)	144 145 341 9,91 (8,36-11,66)	220 182 538 12,05 (10,51-13,75)	224 183 049 12,24 (10,69-13,95)	239 187 753 12,73 (11,17-14,45)	0,104
Norte de Holanda	44 30 709 14,33 (10,41-19,23)	75 62 263 12,05 (9,47-15,10)	112 97 298 11,51 (9,48-13,85)	93 97 742 9,51 (7,68-11,66)	0,132
Dublín (Irlanda)	461 122 456 37,65 (34,29-41,24)	224 103 351 21,67 (18,93-24,71)	137 95 029 14,42 (12,10-17,04)	100 99 728 10,03 (8,16-12,20)	<0,001 ↓

Registro	1980-84*	1985-89*	1990-94*	1995-99*	p
Galway (Irlanda)	24 13 815 17,37 (11,13-25,85)	36 14 779 24,36 (17,06-33,72)	19 12 955 14,67 (8,83-22,90)	5 12 960 3,86 (1,25-9,00)	<b>&lt;0,001</b> ↓
Campania (Italia)	- - -	- - -	- - -	137 196 081 6,99 (5,87-8,26)	-
Emilia Romagna (Italia)	44 76 477 5,75 (4,18-7,72)	57 115 750 4,92 (3,73-6,38)	57 124 040 4,60 (3,48-5,95)	40 129 022 3,10 (2,21-4,22)	<b>0,031</b> ↓
Nordeste de Italia	108 148 426 7,28 (5,97-8,79)	133 219 536 6,06 (5,07-7,18)	161 252 816 6,37 (5,42-7,43)	171 273 566 6,25 (5,35-7,26)	0,516
Sudeste de Sicilia (Italia)	- - -	- - -	50 79 480 6,29 (4,67-8,29)	24 72 757 3,30 (2,11-4,91)	<b>0,011</b> ↓
Toscana (Italia)	45 45 867 9,81 (7,16-13,13)	52 43 393 11,98 (8,95-15,71)	61 92 069 6,63 (5,07-8,51)	77 125 188 6,15 (4,85-7,69)	<b>&lt;0,001</b> ↓
Malta	- - -	27 21 763 12,41 (8,18-18,05)	24 26 266 9,14 (5,85-13,60)	28 23 325 12,00 (7,98-17,35)	0,491
Sur de Portugal	- - -	- - -	22 32 558 6,76 (4,23-10,23)	45 80 050 5,62 (4,10-7,52)	0,479
Gales (Reino Uni- do)	- - -	- - -	- - -	119 65 876 18,06 (14,96-21,62)	-
Glasgow (Escocia; Reino Unido)	235 65 257 36,01 (31,55-40,92)	186 64 286 28,93 (24,92-33,40)	102 60 931 16,74 (13,65-20,32)	104 53 160 19,56 (15,98-23,70)	<b>&lt;0,001</b> ↓
Mersey (Inglaterra; Reino Unido)	- - -	- - -	- - -	179 139 867 12,80 (10,99-14,82)	-
Norte del Támesis (Oeste) (Inglaterra; Reino Unido)	- - -	- - -	257 189 111 13,59 (11,98-15,36)	294 236 426 12,44 (11,05-13,94)	0,298
Vaud (Suiza)	- - -	6 7 212 8,32 (3,05-18,11)	38 39 367 9,65 (6,83-13,25)	37 37 892 9,76 (6,88-13,46)	0,935
Totales¶	1 231 759 305 16,21 (15,32-17,14)	1 252 1 053 119 11,89 (11,24-12,56)	1 728 1 734 716 9,96 (9,50-10,44)	2 252 2 343 217 9,61 (9,22-10,02)	<b>&lt;0,001</b> ↓

\* Casos totales (neonatos vivos + neonatos muertos + IVEs); población monitorizada (neonatos vivos + neonatos muertos); prevalencia total (intervalo de confianza del 95% según la distribución de Poisson). Las casillas con contorno de doble línea representan los valores extremos más bajos de cada columna (intervalo quinquenal), mientras que las fondo gris y letras blancas son los valores extremos más altos de cada columna. Los valores de p se han obtenido mediante la pruebas de  $\chi^2$ , los valores significativos se han destacado en negrita y la tendencia se ha simbolizado mediante una flecha.

# ECEMC (Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas). En este caso las prevalencias son al nacimiento.

¶ Incluyen los registros de base poblacional, esto es, las cifras del ECEMC se han excluido del cómputo.

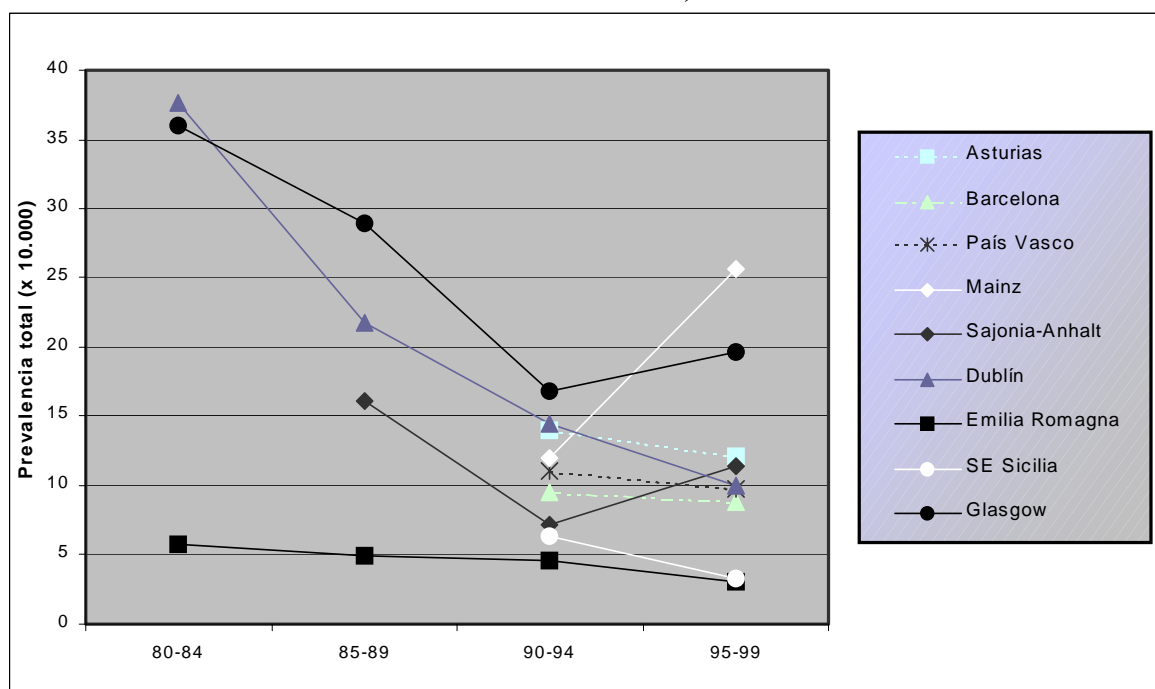
defecto congénito). La probabilidad de “fracaso” se representa con una  $p$  y la de “éxito” con  $1-p$ . Existen  $n$  pruebas independientes (cada embarazo sería una prueba) para cada una de las cuales hay una probabilidad constante  $p$  de “fracaso” y  $1-p$  de “éxito”. Entonces, una distribución de probabilidad (simbolizada por  $f(x)$ ) calcula la probabilidad de obtener  $x$  “fracasos” en  $n$  pruebas. Si la  $n$  es grande y la probabilidad  $p$  es próxima a cero, la distribución que mejor se ajusta a esta situación es la de Poisson, cuya representación gráfica es asimétrica hacia la derecha, a diferencia de la distribución normal que es simétrica. Dicha asimetría indica que la concurrencia de varios “fracasos” en una población con  $n$  individuos es menos probable según aumenta el número de “fracasos”<sup>19</sup>.

En la tabla 7.3 se evidencian los siguientes valores extremos: mínimos en todos los quinquenios considerados para Emilia Romagna (Italia) y máximos para Dublín (Irlanda) en el quinquenio 80-84, para Glasgow (Reino Unido) en los periodos 85-89 y 90-94, y para Mainz (Alemania) en el lapso 95-99. Además, hay una tendencia significativa al descenso en los registros de Sajonia-Anhalt (Alemania); Amberes (Bélgica); Dublín y Galway (Irlanda); Emilia Romagna, Sudeste de Sicilia y Toscana (Italia); y Glasgow (Reino Unido). La dirección de las prevalencias totales promedio de los registros de base poblacional es descendente y también significativa. Las prevalencias aportadas por el registro de Mainz (Alemania) se han duplicado entre los dos últimos quinquenios, y este incremento es estadísticamente significativo. El resto de los registros se ha estabilizado en cifras que oscilan entre 6 y 12 casos por 10 000. El ECEMC muestra unas cifras muy bajas y un descenso significativo, lo que se interpreta como resultado del incremento progresivo de la detección prenatal de los DTNs y también de la tendencia hacia la disminución de las prevalencias. La figura 7.1 ilustra las cifras de los registros de base poblacional españoles y las de otros del EUROCAT con valores extremos. Observamos que los registros españoles muestran unas cifras medias, que son más altas para el registro asturiano y más bajas para el de Barcelona, mientras que los registros italianos de Emilia Romagna y Sudeste de Sicilia han seguido un descenso significativo aunque sus frecuencias de partida eran inferiores a las nuestras. Por otra parte, los registros irlandeses de Dublín y Galway (no representado) si bien aportaron cifras altas en el lapso 80-89 han informado de una disminución muy notable de sus frecuencias, lo cual les sitúa en unos valores más favorables que los de los registros españoles. Al contrario, los registros de Mainz y Glasgow presentan cifras muy altas en el último quinquenio e incluso duplican a las españolas. La prevalencia de Mainz precisa un seguimiento más prolongado, puesto que junto con Galway, constituyen los registros que menos población monitorizan, lo cual hace que las cifras sean menos estables. Sin embargo, la impresión que nos aportan estas proporciones es que en los registros españoles la tendencia es al estacionamiento mientras que otros registros europeos, incluso los que iniciaron su andadura con cifras muy desfavorables, ya están alcanzando cifras parecidas a las nuestras, cuando no inferiores. A este respecto, destacamos que la tercera cifra de prevalencia más alta a lo largo de la década 90-99 después de Mainz (18,44 por 10 000) y Glasgow (18,06) corresponde a Asturias (13,06).

Hemos calculado la ratio entre los dos DTNs más frecuentes, anencefalia y espina bífida, con el fin de averiguar la contribución de cada una de estas anomalías a la prevalencia total. El valor de esta razón se expresa en porcentaje y si es superior a 100 indica un predominio de fetos anencéfalos y si es inferior a 100 un predominio

de afectados de espina bífida. En la figura 7.2 se representan los valores extremos de esta razón en el total de periodos disponibles (1980-99) y los correspondientes a los registros españoles de base poblacional. Los valores máximos pertenecen a: Barcelona (144,1), Gales (112,5), País Vasco (109,4) y París (102,9), mientras que los mínimos corresponden a: Sudeste de Sicilia (16,0), Mainz (17,6), Croacia (20,9) y Emilia Romagna (24,3). La ratio de Asturias es de 86,4, es decir, intermedia con respecto al total de los registros considerados. Únicamente los cuatro valores máximos mencionados superan el 100, lo que implica que el resto de los registros monitorizan poblaciones con predominio de espinas bífidas. Estas ratios valoran la repercusión sanitaria de los DTNs en las distintas áreas monitorizadas, puesto que la anencefalia es inequívocamente letal al nacimiento o anteparto<sup>20,21</sup>, a diferencia de la espina bífida<sup>21</sup>.

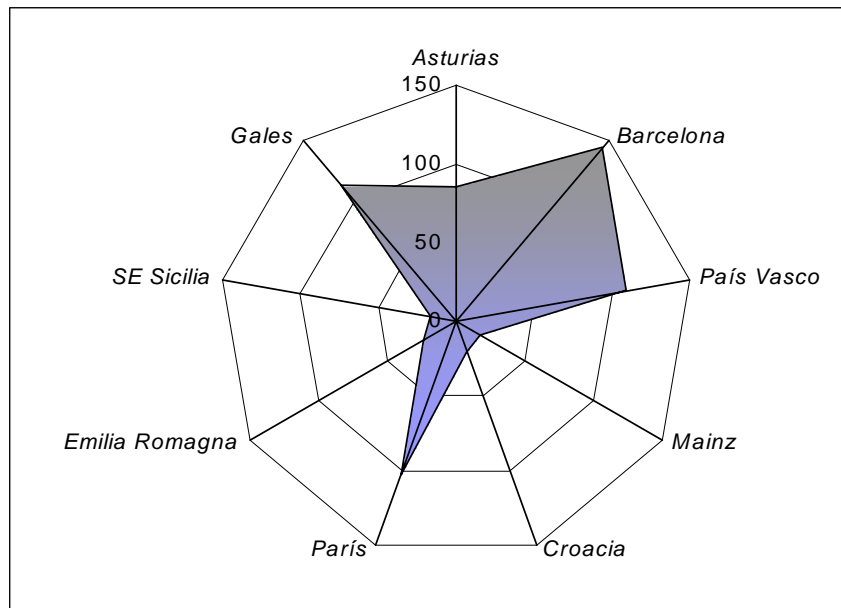
**Figura 7.1.- Prevalencias totales (x 10 000 nacimientos) de defectos del tubo neural en una selección de registros del EUROCAT (European Registration of Congenital Anomalies and Twins).**



Como hemos visto, la tendencia secular de la prevalencia de los DTNs en las poblaciones monitorizadas de Europa, y en la mayor parte de las del resto del mundo<sup>22-3</sup>, es hacia el descenso, el cual se empezó a observar antes de la difusión de las estrategias preventivas (primaria y secundaria) y se sigue apreciando en áreas donde la IVE sigue siendo ilegal (Irlanda), por consiguiente, hay otros factores aún desconocidos que actúan en la misma dirección que la prevención<sup>22-6</sup>. Aun con todo, la disminución de la prevalencia en la década de los 90 ha sido menos abrupta que en los años 80<sup>23</sup>. A diferencia de la tendencia mayoritaria, en Sudamérica se ha detectado un aumento de las prevalencias de espina bífida, anencefalia y encefalocele<sup>27</sup>.



**Figura 7.2.- Ratios anencefalia/espina bífida en una selección de registros españoles y con valores extremos del EUROCAT (European Registration of Congenital Anomalies and Twins).**



Hemos podido apreciar que las frecuencias de los DTNs varían entre países e incluso dentro de un mismo país<sup>17,25,28</sup>. En Europa, la prevalencia de DTNs es más alta en las Islas Británicas que en el continente, y disminuye de oeste a este; al contrario, en el Norte de América la prevalencia disminuye de este a oeste<sup>25,29</sup>. Las cifras de frecuencia de DTNs en Australia y Nueva Zelanda son similares a las de Europa Continental y del Norte de América<sup>25</sup>. La prevalencia de anencefalia en Asia es similar a Europa Continental, mientras que la prevalencia de la espina bífida es más baja que en cualquier otra área<sup>25</sup>, sin embargo, estudios más recientes informan de que la prevalencia de DTNs en el Norte de China se cuenta entre las más altas del mundo<sup>30</sup>.

## **7.2.4 Impacto de las medidas preventivas sobre la prevalencia de las anomalías del tubo neural**

Los cambios en las cifras de prevalencia total valoran principalmente la repercusión de la prevención primaria, aunque estas cifras también se hallan influidas de forma menos intensa por las estrategias de detección precoz (prevención secundaria). Por otra parte, la evolución de la prevalencia al nacimiento se ve influida sobre todo por la prevención secundaria.

Las medidas de prevención primaria más destacadas son la ingesta de suplementos periconcepcionales con ácido fólico y la fortificación de los cereales. La primera medida no ha mostrado repercusión sobre la prevalencia total de estas enfermedades en una amplia serie de registros que colaboran con los ICBDMs<sup>31-3</sup>. Además, en Inglaterra y Gales, durante la primera mitad de la década de los 90, etapa en la que

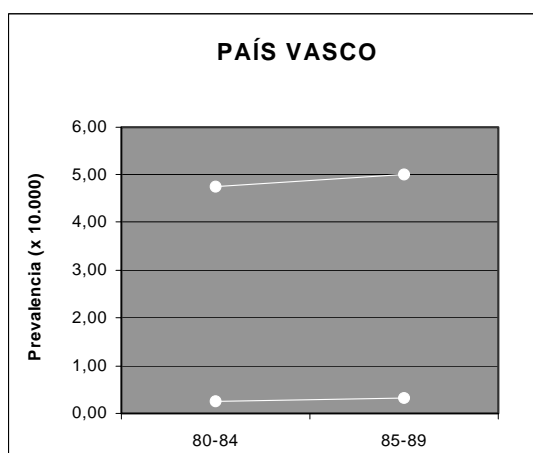
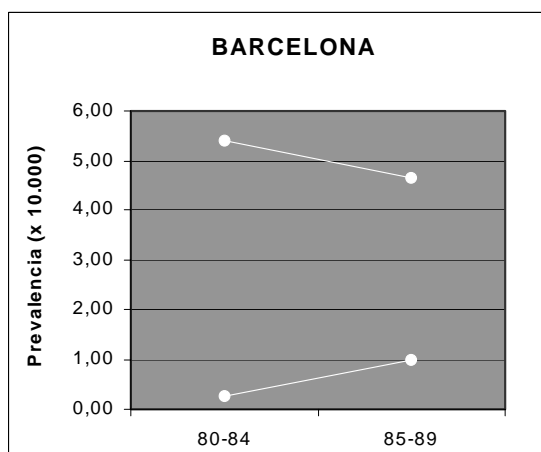
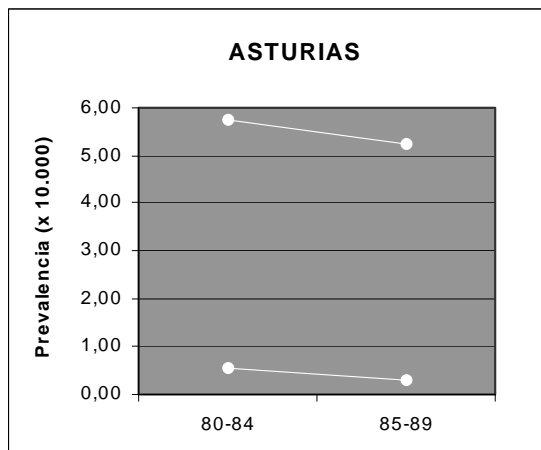
se publicaron los ensayos clínicos que respaldaron la prevención primaria de los DTNs con ácido fólico<sup>34-5</sup> y se publicaron las primeras recomendaciones institucionales, el descenso de la frecuencia de los DTNs fue más suave que durante la década de los 80<sup>23,32</sup>, a pesar de que la venta de especialidades farmacéuticas con ácido fólico aumentó espectacularmente<sup>32</sup>. Afortunadamente, la fortificación con folatos, medida que llega a todas las mujeres de edad fértil, independientemente de si han planificado o no su embarazo, o de si pensaban o no tomar ácido fólico periconcepcional, se ha traducido en una reducción clara de la prevalencia total, tanto en EE.UU.<sup>36</sup> como en Canadá<sup>37-8</sup>.

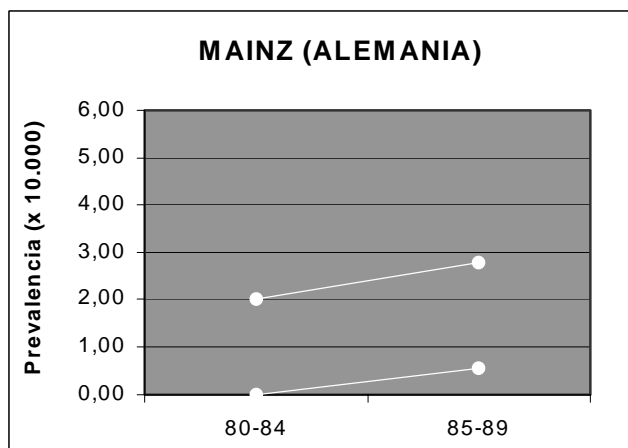
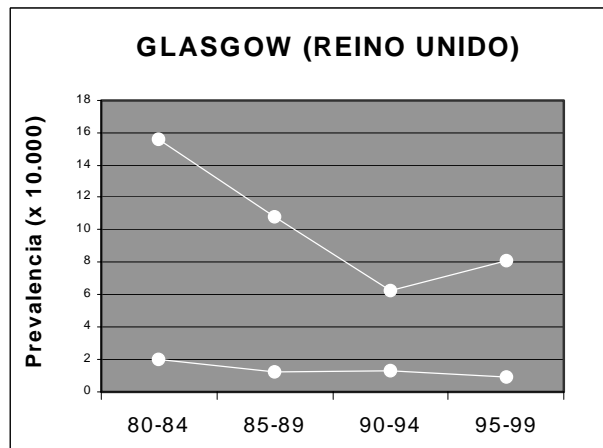
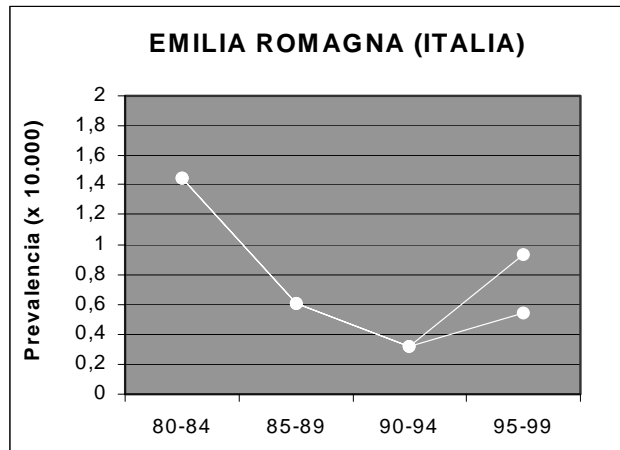
En las figuras 7.3-7.14 se representan las prevalencias totales y al nacimiento para la anencefalia y la espina bífida de los registros con valores extremos de prevalencia total quinquenal de la tabla 7.3 y de los españoles de base poblacional, siempre que la población monitorizada se pueda acoger a la IVE en caso de malformación, es decir, no se ha representado el registro de Dublín.

La aplicación de las medidas propias de la prevención secundaria varía según las políticas de cribado (ecografía morfológica, alfafetoproteína en suero materno) y factores culturales (aceptación o no de la IVE). En principio, una prevención secundaria accesible y efectiva se manifestará gráficamente como una línea de tendencia de la prevalencia al nacimiento paralela o divergente de la de la prevalencia total según vayamos avanzando en el tiempo.

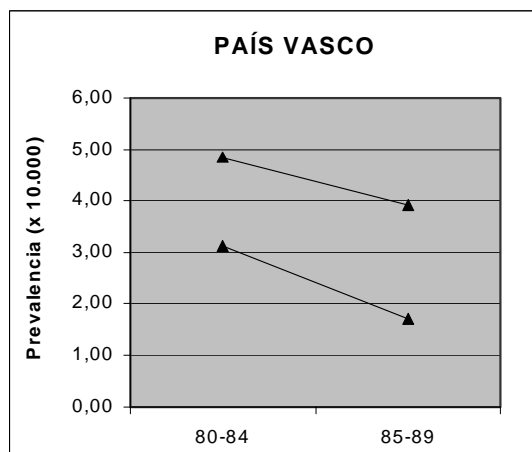
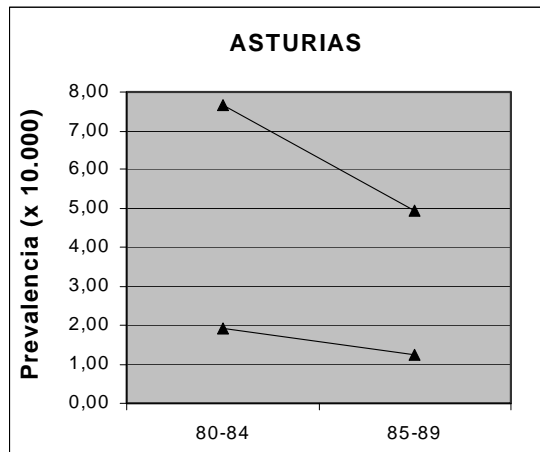
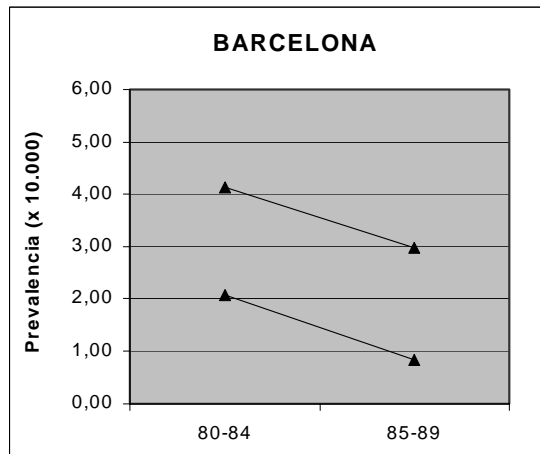
Con respecto a la anencefalia, ello se cumple en los registros de Asturias, País Vasco, y Mainz. En Barcelona, las líneas de tendencia de la prevalencia son convergentes, sin embargo, el desconocimiento de los casos concretos en los que se produjo el nacimiento de los fetos anencéfalos, nos impide interpretar correctamente este hallazgo. En Emilia Romagna, las tendencias son coincidentes y divergen sólo en el último quinquenio, ello se debe a que la población monitorizada inicialmente no se podía acoger a la IVE legal. En Glasgow, la diferencia entre las prevalencias totales y al nacimiento ha sido muy importante a lo largo de todos los periodos monitorizados, además las líneas tienden a separarse a partir del último quinquenio, lo cual indica que la detección prenatal es efectiva y la IVE es bien aceptada en este supuesto. Las tendencias de las prevalencias de la espina bífida son paralelas, salvo en el País Vasco y Mainz que son ligeramente divergentes; mientras que en Asturias convergen ligeramente. Aparte, las prevalencias al nacimiento de la espina bífida superan, en general, el 1 por 10 000, lo cual no ocurre con la anencefalia. Análogamente, en poblaciones con prevalencias totales similares de anencefalia y espina bífida (p.ej. Asturias o País Vasco), nacen más niños con espina bífida que con anencefalia. Estos resultados se interpretan a la luz de la mayor dificultad de detección de los casos de espina bífida con respecto a la anen-

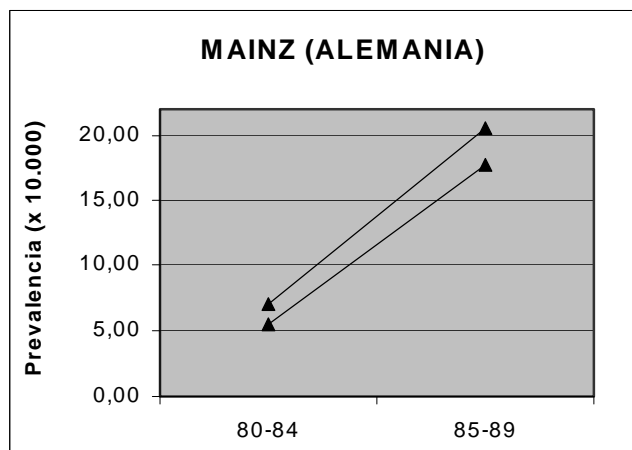
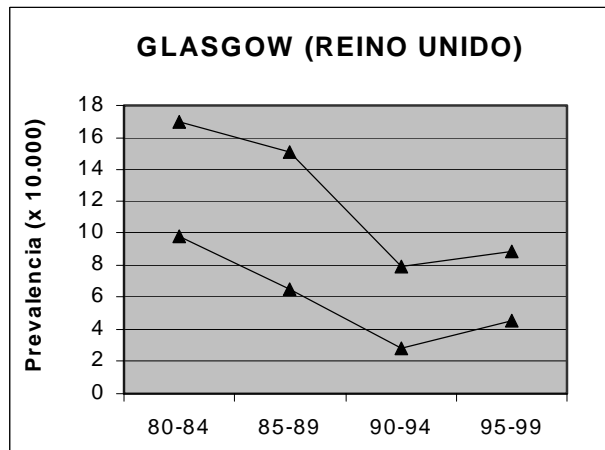
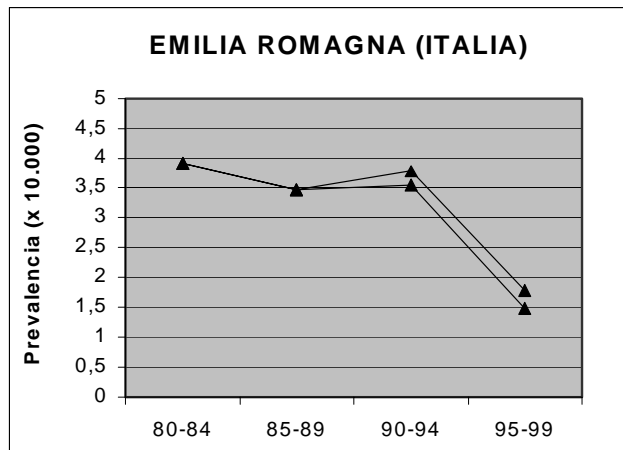
**Figuras 7.3-7.8.- Prevalencias totales y al nacimiento de anencefalia en una selección de registros del EUROCAT<sup>17</sup>.**





**Figuras 7.9-7.14.- Prevalencias totales y al nacimiento de espina bífida en una selección de registros del EUROCAT.**





cefalia. En este mismo sentido se han pronunciado los autores de un trabajo muy bien documentado cuyo fin fue la evaluación de la detección prenatal de los DTNs en las poblaciones monitorizadas por el EUROCAT<sup>39</sup>. En estas poblaciones, si bien la proporción de anencefalias detectadas prenatalmente es alta, hay una mayor variación en

el diagnóstico prenatal de la espina bífida, cuya sensibilidad es baja con respecto a la anencefalia. Adicionalmente, las diferencias culturales interpopulacionales influyen sobre el porcentaje de IVEs de los casos susceptibles de acogerse a esta medida.

## **7.2.5 Otros factores que modifican la prevalencia de los defectos del tubo neural**

La variación geográfica y la tendencia secular en las prevalencias de los DTNs han sido una fuente fecunda de hipótesis etiológicas, que se han escrutado mediante estudios sobre los posibles factores moduladores de la frecuencia de los DTNs, sin embargo, los resultados que nos brindan éstos son a menudo inconsistentes a causa de las siguientes situaciones: muestras escasas, sesgo de recuerdo en los estudios retrospectivos, obtención de datos ocupacionales a través de certificados de nacimiento<sup>40</sup>, estimación de las exposiciones a sustancias químicas según el lugar de residencia de los progenitores, dificultad de obtención de medidas exactas de las distintas exposiciones, tasas de exposición escasas, factores de confusión no controlados<sup>41</sup>, información inexacta proporcionada por los entrevistados<sup>42</sup>, descripción deficiente de cuadros clínicos, utilización de nomenclaturas no estandarizadas<sup>43</sup>, heterogeneidad etiológica de los DTNs<sup>44-5</sup>, etc. Aun con todo, la investigación epidemiológica, auxiliada por la experimentación animal o por los estudios bioquímicos, ha podido establecer factores de riesgo de los DTNs como la hipertermia o el valproato y factores protectores como el ácido fólico.

Según Little y Elwood, los factores moduladores o explicativos de las prevalencias aumentadas de DTNs tienen un mayor impacto entre las poblaciones con altas frecuencias basales de DTNs que entre las que tienen frecuencias bajas de los mismos<sup>25</sup>. Como ya se ha comentado en otros capítulos, los DTNs constituyen un grupo heterogéneo de anomalías, razón por la cual el impacto de un factor de riesgo determinado depende de la ubicación del DTN, y de su asociación a otros defectos<sup>44-7</sup>. Entonces, las características epidemiológicas “clásicas” de los DTNs, esto es, mayor afectación del sexo femenino y de la raza blanca, existencia de gradiente este-oeste y tendencia secular al descenso sólo se dan en los DTNs aislados<sup>45</sup>, por consiguiente, los estudios que mencionaremos a continuación incluyen mayormente DTNs fuera del contexto de aneuploidías o de síndromes, y sin otras anomalías politépicas asociadas.

### **7.2.5.1 Factores étnicos y raciales**

En los Estados Unidos, se ha objetivado que la prevalencia total de los DTNs es más alta entre los hispanos, seguidos por los blancos no hispanos, los indios, los afroamericanos y los asiáticos<sup>48-50</sup>. Un estudio reciente del California Birth Defects Monitoring Program (CBDMP) estudió las anomalías congénitas entre los hijos de las mujeres vietnamitas nacidos entre 1985 y 1997, hallando un riesgo relativo (RR) ajustado inferior a 0,8 con respecto a las blancas no hispanas de espina bífida y supe-

rior a 1,3 con relación a la anencefalia<sup>51</sup>. Se ha informado de una prevalencia de DTNs muy superior y significativa entre los indios sikh que habitan en British Columbia (Canadá), sin embargo, las manifestaciones clínicas de estas anomalías difieren de las de la población caucásica residente en su mismo entorno<sup>52-3</sup>. La diferencia de prevalencia de los DTNs entre diversas etnias tanto se atribuye a un trasfondo genético propio, como a factores exógenos tales como la dieta, costumbres u otros factores pendientes de dilucidar.

### **7.2.5.2 Altitud**

El único estudio que ha considerado la altitud como factor asociado a los DTNs, que sepamos, es el de Castilla y cols.<sup>54</sup> que incluye la casuística del ECLAMC (Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas) entre 1967 y 1995. Tras ajustar los resultados mediante un análisis multivariante objetivaron un riesgo significativamente inferior de anencefalia y espina bífida por encima de los 2000 m sobre el nivel del mar. Aunque, obviamente, estos hallazgos se pueden deber a factores de confusión no identificados, es posible que sean reales, puesto que la altitud afecta de la misma forma a los dos DTNs más frecuentes.

### **7.2.5.3 Variaciones estacionales**

Con respecto a la influencia de la estación sobre la concepción de DTNs, las conclusiones de los distintos trabajos, si bien pueden ser distintas, no tienen porqué ser contradictorias sino complementarias. Éste es el caso de dos trabajos muy bien documentados. El primero, de Bound y cols.<sup>55</sup>, es un estudio prospectivo sobre 88 449 niños nacidos en un área muy concreta de Reino Unido entre 1957 y 1981. La cobertura de esta área, al parecer, fue total, puesto que los casos fueron recogidos por un único pediatra y la proporción de necropsias era alta. Se objetivó una frecuencia significativamente superior de DTNs engendrados entre diciembre y mayo en los años de mayor prevalencia de estas anomalías (5,5 por 1000 nacimientos), sin embargo, esta variación estacional desapareció al descender su frecuencia por debajo de la media nacional. Las variantes susceptibles fueron la espina bífida y el cráneo bífido aislados, así como la anencefalia asociada a otras malformaciones. En el segundo estudio se compararon tres series que, en total, reunían más de un millón de nacimientos de áreas con distintos patrones climáticos<sup>56</sup>. Tras un análisis estadístico riguroso, no se pudo probar que la variación estacional influyera ni sobre la concepción de niños con espina bífida ni con encefalocele, mientras que en la serie italiana el valor de *p* fue estadísticamente significativo para la anencefalia. A la luz de estos hallazgos pensamos que es posible la existencia de una variación estacional de la prevalencia de los DTNs en ciertas áreas geográficas de alta frecuencia de estas anomalías. El cambio de las condiciones ambientales influenciaría la disponibilidad de ciertos nutrientes, por lo tanto, la estacionalidad no sería un factor causal sino de confusión. En la misma línea, el progreso económico de las últimas décadas puede haber eliminado la variación nutricional antaño relacionada con los cambios climáticos en zonas concretas.



### **7.2.5.4 Edad de los progenitores**

Aunque en la literatura se han documentado más DTNs en los extremos de edad materna, son más abundantes los trabajos que respaldan la mayor juventud de las madres<sup>22,25,57</sup> que la mayor edad de las mismas<sup>58</sup>.

Si bien la edad paterna no se ha podido vincular de forma concluyente a los DTNs<sup>25,49</sup>, en el estudio de McIntosh y cols. se ha documentado una mayor frecuencia de estos defectos en los extremos de edad paterna<sup>59</sup>.

### **7.2.5.5 Paridad**

Los DTNs se han relacionado más frecuentemente con la multiparidad<sup>25,57,60</sup> que con la primiparidad<sup>25</sup>.

### **7.2.5.6 Abortos y muertes fetales previas**

La existencia de un aborto, espontáneo o inducido, o de una muerte fetal predispone a la concepción de un hijo con DTN<sup>25,61,62</sup>. Con respecto a estos factores, no se ha podido dilucidar si son reales, o bien, se deben a un sesgo de recuerdo de las madres de los afectados<sup>25</sup>.

Un estudio reciente de Todoroff y Shaw<sup>63</sup>, realizado a partir de una cohorte de 408 madres multigestas de DTNs y sus correspondientes controles ha mostrado un riesgo significativamente disminuido de DTN entre madres cuya gestación anterior terminó en aborto espontáneo o IVE en comparación con el parto de un feto vivo (odds ratio (OR)=0,82, intervalo de confianza del 95% (IC 95%) 0,61-1,1), independientemente de la duración del lapso entre gestaciones.

### **7.2.5.7 Intervalo intergenésico**

De acuerdo con una investigación de Myrianthopoulos y Melnick<sup>61</sup>, el intervalo transcurrido entre la finalización de una gestación y el inicio de otra con un feto afectado por un DTN es significativamente inferior que en las gestaciones controles, independientemente de que la gestación previa resultara en un feto vivo o en un aborto espontáneo. El estudio de Todoroff y Shaw<sup>63</sup> ha complementado los hallazgos anteriores, puesto que ha documentado un riesgo 50% superior si el lapso entre gestaciones era inferior o igual a seis meses frente a lapsos entre 12 y 24 meses, además el riesgo también era más alto si el embarazo anterior había concluido en un parto de feto vivo que en aborto espontáneo o inducido.

## 7.2.5.8 Embarazos múltiples

El mayor riesgo de defectos congénitos entre los embarazos de gemelos no se restringe únicamente a los DTNs<sup>64-7</sup>, aunque no son pocos los estudios que han objetivado específicamente una mayor frecuencia de DTNs entre las gestaciones múltiples<sup>57,60</sup>. De entre las distintas modalidades de DTNs, parece que la que se vincula más frecuentemente a los embarazos múltiples es la anencefalia<sup>64</sup>. Nos ha parecido oportuno comentar los resultados de una investigación sobre defectos en gemelos realizada en nuestro país<sup>68</sup> a partir de datos del ECEMC: mayores tasas de anencefalia y encefalocele entre el total de embarazos múltiples y entre pares de gemelos del mismo sexo, y ausencia de incrementos significativos para la espina bífida.

## 7.2.5.9 Edad gestacional y peso al nacimiento

Los DTNs, como la mayoría de defectos congénitos, se vinculan a retraso de crecimiento intrauterino<sup>66,69</sup>, a prematuridad<sup>70-1</sup> o a ambos. Mili y cols.<sup>72</sup> han podido establecer un gradiente inversamente proporcional entre el peso al nacimiento y la proporción de anomalías congénitas, que oscila entre el 16,2% de defectos entre niños con peso al nacer inferior a 1500 g y el 2,8% entre nacidos con peso de 4000 g o superior. Destacamos que Khoury y cols.<sup>69</sup> observaron que de entre 48 categorías de defectos evaluadas, la anencefalia era la segunda que causaba más retraso de crecimiento intrauterino después de las cromosomopatías.

Por otra parte se ha documentado un exceso de macrosomía en neonatos afectados de encefalocele y no de otros DTNs, lo cual puede reflejar el efecto de la hiperglucemia diabética sobre el peso al nacimiento de los fetos con estas anomalías y otras que son más frecuentes entre los hijos de las gestantes con diabetes mellitus pregestacional<sup>73</sup>.

## 7.2.5.10 Sexo fetal

Los DTNs son más frecuentes en el sexo femenino<sup>22,25,60</sup>. El predominio femenino es más notable en la anencefalia<sup>29,39,74-5</sup> y la iniencefalia<sup>76-80</sup>, mientras que en la espina bífida la situación está más próxima a un equilibrio<sup>39,81</sup>, aunque los mielomeningoceles de ubicación torácica son más prevalentes entre las mujeres<sup>75,82-3</sup>.

La distribución sexual de los DTNs depende del área geográfica considerada, del año de nacimiento del feto afectado y de si al nacer estaba vivo o muerto<sup>75</sup>. Según algunos autores la asociación de los DTNs a otras anomalías modifica la ratio sexual de estos defectos<sup>75</sup>, mientras que según otros la presencia de otras anomalías no la hace variar<sup>29</sup>. En España, la anencefalia afecta a ambos sexos por igual, mientras que la espina bífida predomina en los varones<sup>84</sup>.

La causa subyacente al predominio femenino entre los afectados por DTNs dista de ser evidente. Las hipótesis explicativas que se han propuesto son: una mayor

tasa de abortos espontáneos entre los fetos masculinos afectados<sup>25</sup> y una desviación preferente de los radicales metilo hacia la metilación de los cromosomas en detrimento de su colaboración en la elevación de los pliegues neurales durante el proceso de neurulación<sup>85</sup>. La existencia de un cromosoma X mucho más grande que el Y sería la causa de un requerimiento mayor de metilos en los embriones femeninos<sup>85</sup>.

### 7.2.5.11 Antecedentes familiares

La herencia de los DTNs aislados, como ocurre en todas las enfermedades de origen multifactorial (labio leporino, atresia esofágica, estenosis hipertrófica del píloro, hipertensión arterial, trastorno bipolar), tiene un riesgo de recidiva intermedio entre los trastornos esporádicos y las enfermedades de herencia mendeliana. La teoría multifactorial de la herencia dice que todos los individuos tienen una predisposición mayor o menor, al modo de una variable cuantitativa continua, a contraer una enfermedad determinada, pero ésta no aparece hasta que esta predisposición excede un límite a partir del cual el fenotipo exhibido es anormal. Algunas de las características más importantes de la teoría multifactorial<sup>86</sup> aplicadas a los DTNs aislados son:

- Los DTNs se agregan en algunas familias, sin embargo no existe un patrón claro de herencia que explique la aparición de los casos.
- El riesgo en parientes de primer grado es aproximadamente la raíz cuadrada del riesgo poblacional (si consideramos una prevalencia total del 1/1000, su raíz cuadrada es 0,032, esto es, un riesgo teórico del 3,2% en los hermanos).
- El riesgo es menor para los parientes de segundo grado y más alejados.
- El riesgo de recurrencia es mayor si está afectado más de un miembro de la familia.
- Si los DTNs son más frecuentes en un sexo que en otro, el riesgo de recurrencia es mayor para los parientes de los pacientes del sexo menos susceptible. Entonces, si en una población los DTNs son más frecuentes entre el sexo femenino, en una familia en que el afectado sea un varón el riesgo de recurrencia en sus parientes es más alto que si el afectado es una mujer.

Si asumimos que la prevalencia total de los DTNs es de 1/1000, el riesgo aproximado<sup>87</sup> de tener un hijo con la enfermedad depende de si hay:

- Un hermano o un progenitor afectados: 1-3%.
- Un hermano y un progenitor o dos hermanos afectados: 5-8%.
- Un primo hermano afectado: 1%.

Obviamente, estos cálculos se verán modificados con la presencia de factores moduladores (ingesta de ácido fólico periconcepcional, exposición a fármacos antifolato, toma de valproato, fiebre durante la neurulación, etc.).

Los riesgos empíricos de recurrencia de los DTNs aislados que aparecen en la literatura son moderadamente variables y dependen de la prevalencia de las poblaciones escrutadas, tal y como predice la teoría multifactorial de la herencia<sup>44,88-9</sup>.

Otro rasgo destacado de la herencia de los DTNs es la recurrencia heteróloga, o sea, la aparición de distintas modalidades de DTNs en miembros de una misma familia. Lo más frecuente es que si hay dos hijos afectados, uno padezca espina bífida y el otro anencefalia. Por ello, los riesgos empíricos de recurrencia de los DTNs se refieren a cualquier tipo de DTN y no sólo a la modalidad de DTN que presenta el pariente afectado (Dr. Joaquín Salvador, comunicación personal).

Otra situación que se nos puede presentar es la predicción del riesgo de recurrencia para familias con uno o más miembros afectados de espina bífida oculta complicada o sintomática. Un estudio, que incluyó 207 pacientes índice, objetivó la aparición de nueve anencefalias y cinco espinas bífidas quísticas entre los 364 hermanos de estos pacientes, lo que supone una recurrencia del 4,1%<sup>90</sup>. Como estas cifras son similares al riesgo de recurrencia de la espina bífida quística y de la anencefalia, podemos aconsejar de forma similar a los afectados de DTNs abiertos y de espinas bífidas ocultas complicadas.

Algunos trabajos han informado de familias en las que la recurrencia de los DTNs sigue un patrón hereditario mendeliano (herencia monogénica autosómica o gonosómica)<sup>91-5</sup>. Sin embargo, estos artículos se suelen basar en familias aisladas y sus hallazgos son frecuentemente compatibles con la teoría multifactorial, que permite la herencia vertical (similar a la herencia autosómica dominante) y la horizontal (al modo de la herencia autosómica recesiva), por lo tanto, no sabemos con certeza si la transmisión obedece a un defecto monogénico o poligénico. En pocas ocasiones se ha hallado un sustrato genético posiblemente responsable<sup>95</sup>, y sólo en estos casos podemos hablar con propiedad de herencia monogénica, pero estas situaciones son excepcionales y no tienen que ver con la mayoría de DTNs.

En definitiva, la aceptación de la teoría multifactorial de la herencia, si bien nos puede ayudar en el consejo genético, no va a contribuir a averiguar la causa de estas malformaciones si no se acompaña de la identificación de los genes responsables. Igualmente, tampoco podremos predecir el comportamiento de la interacción genético-ambiental hasta que conozcamos el sustrato genético susceptible de verse modulado por el entorno.

### **7.2.5.12 Condición socioeconómica**

Hay trabajos muy bien fundamentados sobre la mayor prevalencia de DTNs entre las clases sociales más desfavorecidas<sup>96-7</sup>, aunque no todos han podido confirmar esta relación<sup>98</sup>.

### **7.2.5.13 Altas temperaturas**

La hipertermia es un teratógeno probado tanto en animales como en humanos. El umbral de su efecto en la mayoría de las especies se sitúa alrededor de 1,5°C por encima de la temperatura corporal normal. En general, las temperaturas más altas y/o de mayor duración suelen causar abortos, mientras que las elevaciones de menor entidad suelen ocasionar anomalías congénitas<sup>99</sup>.

Los DTNs se cuentan entre las anomalías más frecuentemente asociadas a la hipertermia. Ya en 1978, Miller y cols. informaron que siete de 63 madres de anencéfalos se habían sometido a altas temperaturas en los días próximos al cierre del tubo neural. En cinco de estas madres la causa de la hipertermia había sido una enfermedad infecciosa y en las dos restantes la realización de sesiones de sauna<sup>100</sup>. Shiota efectuó un estudio sobre 113 embriones con DTNs donados a la colección de la Universidad de Kyoto y averiguó que el 18% de las 50 madres de los embriones con exencefalia, y el 11% de las 63 madres de los embriones con mielosquisis habían tenido fiebre en comparación con el 5% de los controles. La diferencia fue estadísticamente significativa para las exencefalías, pero no lo fue para la mielosquisis. Una limitación de este trabajo es que sólo se pudo conocer la edad gestacional en la que tuvo lugar el aumento de temperatura en diez de las madres de los DTNs, y sólo en ocho de ellas la fiebre apareció cerca del momento de cierre del tubo neural<sup>101</sup>. En un estudio de casos y controles se investigaron los antecedentes de 385 niños con DTNs y se obtuvo una OR de 3,0 (IC 95% 1,9-4,7) para los episodios de fiebre de dos o más días ocurridos entre el mes antes de la concepción y el primer trimestre gestacional. La OR fue significativa y superior (4,3) si la causa de la fiebre fue la gripe y, además, se tomó medicación para aliviarla<sup>102</sup>. En otro estudio de casos y controles, del CBDMP, se pudo objetivar una OR ajustada significativa (1,91, IC 95% 1,35-2,72) para la fiebre en general. Este incremento de riesgo fue superior para la fiebre sin medicación que para la fiebre y el uso concomitante de antitérmicos<sup>103</sup>. La inclusión de 538 casos de DTNs en este último estudio no fue suficiente para demostrar cambios significativos para las enfermedades febriles consideradas aisladamente (bronquitis, neumonía, otitis media, hepatitis, etc.) en comparación con los controles<sup>103</sup>. Botto y cols. investigaron la interacción entre la fiebre y los suplementos vitamínicos con datos del estudio de casos y controles sobre defectos congénitos de Atlanta. La presencia de fiebre sin consumo de polivitamínicos se asoció con una OR de 2,1 de tener un hijo con DTN y de 0,6 si se tomaban polivitamínicos periconcepcionales, por lo tanto, se concluyó que la ingesta de vitaminas podía mitigar el riesgo de DTNs ligado a las enfermedades febriles<sup>104</sup>.

La exposición a fuentes de calor exógenas constituye un factor de riesgo de DTNs controvertido. Un estudio incluyó 100 defectos consecutivos del sistema nervioso central procedentes del Registro Finlandés de Malformaciones y sus correspondientes controles, sin hallar una diferencia significativa en el uso de la sauna por parte de ambos grupos. Además, en un país como Finlandia donde el uso de la sauna es más habitual que en otras latitudes la prevalencia de defectos neurológicos era muy baja en el momento de efectuarse este estudio<sup>105</sup>. Al contrario, un estudio prospectivo realizado en Nueva Inglaterra sobre una cohorte de 23 491 mujeres documentó unas cifras de RR ajustadas superiores a uno y significativas para el uso de baños calientes durante el primer trimestre, y para la exposición a dos fuentes de calor distintas (fiebre, baños calientes o sauna) durante el mismo periodo. El uso de almohadillas eléctricas no se pudo asociar significativamente a un riesgo superior de DTNs<sup>106</sup>.

De los estudios mencionados se desprende que hay que evitar la fiebre, saunas y baños calientes durante el primer trimestre de embarazo, o como mínimo durante las seis primeras semanas. Es posible que en el caso de padecer una enfermedad febril sea útil tomar antitérmicos con el fin de reducir la temperatura corporal; análo-

gamente el uso de polivitamínicos periconcepcionales contribuye a mitigar los efectos deletéreos de las altas temperaturas.

### **7.2.5.14 Diabetes**

Las mujeres diabéticas tienen un riesgo de concebir un feto malformado directamente proporcional a su desviación de la euglucemia<sup>107-8</sup>. Los defectos más prevalentes entre los hijos de madre diabética afectan a los sistemas nervioso central y cardiovascular<sup>107-9</sup>, por lo tanto en este colectivo también son más frecuentes los DTNs<sup>25,61,107-10</sup>.

### **7.2.5.15 Tiroidopatías**

El estudio de Khoury y cols. basado en casi 5000 nacidos entre 1968 y 1980 en el área metropolitana de Atlanta halló un riesgo mayor de encefalocele entre los hijos de madres hipertiroideas<sup>111</sup>. Que conozcamos, estos hallazgos no se han reproducido, sin embargo las publicaciones sobre defectos congénitos en hijos de gestantes con tiroidopatías son escasos.

### **7.2.5.16 Peso materno**

La relación entre el peso materno y los DTNs no está definida, ya que los hallazgos de las diferentes investigaciones sobre este particular son contrapuestas. Así, la obesidad se ha vinculado a los DTNs en varios estudios de diseños desiguales. Waller y cols. mostraron una OR ajustada significativa (1,8, IC 95% 1,1-3,0) de tener un hijo afectado por un DTN en aquellas madres con un índice de Quetelet preconcepcional superior o igual a 32 comparadas con las de peso normal<sup>112</sup>. El estudio de Werler y cols. estimó riesgos relativos significativos y directamente proporcionales al peso pregestacional a partir de los 80 kg, sin embargo, esta investigación tiene una limitación muy importante: sólo dispone de los índices de Quetelet de una parte de las participantes<sup>113</sup>.

Al contrario, el estudio de Shaw y cols. informó de una OR ajustada incrementada y significativa de tener un hijo con un DTN para aquellas mujeres que experimentaron una ganancia escasa de peso a lo largo del embarazo<sup>114</sup>. El bajo peso se interpreta como una consecuencia de portar un hijo con una malformación, y no como causa, puesto que el incremento ponderal durante la neurulación es relativamente escaso con respecto a la ganancia durante el resto de la gestación.

Por último, Feldman y cols. repartieron los pesos de 72 915 mujeres que se habían sometido a cribado bioquímico en distintos intervalos y calcularon la prevalencia de DTNs en cada grupo, sin hallar diferencias significativas entre ellas<sup>115</sup>.

### **7.2.5.17 Estrés**

Para una investigación del CBDMP se reclutaron casos de malformaciones entre gestaciones concluidas entre 1987 y 1989 con sus correspondientes controles. Mediante entrevistas telefónicas recogieron la cantidad y calidad de eventos estresantes acontecidos en el periodo periconcepcional y objetivaron que las mujeres que habían experimentado al menos un evento estresante periconcepcional tenían un 50% más de posibilidades de dar a luz un feto con labio leporino, cardiopatía conotruncal o DTN. Estas asociaciones tendían a restringirse entre las mujeres de nivel de instrucción medio-bajo y no obesas<sup>116</sup>.

### **7.2.5.18 Exposición a campos electromagnéticos**

En el trabajo de Blaasas y cols.<sup>117</sup> se estudió el riesgo de defectos congénitos en los progenitores expuestos a campos electromagnéticos de 50 Hz durante su actividad laboral. Tras el ajuste para una serie de variables de confusión, se pudo vincular la exposición materna a un riesgo significativamente aumentado de espina bífida y la paterna a un incremento de riesgo, también significativo, de anencefalia. De nuevo, al ser el único trabajo publicado sobre el particular, que sepamos, habrá que esperar otros que validen o refuten estos resultados.

### **7.2.5.19 Exposición a agentes químicos**

Los xenobióticos pueden alcanzar nuestro organismo mediante ingesta, inhalación, por vía transcutánea, o parenteral. La exposición a los mismos será conocida en el caso de tratamientos médicos o inadvertida si ocurre durante el desempeño laboral o durante la realización de actos propios de la vida cotidiana. Lamentablemente, no es fácil demostrar que un agente químico de uso común sea teratogénico si su potencia no es muy alta. Khoury y Holtzman<sup>118</sup> demostraron mediante modelos matemáticos las limitaciones de los registros de defectos congénitos para la detección de nuevos teratógenos. Entonces, un registro que monitorice 25 000 nacimientos anuales detectará inevitablemente un teratógeno de la potencia de la talidomida, cuyo RR de producir malformaciones está en torno a 175, puesto que incrementará el número de malformaciones en el lapso de una o dos semanas; sin embargo, otros teratógenos también potentes, como el valproato y la isotretionina (RR de 20-25), requerirán más de 20 años de monitorización para mostrar un incremento significativo de anomalías congénitas, puesto que el número de gestantes expuestas es bajo<sup>119-20</sup>. En este contexto, un teratógeno moderado (RR de 2-5) puede ser obviado con suma facilidad. Como consecuencia de lo mencionado anteriormente, es muy posible que los estudios que vamos a mencionar en este y otros puntos posteriores referentes a la exposición a xenobióticos no hayan tenido potencia suficiente para identificar los teratógenos más débiles.

### 7.2.5.19.1 Exposición laboral materna

Con referencia a los factores ocupacionales maternos, los hallazgos son variados, cuando no contrapuestos. Así, Little y Elwood no pudieron vincular de forma concluyente ni la profesión materna ni la exposición a sustancias químicas durante la jornada laboral a la concepción de hijos con DTNs<sup>25</sup>. En una investigación basada en una cohorte de niños malformados del Metropolitan Atlanta Congenital Defects Program (MACDP) nacidos entre 1968 y 1980 se estudió la repercusión de las exposiciones potencialmente nocivas sufridas por los profesionales sanitarios<sup>121</sup>, esto es, virus, gases anestésicos, antisépticos, mercurio y radiaciones ionizantes; el RR ajustado para las enfermeras de tener un hijo con anencefalia o espina bífida fue bajo, aunque estadísticamente significativo (RR=2,0, IC 95% 1,01-4,30). Como son pocos los trabajos que han investigado los defectos congénitos entre los hijos de las enfermeras y los hallazgos han sido controvertidos, los autores de este estudio citan como posible causa de los resultados un sesgo de detección de los defectos congénitos<sup>121</sup>, puesto que la información de la que disponen estas profesionales y su acceso a los servicios sanitarios es mayor que el resto de la población. Un estudio multicéntrico holandés sobre la profesión de 55 casos de madres de espinas bífidas abiertas con sus correspondientes controles mostró un incremento de riesgo para las agricultoras (OR=3,4, IC 95% 1,3-9,0), sin embargo, no pudo hallar diferencias entre la exposición a pesticidas o desinfectantes entre madres casos y controles que trabajaban en la agricultura<sup>122</sup>. A diferencia del trabajo anterior, Shaw y cols.<sup>123</sup> han documentado una OR aumentada de tener un hijo con DTN entre las mujeres cuyos hogares fueron desparasitados por un profesional (OR=1,6, IC 95% 1,1-2,5), y entre las que vivían en un radio de 0,25 millas de distancia de campos de cultivo (OR=1,5, IC 95% 1,1-2,1). Un estudio del CBDMP ha abordado la exposición a una serie de agentes químicos tanto durante la actividad profesional como durante el tiempo libre en el periodo periconcepcional, y a pesar de que la muestra de madres afectadas era importante (538 mujeres) no pudo objetivar vínculo alguno entre las mencionadas exposiciones y el riesgo de tener un hijo con DTN<sup>124</sup>. Entre las madres de los DTNs que habitan la frontera tejanomejicana se ha objetivado un riesgo significativamente superior de exposición a solventes y de ser profesional de la limpieza<sup>125</sup>.

### 7.2.5.19.2 Exposición laboral paterna

Un estudio holandés que incluyó 122 padres casos y 411 padres controles evidenció un mayor riesgo entre los padres expuestos a las radiaciones ultravioletas producidas durante la realización de soldaduras (OR=2,6, IC 95% 1,2-5,6)<sup>126</sup>. La exposición a pesticidas fue significativamente superior entre padres de niños noruegos con espina bífida, sin embargo, este cálculo se basó únicamente en la inclusión de cinco casos<sup>127</sup>. Un estudio más reciente del CBDMP incluyó 538 padres de DTNs y halló una OR superior o igual a 1,5 de tener un hijo con DTN entre los cocineros, bedeles, limpiadores, granjeros y agricultores, sin embargo, los autores reconocen que los riesgos objetivados se atenúan al ajustar las ORs según el índice de Quetelet, toma periconcepcional de vitaminas por parte de la madre, etnia o raza de los progenitores y nivel de instrucción paterno<sup>128</sup>. Por último, algunos de los trabajos ya men-



cionados que detectaron exposiciones maternas de riesgo no pudieron extender sus hallazgos a las paternas<sup>123,125</sup>.

### **7.2.5.19.3 Plomo**

El plomo se ha considerado también como factor de riesgo de aparición de DTNs. En un trabajo noruego compararon todos los nacimientos habidos en aquel país entre 1970 y 1993 de progenitores que se exponían al plomo durante su ejercicio profesional con nacimientos de controles sin dicha exposición. Hallaron un incremento estadísticamente significativo de DTNs en el grupo expuesto al plomo (RR=2,87, IC 95% 1,05-6,38)<sup>129</sup>. Dawson y cols. estudiaron las concentraciones de plomo en los líquidos amnióticos procedentes de 11 gestaciones afectadas de DTNs y encontraron niveles significativamente superiores con respecto a los controles<sup>130</sup>. Al contrario, Macdonell y cols.<sup>41</sup> no objetivaron correlación alguna entre las concentraciones de plomo en el agua corriente superiores a 10 µg/L y la prevalencia de DTNs.

### **7.2.5.19.4 Agente naranja**

No está claro si la exposición al agente naranja, utilizado durante la guerra del Vietnam, causó un incremento de DTNs, puesto que las asociaciones positivas entre las mencionadas anomalías y este herbicida se basaron en pocos casos<sup>131-2</sup>.

### **7.2.5.19.5 Proximidad a vertederos**

Otro factor de riesgo potencial que se ha estudiado es la residencia materna en áreas próximas a vertederos. Los resultados documentados por los tres trabajos localizados que tratan este tema se concretan en una estimación puntual de RRs entre uno y dos<sup>133-5</sup>, que son significativos en dos de los estudios<sup>134-5</sup>. Hasta que no dispongamos de más estudios bien diseñados no se podrá saber si los hallazgos mencionados son reales u obedecen a la presencia de factores de confusión o a artefactos.

### **7.2.5.19.6 Glicoléteres**

Los glicoléteres son agentes químicos de los que se componen productos de uso doméstico e industrial. Con el propósito de evaluar la eventual relación entre estos agentes y la aparición de malformaciones congénitas se efectuó un estudio multicéntrico de casos y controles en Europa<sup>136</sup>. La información sobre la exposición se obtuvo mediante entrevistas a las madres y un químico especializado en glicoléteres evaluó la exposición durante el embarazo. La OR para los DTNs fue significativa (1,94, IC 95% 1,16-3,24). Al ser este trabajo el único, que sepamos, que trata este tipo concreto de exposición, habrá que esperar otros estudios que confirmen o rechacen sus resultados.

### 7.2.5.19.7 Fármacos

La constatación de la teratogenicidad causada por los agentes antifolato parte de la experiencia obtenida con el metotrexate (ametofterina) y la aminopterina como agentes abortivos hace ya más de 50 años<sup>137-40</sup>. El espectro de malformaciones asociadas fue amplio e incluyó los DTNs.

Los fármacos antiepilépticos, fundamentalmente valproato y carbamazepina, causan DTNs entre los hijos de las gestantes que los toman durante la neurulación. El vínculo entre la espina bífida y el valproato parte de varios trabajos publicados en 1982<sup>141-3</sup>. Con posterioridad, se ha llegado a la conclusión de que sólo la espina bífida se relacionaba específicamente con la exposición al mismo, puesto que la ratio espina bífida/anencefalia era 33:1<sup>144-5</sup>. Parece que el ácido valproico afecta al punto de cierre 5 (región lumbosacra) y la neurulación secundaria<sup>146</sup> (capítulo 4). En general, se admite que el riesgo de DTN oscila entre el 1 y el 2% para el valproato<sup>147-8</sup> y es del 0,5% para la carbamazepina<sup>149</sup>. La carbamazepina afecta de modo preferente a los puntos de cierre 2, 1 y 5, esto es, da lugar a meroacranias, holoacranias y espinas bífidas<sup>149</sup>. Algunas investigaciones han documentado factores favorecedores de la teratogenicidad de estos fármacos: la politerapia<sup>150-3</sup>, las altas dosis de valproato<sup>152,154</sup>, y la falta de control de las crisis por el tratamiento médico<sup>155</sup>.

Como se ignora si el mecanismo de producción de DTNs por parte de los anticomiciales tiene que ver con el metabolismo del folato, hay controversia sobre la utilidad de suplementos periconcepcionales de ácido fólico. El valproato y la carbamazepina disminuyen la absorción intestinal de los folatos en humanos<sup>156</sup>, y el valproato inhibe la glutamato formiltransferasa en modelos murinos, lo que ocasiona un incremento de los niveles de tetrahidrofolato y un descenso de los formil-tetrahidrofolatos<sup>157</sup>, lo cual podría interferir en la metilación de la homocisteína y en la síntesis de la base pirimidínica timina. Según algunos investigadores, el ácido fólico (N<sup>5</sup>-formil-tetrahidrofolato) protege de la teratogenicidad inducida por el valproato en los embriones de rata<sup>158</sup>, mientras que según otros no la modifica<sup>159</sup>. Biale y Lewenthal<sup>160</sup> estudiaron la frecuencia de malformaciones entre los recién nacidos de madres que tomaron anticomiciales durante la gestación con/sin suplementos de ácido fólico. La prevalencia de defectos congénitos entre los 66 hijos de las mujeres que no tomaron ácido fólico fue del 15% (DTNs, cardiopatías, fisuras labiopalatinas, alteraciones esqueléticas), mientras que entre los 33 hijos de mujeres que usaron suplementos de folatos fue del 0%. A la luz de estos resultados, se recomendó el uso de ácido fólico en las gestantes bajo tratamiento antiepiléptico. Otros investigadores llegaron a conclusiones similares al apreciar niveles bajos de folatos en sangre en las gestantes que tomaban anticomiciales con respecto a los controles, y aún más deprimidos en aquellas madres que portaban un hijo malformado<sup>161-2</sup>. Pero la clave de la controversia reside en que no se ha probado que el ácido fólico prevenga los DTNs en las madres bajo tratamiento anticomicial y, por otra parte, las concentraciones de los fármacos antiepilépticos son inversamente proporcionales a las del folato en sangre<sup>163</sup>. Esta circunstancia hace albergar dudas sobre un menor control de las crisis epilépticas, situación que se ha reproducido mediante la administración de megadosis de ácido fólico endovenoso, situación que no es habitual en la práctica clínica<sup>164</sup>.

Eros y cols.<sup>165</sup> informaron de la ausencia de efectos nocivos a causa de la administración periconcepcional de un polivitamínico con 0,8 mg de ácido fólico a 60 mujeres epilépticas, sin embargo, una de ellas que reinició la toma de polivitamínicos después del primer trimestre gestacional, pero con 1 mg de ácido fólico, desarrolló un status epilepticus y lupus eritematoso. La conclusión de este trabajo fue que las dosis a partir de 1 mg podían ser perjudiciales en pacientes con la barrera hematoencefálica lesionada, tal es el caso del lupus. Por otra parte, la información aportada por Drazkowski y cols.<sup>166</sup> sobre cuatro mujeres epilépticas en edad fértil que, tras la ingesta de suplementos con 4-5 mg de ácido fólico aislado, desarrollaron deficiencia clínica de B<sub>12</sub>, confirmada analítica y terapéuticamente, fundamenta la necesidad de recomendar dosis inferiores a 1 mg, de lo contrario correremos el riesgo de precipitar un déficit latente de cobalamina en este grupo de pacientes (sección 10.3.2). Como los estudios existentes hasta la fecha son insuficientes para respaldar un consejo en uno u otro sentido, la recomendación favorable a la ingesta de ácido fólico periconcepcional parte de opiniones de expertos<sup>167-8</sup>.

Los estudios de Czeizel y cols. sobre teratogenicidad de ciertos antibióticos toman como base de datos el “Hungarian Case-Control Surveillance of Congenital Abnormalities” que incluyó nacidos entre 1980 y 1996. Si bien el consumo de oxitetraciclina se relacionó con un aumento de DTNs entre las madres consumidoras durante el segundo mes de la gestación (OR=9,7, IC 95% 2,0-47,1)<sup>169</sup>, no se pudo encontrar una relación significativa con la toma de trimetoprim combinado con sulfonamidas durante la gestación<sup>170</sup>.

Un trabajo reciente<sup>171</sup> ha contribuido a despejar algunas de las incógnitas expresadas en los párrafos anteriores. El objetivo del mismo fue averiguar si la exposición a fármacos antagonistas del ácido fólico aumentaba el riesgo de tener un hijo con un DTN, y se acometió mediante el escrutinio de los datos procedentes de un estudio de casos y controles de defectos congénitos del Canadá y de los EE.UU. Se dispuso de información acerca de 1242 afectados de DTNs y de 6660 niños con malformaciones folato-resistentes<sup>171</sup>. Los principales resultados se detallan en la tabla 7.4.

**Tabla 7.4.- Uso de antagonistas de los folatos durante los dos primeros meses de la gestación y odds ratios de ser portadora de un feto con defecto del tubo neural.**

<i>Fármaco</i>	<i>Casos</i>		<i>Controles</i>		<i>OR ajustada</i>	<i>IC 95%</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>		
<b>Cualquier antifolato</b>	27	2,2	67	1,0	2,8	1,7-4,6
<b>Carbamazepina</b>	6	0,5	5	0,1	6,9	1,9-25,7
<b>Trimetoprim</b>	5	0,4	8	0,1	4,8	1,5-16,1
<b>Valproato*</b>	3	0,2	3	0,1	-	-

N (número de casos), OR (odds ratio), IC (intervalo de confianza).

\* Menos de cinco casos y controles expuestos, no se calcula OR.

Hemos visto que las ORs fueron significativas para el conjunto de los fármacos antifolato y para la carbamazepina y el trimetoprim aisladamente. El valproato contó con un número escaso de expuestos tanto en el grupo de casos como en el de controles, lo que impidió obtener resultados relevantes con respecto a este fármaco. Los

hallazgos más novedosos fueron el efecto protector de los folatos periconcepcionales diarios contra la teratogenicidad del trimetoprim o de la carbamazepina, y que éste ha sido el primer trabajo que ha hallado un aumento significativo de DTNs en gestantes que han consumido trimetoprim durante los dos primeros meses de embarazo, en contraposición al de Czeizel y cols.<sup>169</sup>.

También el efavirenz (Sustiva®), antirretroviral inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa, se ha visto implicado en la producción de mielomeningoceles. Los fabricantes del producto advirtieron de su contraindicación durante la gestación, a causa de las experiencias adversas en primates, filogenéticamente muy próximos a los humanos. Una cría de entre 20 monos cynomolgus gestantes expuestos a dosis equivalentes a los humanos nació con anencefalia, y otras dos crías exhibieron otras anomalías<sup>172</sup>. Hasta la fecha se han publicado dos casos de mielomeningoceles en gestantes expuestas a este fármaco durante la neurulación, ambos de ubicación sacra y con ventriculomegalia<sup>173-4</sup>.

## 7.3 Bibliografía

1. Definición y fines de la epidemiología. En: Jeniceck M, Cléroux R, editores. Epidemiología: Principios, técnicas, aplicaciones. 1ª ed. Barcelona: Salvat Editores, S.A.; 1987. p. 1-11.
2. McBride WG. Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet 1961;2:1358.
3. Lenz W. Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet 1961;1:45.
4. Cordero JF. Registries of birth defects and genetic diseases. Pediatr Clin North Am 1992;39:65-77.
5. Realización e interpretación de estudios descriptivos. Descripción de la enfermedad en la colectividad. En: Jeniceck M, Cléroux R, editores. Epidemiología: Principios, técnicas, aplicaciones. 1ª ed. Barcelona: Salvat Editores, S.A.; 1987. p. 77-100.
6. Martínez Navarro JF, Tello Anchuela O. La vigilancia epidemiológica. Rev San Hig Públ 1990;64:483-6.
7. Bermejo Sánchez E, Martínez Frías ML. Vigilancia epidemiológica de anomalías congénitas en el periodo 1980-1998 en España. Bol ECEMC: Rev Dismor Epidemiol 1999;IV(4):35-103.
8. ICBDMs. Home. Disponible en: URL: <http://www.icbd.org> (acceso 4/3/03).
9. EUROCAT. Home. Disponible en: URL: <http://www.eurocat.ulster.ac.uk/> (acceso 4/3/03).
10. EUROCAT. Member registries. Disponible en: URL: <http://www.eurocat.ulster.ac.uk/memberreg/memberreg.html> (acceso 4/3/03).
11. Salvador J, García-Miñaur S, Caballín MR, Mosquera C, Baena N, García López E, y cols. Registros poblacionales de defectos congénitos en España. An Esp Pediatr 1998;48:575-82.
12. Martínez-Frías ML, Gómez-Ullate J, Valdor C, Bermejo E. Significado de las cifras de frecuencia de defectos del tubo neural y de síndrome de Down en recién nacidos, corregidas y no corregidas por las interrupciones de la gestación tras el diagnóstico prenatal de esos defectos congénitos. Prog Obstet Ginecol 2000;43:403-9.
13. Martínez-Frías ML. Propuesta del Comité de Epidemiología de la SIADP. Creación en España de un registro nacional de interrupciones voluntarias del embarazo por malformaciones congénitas. Prog Diagn Pren 1995;7:198-200.
14. Hobbs CA, Hopkins SE, Simmons CJ. Sources of variability in birth defects prevalence rates. Teratology 2001;64 Suppl 1:S8-S13.
15. EUROCAT. Method. Disponible en: URL: <http://www.iph.fgov.be/eurocat/42.htm> (acceso 20/4/99).
16. Rothman KJ, Greenland S. Measures of disease frequency. En: Rothman KJ, editor. Modern Epidemiology. 2ª ed. Boston: Little, Brown and Company; 1998. p. 29-46.
17. EUROCAT. Report 8 Customised Tabulations. Disponible en: URL: <http://www.eurocat.ulster.ac.uk/pubdata/report8tab.html> (acceso 3/3/03).
18. Roberts HE, Moore CA, Cragan JD, Fernhoff PM, Khoury MJ. Impacto del diagnóstico prenatal sobre la prevalencia al nacimiento de defectos del tubo neural, Atlanta, 1990-1991. Pediatrics (ed. Esp.) 1995;40:279-282.
19. Probabilidad. En: Colton T, editor. Estadística en Medicina. 1ª ed. Barcelona: Ediciones Científicas y Técnicas, S.A.; 1979. p. 65-100.
20. Baird PA, Sadovnick AD. Survival in infants with anencephaly. Clin Pediatr (Phila) 1984;23:268-71.
21. Kalucy M, Bower C, Stanley F, Burton P. Survival of infants with neural tube defects in Western Australia 1966-1990. Paediatr Perinat Epidemiol 1994;8:334-51.
22. McDonnell RJ, Johnson Z, Delaney V, Dack P. East Ireland 1980-1994: epidemiology of neural tube defects. J Epidemiol Community Health 1999;53:782-8.
23. Murphy M, Seagroatt V, Hey K, O'Donnell M, Godden M, Jones N, Botting B. Neural tube defects 1974-94 – down but not out. Arch Dis Child 1996;75:F133-4.
24. Jorde LB, Fineman RM, Martin RA. Epidemiology of neural tube defects in Utah, 1940-1979. Am J Epidemiol. 1984;119:487-95.

25. Little L, Elwood JM. Epidemiology of neural tube defects. En: Kiley M, editor. *Reproductive and Perinatal Epidemiology*. Boston: CREC Press; 1991. p. 251-336.
26. Yen IH, Khoury MJ, Erickson JD, James LM, Waters GD, Berry RJ. The changing epidemiology of neural tube defects. United States, 1968-1989. *Am J Dis Child*. 1992;146:857-61.
27. International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems. Annual report 2000. Roma: International Centre for Birth Defects, 2000.
28. Xiao KZ. [Epidemiology of neural tube defects in China] [Artículo en chino]. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih* 1989;69:189-91.
29. Dolk H, De Wals P, Gillerot Y, Lechat MF, Ayme S, Cornel M, y cols. Heterogeneity of neural tube defects in Europe: the significance of site of defect and presence of other major anomalies in relation to geographic differences in prevalence. *Teratology* 1991;44:547-59.
30. Moore CA, Li S, Li Z, Hong S, Gu H, Berry RJ, y cols. Elevated rates of severe neural tube defects in a high prevalence area in northern China. *Am J Med Genet* 1997;73:113-8.
31. Abramsky K, Botting B, Chapple J, Stone D. Has advice on periconceptional folate supplementation reduced neural-tube defects? *Lancet* 1999;354:998-9.
32. Kadir RA, Sabin C, Whitlow B, Brockbank E, Economides D. Neural tube defects and periconceptional folic acid in England and Wales: retrospective study. *BMJ* 1999;319:92-3.
33. Rosano A, Smithells D, Cacciani L, Botting B, Castilla E, Cornel M, y cols. Time trends in neural tube defects prevalence in relation to preventive strategies: an international study. *J Epidemiol Community Health* 1999;53:630-5.
34. MRC Vitamin Study Group. Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991;338:131-7.
35. Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992;327:1832-5.
36. Olney RS, Mulinare J. Trends in neural tube defect prevalence, folic acid fortification, and vitamin supplement use. *Semin Perinatol* 2002;26:277-85.
37. Perdad VL, Van den Hof MC, Dubé JM, Zimmer P. Incidence of open neural tube defects in Nova Scotia after folic acid fortification. *CMAJ* 2002;167:241-5.
38. Ray JG, Meier C, Vermeulen MJ, Boss S, Wyatt PR, Cole DEC. Association of neural tube defects and folic acid food fortification in Canada. *Lancet* 2002;360:2047-8.
39. Boyd PA, Wellesley DG, De Walle HEK, Tenconi R, García-Miñaur S, Zandwijken GRJ, y cols. Evaluation of prenatal diagnosis of neural tube defects by fetal ultrasonographic examination in different centres across Europe. *J Med Screen* 2000;7:169-74.
40. Shaw GM, Malcoe LH, Croen LA, Smith DF. An assessment of error in parental occupation from the birth certificate. *Am J Epidemiol* 1990;131:1072-9.
41. Macdonell JE, Campbell H, Stone DH. Lead levels in domestic water supplies and neural tube defects in Glasgow. *Arch Dis Child* 2000;82:50-3.
42. Schnitzer PG, Olshan AF, Savitz DA, Erickson JD. Validity of mother's report of father's occupation in a study of paternal occupation and congenital malformations. *Am J Epidemiol* 1995;141:872-7.
43. Borman B, Cryer C. Fallacies of international and national comparisons of disease occurrence in the epidemiology of neural tube defects. *Teratology*. 1990;42:405-12.
44. Holmes LB, Driscoll SG, Atkins L. Etiologic heterogeneity of neural-tube defects. *N Engl J Med* 1976;294:365-9.
45. Khoury MJ, Erickson JD, James LM. Etiologic heterogeneity of neural tube defects: clues from epidemiology. *Am J Epidemiol* 1982;115:538-48.
46. Khoury MJ, Erickson JD, James LM. Etiologic heterogeneity of neural tube defects. II. Clues from family studies. *Am J Hum Genet* 1982;34:980-7.
47. Sever LE. Looking for causes of neural tube defects: where does the environment fit in? *Environ Health Perspect* 1995;103 Suppl 6:165-71.
48. Spina bifida incidence at birth-United States, 1983-1990. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1992;41:497-500.
49. Shaw GM, Jensvold NG, Wasserman CR, Lammer EJ. Epidemiologic characteristics of phenotypically distinct neural tube defects among 0.7 million California births, 1983-1987. *Teratology* 1994;49:143-9.
50. Hendricks KA, Simpson JS, Larsen RD. Neural tube defects along the Texas-Mexico border, 1993-1995. *Am J Epidemiol* 1999;149:1119-27.
51. Shaw GM, Carmichael SL, Nelson V. Congenital malformations in offspring of Vietnamese women in California, 1985-97. *Teratology* 2002;65:121-4.
52. Baird PA. Neural tube defects in the Sikhs. *Am J Med Genet* 1983;16:49-56.
53. Hall JG. Neural tube defects. Introduction. *Ciba Found Symp*. 1994;181:1-3; discusión 4-5.
54. Castilla EE, López-Camelo JS, Campana H. Altitude as a risk factor for congenital anomalies. *Am J Med Genet* 1999;86:9-14.
55. Bound JP, Harvey PW, Francis BJ. Seasonal prevalence of major congenital malformations in the Fylde of Lancashire 1957-1981. *J Epidemiol Community Health* 1989;43:330-42.
56. Castilla EE, Orioli IM, Lugarinho R, Dutra GP, López-Camelo JS, Campana HE, y cols. Monthly and seasonal variations in the frequency of congenital anomalies. *Int J Epidemiol* 1990;19:399-404.
57. Owen TJ, Halliday JL, Stone CA. Neural tube defects in Victoria, Australia: potential contributing factors and public health implications. *Aust N Z J Public Health* 2000;24:584-9.
58. Bound JP, Francis BJ, Harvey PW. Neural tube defects, maternal cohorts, and age: a pointer to aetiology. *Arch Dis Child* 1991;66:1223-6.
59. McIntosh GC, Olshan AF, Baird PA. Paternal age and the risk of birth defects in offspring. *Epidemiology* 1995;6:282-8.
60. Whiteman D, Murphy M, Hey K, O'Donnell M, Goldacre M. Reproductive factors, subfertility, and risk of neural tube defects: a case-control study based on the Oxford Record Linkage Study Register. *Am J Epidemiol* 2000;152:823-8.
61. Myriantopoulos NC, Melnick M. Studies in neural tube defects. I. Epidemiologic and etiologic aspects. *Am J Med Genet* 1987;26:783-96.
62. Canfield MA, Annegers JF, Brender JD, Cooper SP, Greenberg F. Hispanic origin and neural tube defects in Houston/Harris County, Texas. II. Risk factors. *Am J Epidemiol* 1996;143:12-24.

63. Todoroff K, Shaw GM. Prior spontaneous abortion, prior elective termination, interpregnancy interval, and risk of neural tube defects. *Am J Epidemiol* 2000;151:505-11.
64. Doyle PE, Beral V, Botting B, Wale CJ. Congenital malformations in twins in England and Wales. *J Epidemiol Community Health* 1991;45:43-8.
65. Mastroiacovo P, Botto L. Structural congenital defects in multiple births. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* 1994;43:57-70.
66. Riley MM, Halliday JL, Lumley JM. Congenital malformations in Victoria, Australia, 1983-95: an overview of infant characteristics. *J Paediatr Child Health* 1998;34:233-40.
67. Mastroiacovo P, Castilla EE, Arpino C, Botting B, Cocchi G, Goujard J, y cols. Congenital malformations in twins: an international study. *Am J Med Genet* 1999;83:117-24.
68. Ramos-Arroyo MA. Birth defects in twins: study in a Spanish population. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* 1991;40:337-44.
69. Khoury MJ, Erickson JD, Cordero JF, McCarthy BJ. Congenital malformations and intrauterine growth retardation: a population study. *Pediatrics* 1988;82:83-90.
70. Rasmussen SA, Moore CA, Paulozzi LJ, Rhodeniser EP. Risk for birth defects among premature infants: a population-based study. *J Pediatr* 2001;138:668-73.
71. Shaw GM, Savitz DA, Nelson V, Thorp JM Jr. Role of structural birth defects in preterm delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2001;15:106-9.
72. Mili F, Edmonds LD, Khoury MJ, McClearn AB. Prevalence of birth defects among low-birth-weight infants. A population study. *Am J Dis Child* 1991;145:1313-8.
73. Waller DK, Keddie AM, Canfield MA, Scheuerle AE. Do infants with major congenital anomalies have an excess of macrosomia? *Teratology* 2001;64:311-7.
74. Abrate M, Baracchini P, Fulcheri E, Lapertosa G, Pantarotto MF, Mastroiacovo P. Studio epidemiologico dell'encefalia in Italia e rilievi anatomopatologici sui casi di nostra osservazione. *Pathologica* 1990;82:133-54.
75. Källén B, Cocchi G, Knudsen LB, Castilla EE, Robert E, Daltveit AK, y cols. International study of sex ratio and twinning of neural tube defects. *Teratology* 1994;50:322-31.
76. David TJ, Nixon A. Congenital malformations associated with anencephaly and iniencephaly. *J Med Genet* 1976;13:263-5.
77. Rodríguez MM, Reik RA, Carreño TD, Fojaco RM. Cluster of iniencephaly in Miami. *Pediatr Pathol* 1991;11:211-21.
78. Dogan MM, Ekici E, Yapar EG, Soysal ME, Soysal SK, Gokmen O. Iniencephaly: sonographic-pathologic correlation of 19 cases. *J Perinat Med* 1996;24:501-11.
79. Kulaylat NA, Narchi H. Iniencephaly: An uncommon neural tube defect. *J Pediatr* 2000;136:414.
80. Jeanne-Pasquier C, Carles D, Alberti EM, Jacob B. Iniencephalie: à propos de 4 nouvelles observations et revue de la littérature. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2002;31:276-82.
81. James WH. The sex ratio in spina bifida. *J Med Genet* 1979;16:384-8.
82. Greene WB, Terry RC, DeMasi RA, Herrington RT. Effect of race and gender on neurological level in myelomeningocele. *Dev Med Child Neurol* 1991;33:110-7.
83. Seller MJ. Sex, neural tube defects, and multisite closure of the human neural tube. *Am J Med Genet* 1995;58:332-6.
84. Martínez-Frías ML, Parralo JA, Salvador J, Frías JL. Sex ratios in neural tube defects. *Lancet* 1986;ii:871-2.
85. Juriloff DM, Harris MJ. Mouse models for neural tube defects. *Hum Mol Genet* 2000;9:993-1000.
86. Genética de los trastornos con herencia multifactorial. En: Thompson MW, M, Willard HF, McInnes RR, editores. *Genética en Medicina*. 4ª ed. Barcelona: Masson; 1996. p. 337-50.
87. Main DN, Mennuti MT. Neural tube defects: issues in prenatal diagnosis and counselling. *Obstet Gynecol* 1986;67:1-15.
88. Wang Y, Wu Y, Zhou G, Xu C, Xiao K. [An estimate of recurrence risk for neural tube defects in China][Article in Chinese] *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 1996;27:196-8.
89. Byrne J, Cama A, Vigliarolo M, Levato L. Patterns of inheritance in Irish and Italian families with neural tube defects: comparison between high and low rate areas. *Ir Med J* 1997;90:32-4.
90. Carter CO, Evans KA, Till K. Spinal dysraphism: genetic relation to neural tube malformations. *J Med Genet* 1976;13:343-50.
91. Christakos AC, Simpson JL. Anencephaly in three siblings. *Obstet Gynecol* 1969;33:267-70.
92. Baraitser M, Burn J. Neural tube defects as an X-linked condition. *Am J Med Genet* 1984;17:383-385.
93. Jensson O, Arnason A, Gunnarsdottir H, Petursdottir I, Fossdal R, Hreidarsson S. A family showing apparent X linked inheritance of both anencephaly and spina bifida. *J Med Genet* 1988;25:227-229.
94. López-Olmos J, Pérez-Aytes A, Benac A, Urioste M, Prieto F. Encefalia en tres gestaciones consecutivas. Caso clínico y consideraciones sobre el asesoramiento genético. *Prog Diag Pre* 1994;6:263-6.
95. Hol FA, Schepens MT, van Beersum SEC, Redolfi E, Affer M, Vezzoni P, y cols. Identification and characterization of an Xq26-q27 duplication in a family with spina bifida and panhypopituitarism suggests the involvement of two distinct genes. *Genomics* 2000;69:174-181.
96. Little J, Elwood H. Socio-economic status and occupation. En: Elwood JM, Little J, Elwood H, editores. *Epidemiology and control of neural tube defects*. Oxford: Oxford University Press, 1992.
97. Wasserman CR, Shaw GM, Selvin S, Gould JB, Syme SL. Socioeconomic status, neighborhood social conditions, and neural tube defects. *Am J Public Health* 1998;88:1674-80.
98. Vrijheid M, Dolk H, Stone D, Abramsky L, Alberman E, Scott JE. Socioeconomic inequalities in risk of congenital anomaly. *Arch Dis Child* 2000;82:349-52.
99. Graham JM Jr, Edwards MJ, Edwards MJ. Teratogen update: gestational effects of maternal hyperthermia due to febrile illnesses and resultant patterns of defects in humans. *Teratology* 1998;58:209-21.
100. Miller P, Smith DW, Shepard TH. Maternal hyperthermia as a possible cause of anencephaly. *Lancet* 1978;1:519-21.
101. Shiota K. Neural tube defects and maternal hyperthermia in early pregnancy: epidemiology in a human embryo population. *Am J Med Genet* 1982;12:281-8.
102. Lynberg MC, Khoury MJ, Lu X, Cocian T. Maternal flu, fever, and the risk of neural tube defects: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol* 1994;140:244-55.
103. Shaw GM, Todoroff K, Velie EM, Lammer EJ. Maternal illness, including fever and medication use as risk factors for neural tube defects. *Teratology* 1998;57:1-7.

104. Botto LD, Erickson JD, Mulinare J, Lynberg MC, Liu Y. Maternal fever, multivitamin use, and selected birth defects: evidence of interaction? *Epidemiology* 2002;13:485-8.
105. Saxen L, Holmberg PC, Nurminen M, Kuosma E. Sauna and congenital defects. *Teratology* 1982;25:309-13.
106. Milunsky A, Ulcickas M, Rothman KJ, Willett W, Jick SS, Jick H. Maternal heat exposure and neural tube defects. *JAMA* 1992;268:882-5.
107. Becerra JE, Khoury MJ, Cordero JF, Erickson JD. Diabetes mellitus during pregnancy and the risks for specific birth defects: a population-based case-control study. *Pediatrics* 1990;85:1-9.
108. Janssen PA, Rothman I, Schwartz SM. Congenital malformations in newborns of women with established and gestational diabetes in Washington State, 1984-91. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1996;10:52-63.
109. Ramos-Arroyo MA, Rodríguez-Pinilla E, Cordero JF. Maternal diabetes: the risk for specific birth defects. *Eur J Epidemiol* 1992;8:503-8.
110. Aberg A, Westbom L, Källén B. Congenital malformations among infants whose mothers had gestational diabetes or preexisting diabetes. *Early Hum Dev* 2001;61:85-95.
111. Khoury MJ, Becerra JE, d'Almada PJ. Maternal thyroid disease and risk of birth defects in offspring: a population-based case-control study. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1989;3:402-20.
112. Waller DK, Mills JL, Simpson JL, Cunningham GC, Conley MR, Lassman MR, Rhoads GG. Are obese women at higher risk for producing malformed offspring? *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:541-8.
113. Werler MM, Louik C, Shapiro S, Mitchell AA. Prepregnant weight in relation to risk of neural tube defects. *JAMA* 1996;275:1089-92.
114. Shaw GM, Todoroff K, Carmichael SI, Schaffer DM, Selvin S. Lowered weight gain during pregnancy and risk of neural tube defects among offspring. *Int J Epidemiol*. 2001;30:60-5.
115. Feldman B, Yaron Y, Critchfield G, Leon J, O'Brien JE, Johnson MP, Evans MI. Distribution of neural tube defects as a function of maternal weight: no apparent correlation. *Fetal Diagn Ther* 1999;14:185-9.
116. Carmichael SL, Shaw GM. Maternal life event stress and congenital anomalies. *Epidemiology* 2000;11:30-5.
117. Blaasaas KG, Tynes T, Irgens A, Lie RT. Risk of birth defects by parental occupational exposure to 50 Hz electromagnetic fields: a population based study. *Occup Environ Med* 2002;59:92-7.
118. Khoury MJ, Holtzman NA. On the ability of birth defects monitoring to detect new teratogens. *Am J Epidemiol* 1987;126:136-43.
119. Mastroiacovo P, Bertollini R, Morandini S, Segni G. Maternal epilepsy, valproate exposure, and birth defects. *Lancet* 1983;ii:1499.
120. Martínez-Frías ML. Valproic acid and spina bifida. *Lancet* 1991;338:196-7.
121. Matte TD, Mulinare J, Erickson JD. Case-control study of congenital defects and parental employment in health care. *Am J Ind Med* 1993;24:11-23.
122. Blatter BM, Roeleveld N, Zielhuis GA, Gabreels FJ, Verbeek AL. Maternal occupational exposure during pregnancy and the risk of spina bifida. *Occup Environ Med* 1996;53:80-6.
123. Shaw GM, Wasserman CR, O'Malley CD, Nelson V, Jackson RJ. Maternal pesticide exposure from multiple sources and selected congenital anomalies. *Epidemiology* 1999;10:60-6.
124. Shaw GM, Velie EM, Katz EA, Morland KB, Schaffer DM, Nelson V. Maternal occupational and hobby chemical exposures as risk factors for neural tube defects [erratas aparecen en *Epidemiology* 1999;10:777]. *Epidemiology* 1999;10:124-9.
125. Brender J, Suárez L, Hendricks K, Baetz RA, Larsen R. Parental occupation and neural tube defect-affected pregnancies among Mexican Americans. *J Occup Environ Med* 2002;44:650-6.
126. Blatter BM, Hermens R, Bakker M, Roeleveld N, Verbeek AL, Zielhuis GA. Paternal occupational exposure around conception and spina bifida in offspring. *Am J Ind Med* 1997;32:283-91.
127. Kristensen P, Irgens LM, Andersen A, Bye AS, Sundheim L. Birth defects among offspring of Norwegian farmers, 1967-1991. *Epidemiology* 1997;8:537-44.
128. Shaw GM, Nelson V, Olshan AF. Paternal occupational group and risk of offspring with neural tube defects. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2002;16:328-33.
129. Irgens A, Kruger K, Skorve AH, Irgens LM. Reproductive outcome in offspring of parents occupationally exposed to lead in Norway. *Am J Ind Med* 1998;34:431-7.
130. Dawson EB, Evans DR, Harris WA, Van Hook JW. Amniotic fluid B12, calcium, and lead levels associated with neural tube defects. *Am J Perinatol* 1999;16:373-8.
131. Erickson JD, Mulinare J, McClain PW, Fitch TG, James LM, McClearn AB, Adams MJ Jr. Vietnam veterans' risks for fathering babies with birth defects. *JAMA* 1984;252:903-12.
132. Wolfe WH, Michalek JE, Miner JC, Rahe AJ, Moore CA, Needham LL, Patterson DG Jr. Paternal serum dioxin and reproductive outcomes among veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology* 1995;6:17-22.
133. Croen LA, Shaw GM, Sanbonmatsu L, Selvin S, Buffler PA. Maternal residential proximity to hazardous waste sites and risk for selected congenital malformations. *Epidemiology* 1997;8:347-54.
134. Dolk H, Vrijheid M, Armstrong B, Abramsky L, Bianchi F, Garne E, y cols. Risk of congenital anomalies near hazardous-waste landfill sites in Europe: the EUROHAZCON study. *Lancet* 1998;352:423-7.
135. Elliott P, Briggs D, Morris S, de Hoogh C, Hurt C, Jensen TK, y cols. Risk of adverse birth outcomes in populations living near landfill sites [erratas aparecen en *BMJ* 2001;323:1182]. *BMJ* 2001;323:363-8.
136. Cordier S, Bergeret A, Goujard J, Ha MC, Ayme S, Bianchi F, y cols. Congenital malformation and maternal occupational exposure to glycol ethers. Occupational Exposure and Congenital Malformations Working Group. *Epidemiology* 1997;8:355-63.
137. Thiersch JB. Therapeutic abortions with a folic acid antagonist 4-amino-pteroylglutamic acid administered by the oral route. *Am J Obstet Gynecol* 1952;63:1298-1304.
138. Goetsch C. An evaluation of aminopterin as an abortifacient. *Am J Obstet Gynecol* 1962;83:1474.
139. Warkany J, Beaudry PH, Hornstein S. Attempted abortion with aminopterin (4-aminopteroylglutamic acid). Malformations of the child. *Am J Dis Child* 1959;97:274.
140. Milunsky A, Graef JW, Gaynor MF Jr. Methotrexate-induced congenital malformations. *J Pediatr* 1968;72:790-5.
141. Robert E, Guibaud P. Maternal valproic acid and congenital neural tube defects [carta]. *Lancet* 1982;2:937.
142. Robert E. Valproic acid and spina bifida: a preliminary report. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1982;31:565-6.

143. Bjerkedal T, Czeizel A, Goujard J, Källén B, Mastroiacovo P, Nevin N, y cols. Valproic acid and spina bifida [carta]. *Lancet* 1982;2:1096.
144. Lindhout D, Meinardi H, Meijer WA, Nau H. Antiepileptic drugs and teratogenesis in two consecutive cohorts: change in prescription policy paralleled by changes in pattern of malformations. *Neurology* 1992;42(4 Suppl 5):94-110.
145. Lindhout D, Omtzigt JG, Cornel MC. Spectrum of neural-tube defects in 34 infants prenatally exposed to antiepileptic drugs. *Neurology* 1992;42(4 Suppl 5):111-8.
146. Van Allen MI, Kalousek DK, Chernoff GF, Juriloff D, Harris M, McGillivray BC, y cols. Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans. *Am J Med Genet* 1993;47:723-43.
147. Lindhout D, Schmidt D. In-utero exposure to valproate and neural-tube defects. *Lancet* 1986;2:1392-3.
148. Lammer E, Sever LE, Oakley GP Jr. Teratogen update: valproic acid. *Teratology* 1987;35:465-73.
149. Rosa FW. Spina bifida in infants of women treated with carbamazepine during pregnancy. *N Engl J Med* 1991;324:674-7.
150. Lindhout D, Hoppener RJ, Meinardi H. Teratogenicity of antiepileptic drug combinations with special emphasis on epoxidation (of carbamazepine). *Epilepsia* 1984;25:77-83.
151. Czeizel AE, Bod M, Halasz P. Evaluation of anticonvulsant drugs during pregnancy in a population-based Hungarian study. *Eur J Epidemiol* 1992;8:122-7.
152. Samren EB, van Duijn CM, Christiaens GC, Hofman A, Lindhout D. Antiepileptic drug regimens and major congenital abnormalities in the offspring. *Ann Neurol* 1999;46:739-46.
153. Matalon S, Schechtman S, Goldzweig G, Ornoy A. The teratogenic effect of carbamazepine: a meta-analysis of 1255 exposures. *Reprod Toxicol* 2002;16:9-17.
154. Omtzigt JG, Nau H, Los FJ, Pijpers L, Lindhout D. The disposition of valproate and its metabolites in the late first trimester and early second trimester of pregnancy in maternal serum, urine, and amniotic fluid: effect of dose, co-medication, and the presence of spina bifida. *Eur J Clin Pharmacol* 1992;43:381-8.
155. Nakane Y, Okuma T, Takahashi R, Sato Y, Wada T, Sato T, y cols. Multi-institutional study on the teratogenicity and fetal toxicity of antiepileptic drugs: a report of a collaborative study group in Japan. *Epilepsia* 1980;21:663-80.
156. Hendel J, Dam M, Gram L, Winkel P, Jorgensen I. The effects of carbamazepine and valproate on folate metabolism in man. *Acta Neurol Scand* 1984;69:226-31.
157. Wegner C, Nau H. Alteration of embryonic folate metabolism by valproic acid during organogenesis: implications for mechanism of teratogenesis. *Neurology* 1992;42(4 Suppl 5):17-24.
158. Wegner C, Nau H. Diurnal variation of folate concentrations in mouse embryo and plasma: the protective effect of folic acid on valproic-acid-induced teratogenicity is time dependent. *Reprod Toxicol* 1991;5:465-71.
159. Hansen DK, Grafton TF, Dial SL, Gehring TA, Siitonen PH. Effect of supplemental folic acid on valproic acid-induced embryotoxicity and tissue zinc levels in vivo. *Teratology* 1995;52:277-85.
160. Biale Y, Lewenthal H. Effect of folic acid supplementation on congenital malformations due to anticonvulsive drugs. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1984;18:211-6.
161. Ogawa Y, Kaneko S, Otani K, Fukushima Y. Serum folic acid levels in epileptic mothers and their relationship to congenital malformations. *Epilepsy Res* 1991;8:75-8.
162. Dansky LV, Rosenblatt DS, Andermann E. Mechanisms of teratogenesis: folic acid and antiepileptic therapy. *Neurology* 1992;42(4 Suppl 5):32-42.
163. Hiilesmaa VK, Teramo K, Granstrom ML, Bardy AH. Serum folate concentrations during pregnancy in women with epilepsy: relation to antiepileptic drug concentrations, number of seizures, and fetal outcome. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;287:577-9.
164. Ch'ien LT, Krumdieck CL, Scott CW Jr, Butterworth CE Jr. Harmful effect of megadoses of vitamins: electroencephalogram abnormalities and seizures induced by intravenous folate in drug-treated epileptics. *Am J Clin Nutr* 1975;28:51-8.
165. Eros E, Geher P, Gomor B, Czeizel AE. Epileptogenic activity of folic acid after drug induces SLE (folic acid and epilepsy). *Eur J Obstet Gynecol Reprod* 1998;80:75-8.
166. Drazkowski J, Sirven J, Blum D. Symptoms of B<sub>12</sub> deficiency can occur in women of child bearing age supplemented with folate. *Neurology* 2002;58:1572-3.
167. ACOG educational bulletin. Seizure disorders in pregnancy. Number 231, December 1996. Committee on Educational Bulletins of the American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* 1997;56:279-86.
168. Nulman I, Laslo D, Koren G. Treatment of epilepsy in pregnancy. *Drugs* 1999;57:535-44.
169. Czeizel AE, Rockenbauer M. A population-based case-control teratologic study of oral oxytetracycline treatment during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;88:27-33.
170. Czeizel AE, Rockenbauer M, Sorensen HT, Olsen J. The teratogenic risk of trimethoprim-sulfonamides: a population based case-control study. *Reprod Toxicol* 2001;15:637-46.
171. Hernández-Díaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Neural tube defects in relation to use of folic acid antagonists during pregnancy. *Am J Epidemiol* 2001;153:961-8.
172. Public Health Service Task Force Recommendations for Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant HIV-Infected Women for Maternal Health and Interventions to Reduce Perinatal HIV-1 Transmission in the United States. Disponible en: URL: [http://www.hivatis.org/guidelines/perinatal/May03\\_01/Safety\\_apr\\_01.pdf](http://www.hivatis.org/guidelines/perinatal/May03_01/Safety_apr_01.pdf) (Acceso 28/7/01).
173. Fundarò C, Genovese O, Rendeli C, Tamburini E, Salvaggio E. Myelomeningocele in a child with intrauterine exposure to efavirenz [Carta]. *AIDS* 2002;16:299-300.
174. De Santis M, Caraducci B, De Santis L, Cavaliere AF, Straface G. Periconceptional exposure to efavirenz and neural tube defects. *Arch Intern Med* 2002;162:355.



# **8 Defectos del tubo neural en la isla de Mallorca: repercusión de las prevenciones primaria y secundaria sobre sus cifras de frecuencia y características más destacadas**

## **8.1 Introducción**

Uno de los puntos de partida de este proyecto fue la impresión de que los defectos del tubo neural (DTNs) eran más prevalentes en la isla de Mallorca que en las poblaciones monitorizadas por los registros españoles. En 1997, época en que el diagnóstico prenatal de nuestra isla estaba centralizado en una consulta dependiente del Hospital Son Dureta, se visitaba aproximadamente una gestante portadora de un feto con DTN cada mes, aunque es importante señalar que también se atendían pacientes procedentes de Menorca, puesto que en aquella isla no se realizan interrupciones voluntarias de embarazo (IVEs) por malformación. En aquel año, la media diaria de partos en Mallorca era de unos 18<sup>1</sup>, por lo tanto, pronosticábamos una prevalencia total de alrededor de 1,5%, mientras que según los datos aportados por los registros españoles de base poblacional sólo en Asturias se superaba el 1%<sup>2</sup>.

El primer escollo con el que nos encontramos fue la falta de registro de defectos congénitos en nuestra isla. Sólo el ECEMC (Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas) monitoriza los nacimientos atendidos en el Hospital Verge de Monte Toro de Mahón<sup>3</sup>, pero el número de partos atendido en este centro es bajo y además las IVEs de las mujeres menorquinas se efectúan en nuestro centro, por lo que los datos del ECEMC referentes a nuestra Comunidad Autónoma no nos parecen representativos. No sólo desconocíamos la importancia cuantitativa absoluta de los DTNs, sino que también nos preguntábamos cuál era la importancia de los mismos con relación a otras anomalías. Además, los profesionales que atendíamos a las gestantes, observábamos que la toma de suplementos con ácido fólico crecía rápidamente entre nuestras pacientes, aunque la cronología de su ingesta no era la adecuada en muchas ocasiones (capítulo 11). Aunque la sensibilidad del cribado bioquímico universal se auditaba periódicamente, no conocíamos la contribución de la ecografía al diagnóstico de los DTNs, ni hasta qué punto el cribado y la ecografía se complementaban.

En este contexto nos propusimos:

- Averiguar la prevalencia total de los DTNs en nuestra isla y de otras malformaciones mayores presentes en la mayoría de registros (cardiopatías, aneuploidías, etc.).
- Comparar los datos obtenidos referentes a los DTNs con los de los registros españoles de base poblacional.

- Estudiar la repercusión de las estrategias preventivas sobre sus cifras de frecuencia.
- Conocer las principales características (clínicas, sociodemográficas, diagnósticas, preventivas, terapéuticas) de los DTNs nacidos en nuestra isla y de sus madres.

En el capítulo 7 se exponen una serie de conceptos epidemiológicos y factores moduladores de la frecuencia de los DTNs que son de ayuda para entender las razones que subyacen al planteamiento de las distintas secciones de este capítulo.

## **8.2 Prevalencias totales de los defectos del tubo neural en la isla de Mallorca y comparación con las prevalencias de una selección de anomalías congénitas y las de los registros españoles de base poblacional**

### **8.2.1 Material y métodos**

La población diana de este estudio son los casos incluidos en las siguientes categorías de la novena revisión de la CIE-OMS (Clasificación Internacional de Enfermedades de la Organización Mundial de la Salud), cuyo código se ha especificado entre paréntesis: DTNs (740-742.0), cardiopatías congénitas (745-747.49), anomalías del tracto digestivo salvo estenosis pilórica (750-751.9, salvo 750.5), anomalías congénitas del aparato urinario (753-753.9), reducción de extremidades (755.2-755.4), anomalías de la pared abdominal (756.7) y cromosomopatías totales (758-758.9). La antedicha selección de anomalías obedece fundamentalmente a la concurrencia de los siguientes criterios: malformación mayor, susceptible de manejo en centro de referencia, y con diagnóstico postnatal típicamente precoz.

Los casos recogidos corresponden a los nacimientos de fetos vivos o muertos de más de 20 semanas de gestación y a las interrupciones voluntarias de embarazo (IVEs) acontecidos entre el uno de enero de 1990 y el 31 de diciembre de 1999 (hasta el 31 de diciembre de 2001 para los DTNs), y que cuentan con historia clínica abierta en el Hospital Universitario Son Dureta y/o en el Hospital de Manacor, siempre y cuando las madres residan en Mallorca. El primer centro es el de referencia para toda la Comunitat Autònoma Illes Balears y el segundo es un centro hospitalario comarcal. La recogida de datos se ha prolongado hasta el 31 de julio de 2001, salvo para los DTNs que se ha extendido hasta el 31 de diciembre de 2002. El periodo de detección para los defectos seleccionados ha sido de un año, salvo para las reducciones de extremidades que se ha prolongado hasta los 19 meses de vida, con el fin de captar aquellos casos operados más tardíamente. El objetivo de los mencionados lapsos es minimizar las pérdidas a causa de nacimientos en otros centros sanitarios y

obtener indicadores de ámbito poblacional. Con referencia a los DTNs, sólo hemos recogido los abiertos y otros, no necesariamente abiertos, diagnosticados en el seno de cuadros con anomalías múltiples, ya que estas modalidades son las que constan habitualmente en los registros de malformaciones. La información se ha recabado a partir de:

- Listas de pacientes con los diagnósticos correspondientes a los códigos 635 (aborto legalmente inducido), 656.4 (muerte intrauterina) y 740-759 (malformaciones congénitas) de la novena revisión de la CIE aportados por las Unidades de Documentación Clínica de los Hospitales Son Dureta y de Manacor.
- Informes de alta hospitalaria o de consultas externas que se han revisado en todos los casos en los que se había redactado. Destacamos que el 100% de las altas hospitalarias tienen informe realizado y codificado, mientras que las de consultas externas lo tienen en una proporción variable. Según nuestra experiencia de recogida de datos, el número de pacientes captados a partir de los informes de consultas externas es mínimo, puesto que la gravedad de las malformaciones seleccionadas obligó al ingreso de prácticamente todos los pacientes.
- Historias clínicas que se han consultado si había dudas o inconcreciones diagnósticas.
- Libros de partos del Hospital Universitario Son Dureta. Éstos incluyen los nacimientos atendidos en nuestro centro durante el segundo y tercer trimestres de embarazo.
- Registro de Mortalidad Perinatal del Hospital Universitario Son Dureta, que recoge defunciones fetales a partir de 500 gramos.
- Lista de resultados de citogenética de líquidos amnióticos, vellosidades coriales y sangre periférica del Servicio de Genética del Hospital Universitario Son Dureta que, a su vez, estudia también el material remitido del Hospital de Manacor.
- Registro de IVEs realizadas en el Hospital Universitario Son Dureta y copias de los cuestionarios de notificación que se cumplimentan obligatoriamente para cada caso, y se remiten a la Dirección General de Salud Pública y Consumo del Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Informes de necropsias. Resaltamos que todas las IVEs son objeto del mencionado estudio anatomopatológico.
- Tablas de defunciones perinatales del IBAE (Institut Balear d'Estadística) según causa de muerte, edad y sexo en la isla de Mallorca<sup>1</sup>. La codificación de las causas ha hecho posible el escrutinio de la cobertura del registro. Durante el periodo estudiado, únicamente no se ha podido identificar un varón fallecido en 1995, durante las primeras 24 horas del periodo neonatal a causa de una cardiopatía congénita. Para el resto de los casos incluidos en este trabajo, se pudo establecer una correspondencia exacta con cada defunción identificada por el IBAE.

Como se puede apreciar, se han escogido fuentes de información con alto grado de solapamiento para reducir al máximo las omisiones y, por lo tanto, evitar el subregistro de las enfermedades que nos ocupan. Por otra parte, la obtención de datos para este estudio se ha visto enormemente facilitada a causa de varias circunstancias excepcionales en cualquier registro de defectos congénitos: la única Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales y el único Servicio de Cirugía Infantil para todo el archipiélago balear están ubicados en el centro en el que trabaja la autora de la tesis, los dos cardiólogos pediátricos que trabajan en nuestro Hospital son los únicos de Mallorca. Además, sólo el Hospital de Manacor y nuestro centro han sido los únicos autorizados para la práctica de IVEs eugenésicas en nuestra isla hasta 2002. Los dos centros privados que también realizan IVEs están habilitados para practicarlas únicamente hasta las 12 semanas de gestación, y de acuerdo con la información de la que disponemos, las efectuadas en dichos establecimientos no obedecen a detección prenatal de malformaciones; al contrario, la atención al parto se desarrolla en cinco maternidades distintas, dos públicas y tres privadas. Durante el decenio 1990-99, 39 633 de 65 468 nacimientos de hijos de residentes en Mallorca (60,5%)<sup>1</sup> fueron atendidos en el sector sanitario público.

Estimamos que la cobertura de los defectos congénitos incluidos en esta investigación es superior al 90%, dada la coyuntura favorable anteriormente especificada; por consiguiente, los datos se refieren a la isla de Mallorca, con un área geográfica controlada de 3640 Km<sup>2</sup>, con 658 043 habitantes según la revisión del Padrón de 1999 y con un promedio de 6711 partos anuales en el transcurso del intervalo 1990-2001<sup>1</sup>.

Puesto que consideramos fundamental no sólo el seguimiento evolutivo de los datos referentes a los DTNs de Mallorca, sino también su comparabilidad con los registros poblacionales españoles, hemos seguido las directrices para el cálculo de la prevalencia de los defectos congénitos del EUROCAT (European Registration of Congenital Anomalies and Twins)<sup>4</sup>. El indicador elegido es la prevalencia total (incluye los casos nacidos vivos o muertos o IVEs divididos por los nacidos totales en la población). Los periodos de comparación establecidos son quinquenales (1990-94 frente a 1995-99) al tener en cuenta los datos del EUROCAT, y cuatrienales (1990-93, 1994-97 y 1998-2001) si sólo consideramos los datos mallorquines. Ello se debe a que los datos del EUROCAT disponibles en la red alcanzan hasta 1999<sup>2</sup>, a que nuestro lapso de observación para Mallorca es de 12 años, y a que la instauración del cribado bioquímico universal (alfafetoproteína (AFP),  $\beta$ -HCG y edad materna) fue en 1993. Entonces, la vigilancia antes y después de 1994 nos permite valorar de forma indirecta el efecto del cribado sobre la prevalencia de los DTNs.

La prueba de  $\chi^2$  y la exacta de Fisher se han utilizado para comparar proporciones, también se ha utilizado la distribución de Poisson para calcular los intervalos de confianza del 95% de las prevalencias. Las diferencias entre las prevalencias de Mallorca y de los registros mencionados se han expresado en odds ratios (ORs), cuyo intervalo de confianza se ha calculado según el método de Miettinen.

Como características comunes a los métodos utilizados en este capítulo destacamos el nivel de significación estadística del 5% ( $p < 0,05$ ) y el tratamiento informático de los datos por medio de los programas SPSS 8.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE.UU.) y Excel 7.0 (Microsoft, Redmond, Washington, EE.UU.).

## 8.2.2 Resultados

En la tabla 8.1, se detallan las prevalencias totales de las agrupaciones de defectos congénitos más frecuentes. Observamos que la mayoría de los defectos representados en esta tabla son conjuntos de anomalías que afectan a un mismo sistema orgánico, entonces, si el tema de esta tesis no se centrara en los DTNs hubiera sido más adecuado encuadrar a estos últimos dentro de anomalías del sistema nervioso. A pesar de la pérdida de importancia cuantitativa derivada de la clasificación de nuestros datos, el peso de los DTNs sigue siendo destacado. Entonces, los DTNs tienen una prevalencia total media del 13,14 por 10 000 nacidos en la última década, ocupando el quinto lugar en frecuencia, por detrás de las cardiopatías congénitas (52,70 por 10 000), las anomalías del aparato urinario (26,88), las cromosomopatías (26,88) y las anomalías digestivas exceptuando la estenosis hipertrófica del píloro (14,82).

En las tablas 8.2 y 8.3, se muestra la prevalencia total de los DTNs y de sus tipos, en el intervalo 1990-2001. En el periodo mencionado, no ha habido ningún diagnóstico de iniencefalia. La prevalencia total anual máxima de DTNs totales tuvo lugar en 1994 (18,25 por 10 000 nacidos) y la mínima fue en 1993 con 7,92 casos por 10 000 nacidos. Para la anencefalia la cifra máxima pertenece a 2001 (12,66 por 10 000) y la mínima a 1990 (2,90), mientras que para la espina bífida dichos valores son de 13,27 para 1994 y 3,27 para 1995 respectivamente. Con respecto al encefalocele, destacamos que durante cinco años (1991, 1993, 1994, 1999 y 2000) no se detectó ningún caso y que se alcanzó el valor máximo de prevalencia total (3,27) en 1995. Apreciamos que en el lapso considerado el DTN más prevalente es la anencefalia (46%), seguida de cerca por la espina bífida (45%). Según se puede apreciar en la tabla 8.3, no hemos hallado diferencias significativas entre las prevalencias cuatrienales ni de los DTNs agrupados, ni de sus tipos. Por otra parte, las cifras de la tabla anterior se han representado en un gráfico de líneas (figura 8.1), en el que se objetiva una tendencia ascendente para la anencefalia y levemente descendente para la espina bífida.

La tabla 8.4 nos muestra los resultados de las comparaciones entre las prevalencias totales de DTNs entre Mallorca y los registros españoles incluidos. En esta ocasión, la referencia es Mallorca, de forma que si la OR tiene un valor superior a uno, el registro comparado con Mallorca exhibe una prevalencia superior a nuestra isla y viceversa. No hemos detectado diferencias significativas entre la prevalencia total de DTNs en Mallorca y los registros españoles incluidos en el quinquenio 1990-94, mientras que en el lapso 1995-99, la prevalencia en Mallorca es significativamente superior a la de Barcelona. En el primer quinquenio Mallorca tiene la segunda prevalencia total más alta (12,85 por 10 000) después de Asturias (13,96), pero en el segundo Mallorca (13,50) ya aventaja a Asturias (12,05).

**Tabla 8.1.- Números absolutos y prevalencias totales (por 10 000) de una selección de anomalías congénitas en Mallorca durante el decenio 1990-99.**

Grupo de anomalías y código CIE-9	Número absoluto y prevalencias totales (por 10 000) anuales										1990-99*
	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	
<i>Cardiopatías congénitas</i> (745-747.49)	26 37,70	30 43,50	36 53,64	27 42,79	31 51,42	35 57,14	36 58,38	42 64,44	38 56,78	44 61,78	345 52,70 (47,28-58,56)
<i>Anomal. aparato urinario</i> (753-753.9)	16 23,20	13 18,85	17 25,33	16 25,36	12 19,90	12 19,59	24 38,92	23 35,29	21 31,38	22 30,89	176 26,88 (23,06-31,16)
<i>Cromosomopatías</i> (758-758.9)	13 18,85	10 14,50	15 22,35	11 17,43	16 26,54	22 35,92	20 32,43	28 42,96	24 35,86	17 23,87	176 26,88 (23,06-31,16)
<i>Anomal. tr. digest. salvo est. pilór. (750-751.9 salvo 750.5)</i>	10 14,50	7 10,15	10 14,90	7 11,09	7 11,61	10 16,33	8 12,97	9 13,81	17 25,40	12 16,85	97 14,82 (12,02-18,07)
<i>DTNs</i> (740-742.0)	8 11,60	8 11,60	10 14,90	5 7,92	11 18,25	9 14,69	7 11,35	9 13,81	11 16,44	8 11,23	86 13,14 (10,51-16,22)
<i>Reducción extremidades</i> (755.2-755.4)	4 5,80	7 10,15	2 2,98	3 4,75	2 3,32	3 4,90	3 4,86	4 6,14	6 8,96	3 4,21	37 5,65 (3,98-7,79)
<i>Celosomías (onfalocele, gastrosquisis, prune belly)</i> (756.7)	2 2,90	3 4,35	5 7,45	5 7,92	5 8,29	1 1,63	4 6,49	4 6,14	1 1,49	2 2,81	32 4,89 (3,34-6,90)
<i>Nacidos totales</i>	6897	6896	6711	6310	6029	6125	6167	6518	6693	7122	65 468

CIE-9 (9ª Clasificación Internacional de Enfermedades de la Organización Mundial de la Salud).

\* Número absoluto, prevalencia total media (intervalo de confianza del 95% según Poisson).

**Tabla 8.2.- Números absolutos y prevalencias totales (por 10 000) anuales de los defectos del tubo neural y de sus tipos en Mallorca durante los años 1990-2001.**

Tipos y código CIE-9	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
<i>DTNs totales</i> (740-742.0)	8 11,60	8 11,60	10 14,90	5 7,92	11 18,25	9 14,69	7 11,35	9 13,81	11 16,44	8 11,23	8 10,66	13 16,45
<i>Anencefalia</i> (740-740.2)	2 2,90	3 4,35	3 4,47	2 3,17	3 4,98	5 8,16	3 4,86	4 6,14	4 5,98	5 7,02	5 6,66	10 12,66
<i>Encefalocele</i> (742.0)	1 1,45	0 0,00	1 1,49	0 0,00	0 0,00	2 3,27	1 1,62	1 1,53	2 2,99	0 0,00	0 0,00	2 2,53
<i>Espina bífida</i> (741-741.9)	5 7,25	5 7,25	6 8,94	3 4,75	8 13,27	2 3,27	3 4,86	4 6,14	5 7,47	3 4,21	3 4,00	1 1,27
<i>Nacidos totales</i>	6897	6896	6711	6310	6029	6125	6167	6518	6693	7122	7502	7901

CIE-9 (9ª Clasificación Internacional de Enfermedades de la Organización Mundial de la Salud).

Como se puede observar en la tabla 8.5, el quinquenio 1990-94 es la referencia en nuestros cálculos, de forma que si el valor de la OR es superior a uno, la prevalencia total en el lapso 1995-99 es superior y viceversa. Del análisis estadístico realizado, se infiere que, para los DTNs considerados globalmente, la tendencia en los registros de base poblacional españoles y en Mallorca es hacia la estabilización de las cifras de frecuencia, puesto que entre las proporciones de los dos quinquenios incluidos no hay diferencias significativas. Sin embargo, las ORs puntuales para los DTNs totales son inferiores a uno salvo en el caso de Mallorca, lo cual nos indica que si se

mantienen estas tendencias al descenso, los cambios serán significativos a medio plazo en los registros españoles considerados. Para la anencefalia, las tendencias quinquenales, aunque no son estadísticamente significativas, van hacia el descenso en Asturias y en Barcelona, mientras que ascienden en el País Vasco y en Mallorca. Con respecto a la espina bífida, sus prevalencias han bajado en todas las poblaciones consideradas entre los dos lapsos estudiados, aunque el cambio no es significativo. La proporción de encefaloceles ha aumentado en Asturias, Barcelona y Mallorca, además, el incremento fue significativo para Barcelona. El número de espinas bífidas supera a la anencefalia en Asturias y Mallorca para el decenio 1990-99. Al contrario, Barcelona y el País Vasco cuentan con más anencefalias que espinas bífidas entre los DTNs contabilizados. Por consiguiente, los valores de las ratios anencefalia/espina bífida son: 86,4 (38/44) para Asturias, 144,1 (49/34) para Barcelona, 109,4 (70/64) para el País Vasco y 77,3 (34/44) para Mallorca. Si comparamos la ratio de Mallorca con el resto obtenemos valores de p no significativos para Asturias ( $p=0,723$ ) y País Vasco ( $p=0,224$ ), y en el límite de la significación estadística para Barcelona ( $p=0,050$ ).

**Tabla 8.3.- Números absolutos y prevalencias totales (por 10 000) cuatrienales de los defectos del tubo neural y de sus tipos en Mallorca durante los años 1990-2001.**

<b>Tipos y código CIE-9</b>	<b>1990-93</b>	<b>1994-97</b>	<b>1998-2001</b>	<b>p*</b>	<b>TOTALES**</b>
<i>DTNs totales (740-742.0)</i>	31 11,56	36 14,49	40 13,69	0,634	107 13,23 (10,84-15,99)
<i>Anencefalia (740-740.2)</i>	10 3,73	15 6,04	24 8,21	0,098	49 6,06 (4,48-8,01)
<i>Encefalocele (742.0)</i>	2 0,75	4 1,61	4 1,37	0,656	10 1,24 (0,59-2,27)
<i>Espina bífida (741-741.9)</i>	19 7,09	17 6,84	12 4,11	0,274	48 5,94 (4,38-7,87)
<i>Nacidos totales</i>	26 814	24 839	29 218		80 871

CIE-9 (9ª Clasificación Internacional de Enfermedades de la Organización Mundial de la Salud).

\* Comparación de los tres cuatrienios por medio de la prueba de  $\chi^2$ .

\*\* Datos referentes al intervalo 1990-2001. Número absoluto, prevalencia total media (intervalo de confianza del 95% según Poisson).

### **8.3 Repercusión de la prevención primaria sobre las cifras de frecuencia de las anomalías del tubo neural**

### 8.3.1 Material y métodos

La evolución a lo largo del tiempo de la prevalencia total nos permite evaluar la repercusión de la prevención primaria sobre un defecto congénito. En el supuesto de los DTNs, estas cifras también se hallan influidas, aunque de forma menos intensa, por las estrategias de detección precoz (es decir, la detección de las anomalías congénitas antes de que se resuelvan espontáneamente en forma de aborto o muerte anteparto aumenta de forma artificial las cifras de prevalencia total). A los datos de la sección 8.2.1 hemos añadido la información acerca del consumo de especialidades farmacéuticas con folatos proporcionado por la Cooperativa d'Apotecaris, entidad que media en las ventas de aproximadamente el 80% de fármacos extrahospitalarios en nuestra isla. Hemos comparado ambas series de datos mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

**Tabla 8.4.- Números absolutos, prevalencias totales y odds ratios de los defectos del tubo neural en los quinquenios 1990-94 y 1995-99 tomando como referencia a la población mallorquina.**

Quinquenio	Número de casos, nacidos totales, prevalencia total (por 10 000) y ORs (intervalo de confianza del 95%) en los registros de			
	<i>Asturias</i>	<i>Barcelona</i>	<i>País Vasco</i>	<i>Mallorca</i>
<i>1990-94</i>	51 36 527 13,96 1,09 (0,73-1,64)	37 38 824 9,53 0,74 (0,48-1,16)	89 80 293 11,08 0,87 (0,60-1,25)	42 32 843 12,79 1
<i>1995-99</i>	39 32 370 12,05 0,89 (0,58-1,37)	<b>53</b> <b>60 424</b> <b>8,77</b> <b>0,65</b> <b>(0,44-0,97)</b>	62 64 023 9,68 0,72 (0,49-1,05)	44 32 625 13,49 1

ORs (odds ratios). Los valores estadísticamente significativos se han destacado en negrita.

### 8.3.2 Resultados

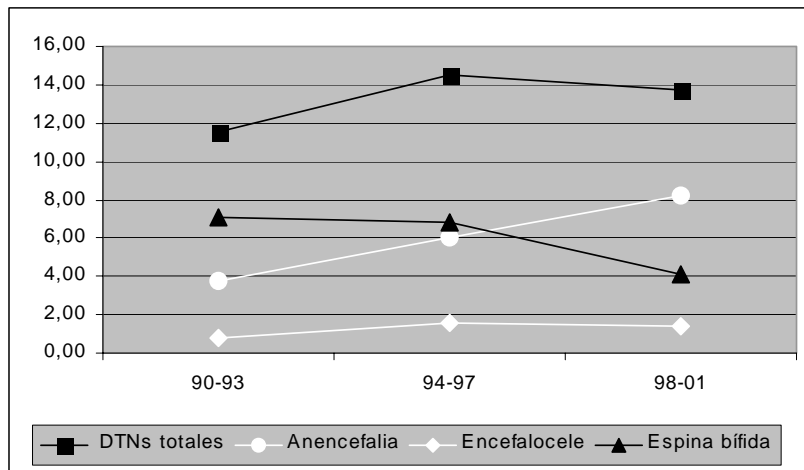
En la figura 8.2 se objetiva un crecimiento progresivo del número de especialidades con folatos con el paso del tiempo, también se aprecia la ausencia de correlación entre las tendencias de las prevalencias totales de los DTNs y las ventas de fármacos con ácido fólico ( $r=0,038$ ), esto es, el incremento de venta de folatos no se traduce en una disminución de la prevalencia total de las anomalías que nos ocupan.

En la tabla 8.6 se representan el número de especialidades dispensadas a las farmacias por la Cooperativa d'Apotecaris en el intervalo 1995-2001 y el principio activo de las mismas. Según se detalla en esta tabla, la especialidad prescrita con mayor frecuencia en todos los años considerados es el ácido fólico 5 mg, mientras que para el resto de especialidades las proporciones son bajas y tienden al descenso,



que ha sido especialmente acusado para el ácido fólico de más de 1 mg (41,2% de todas las especialidades vendidas en 1996 frente a 10,5% en 2001). En 2000 irrumpe en el mercado la especialidad con 0,4 mg de ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub>, y en 2001 ya es la segunda más vendida (25,4% de las especialidades con folatos).

**Figura 8.1.- Prevalencias totales (por 10 000) cuatrienales de los defectos del tubo neural y de sus tipos en Mallorca durante el lapso 1990-2001.**



## 8.4 Repercusión de la prevención secundaria sobre las cifras de frecuencia de las anomalías del tubo neural

### 8.4.1 Material y métodos

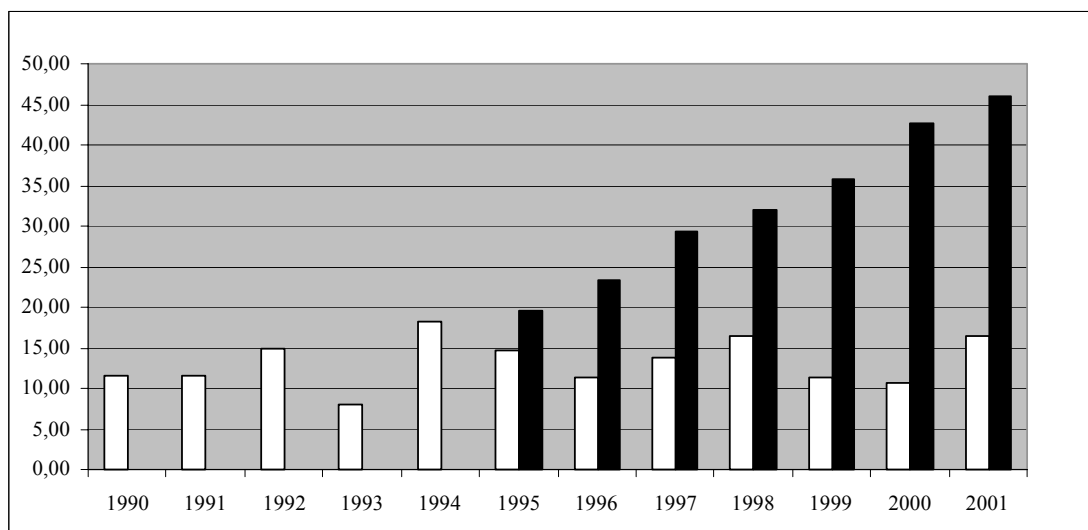
Para averiguar el impacto de la prevención secundaria sobre la prevalencia de las anomalías que nos ocupan, hemos utilizado la proporción de abortos inducidos por DTN (numerador con abortos inducidos a causa de DTN y denominador con nacidos totales e IVEs con esta misma malformación). Las pruebas de  $\chi^2$  y exacta

**Tabla 8.5.- Comparación de las prevalencias totales de los defectos del tubo neural y de sus tipos entre los quinquenios 1990-94 y 1995-99 en los registros poblacionales estatales y en Mallorca.**

Registro y tipo de DTN		Número absoluto, prevalencia total media (por 10 000), odds ratio e intervalo de confianza del 95%		p
		1990-94	1995-99	
<b>Asturias (RDCA)*</b>	<b>DTNs totales</b>	51 13,96 1	39 12,05 0,86 (0,55-1,31)	0,487
	<b>Anencefalia</b>	21 5,75 1	17 5,25 0,91 (0,48-1,73)	0,781
	<b>Espina bífida</b>	28 7,67 1	16 4,94 0,64 (0,35-1,19)	0,158
	<b>Encefalocele</b>	2 0,55 1	6 1,85 3,39 (0,75-15,26)	0,112
	<b>Nacidos totales</b>	36 527	32 370	
<b>Barcelona (REDCB)*</b>	<b>DTNs totales</b>	37 9,53 1,00	53 8,77 0,92 (0,60-1,40)	0,698
	<b>Anencefalia</b>	21 5,41 1,00	28 4,63 0,86 (0,49-1,51)	0,592
	<b>Espina bífida</b>	16 4,12 1,00	18 2,98 0,72 (0,37-1,41)	0,343
	<b>Encefalocele</b>	0 0,00 1,00	7 1,16 44,98 (1,20-1 684,86)	<b>0,048</b> ↑
	<b>Nacidos totales</b>	38 824	60 424	
<b>País Vasco (RACAV)*</b>	<b>DTNs totales</b>	89 11,08 1,00	62 9,68 0,87 (0,63-1,21)	0,414
	<b>Anencefalia</b>	38 4,73 1,00	32 5,00 1,06 (0,66-1,69)	0,820
	<b>Espina bífida</b>	39 4,86 1,00	25 3,90 0,80 (0,49-1,33)	0,393
	<b>Encefalocele</b>	12 1,49 1,00	5 0,78 0,52 (0,19-1,46)	0,215
	<b>Nacidos totales</b>	80 293	64 023	
<b>Mallorca</b>	<b>DTNs totales</b>	42 12,79 1,00	44 13,49 1,05 (0,69-1,61)	0,805
	<b>Anencefalia</b>	13 3,96 1,00	21 6,44 1,63 (0,82-3,23)	0,164
	<b>Espina bífida</b>	27 8,22 1,00	17 5,21 0,63 (0,35-1,16)	0,137
	<b>Encefalocele</b>	2 0,61 1,00	6 1,84 3,02 (0,66-13,83)	0,154
	<b>Nacidos totales</b>	32 843	32 625	

Los valores estadísticamente significativos se han destacado en negrita. \* RDCA (Registro de Defectos Congénitos de Asturias), REDCB (Registro de Defectos Congénitos de Barcelona), RACAV (Registro de Anomalías Congénitas de la Comunidad Autónoma Vasca).

**Figura 8.2.- Prevalencias totales de los defectos del tubo neural y ventas de especialidades con folatos durante el periodo 1990-2001.**



Las barras blancas representan la prevalencia total anual de los DTNs (por 10 000) y las negras las ventas anuales de especialidades farmacéuticas con ácido fólico o folínico en unidades de millar (datos de la Cooperativa d'Apotecaris).

de Fisher han permitido la comparación de las distintas proporciones y su elección se ha fundamentado en el número de efectivos esperados. Los intervalos de confianza de las diferencias entre las proporciones se han calculado con la ayuda del programa Confidence Interval Analysis 2.0.0 (BMJ Books, Bristol, Reino Unido).

**Tabla 8.6.- Especialidades farmacéuticas con folatos dispensadas en Mallorca entre 1995 y 2001 según datos de la Cooperativa d'Apotecaris.**

ESPECIALIDAD FARMACÉUTICA	AÑO Y NÚMERO DE ESPECIALIDADES DISPENSADAS						
	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Ácido fólico, 5 mg	9643 (49,2%)	11 570 (49,4%)	15 771 (53,8%)	22 576 (70,6%)	28 495 (79,7%)	35 619 (83,7%)	27 944 (60,8%)
Ácido fólico, 10 mg	711 (3,6%)	551 (2,4%)	539 (1,8%)	565 (1,8%)	601 (1,7%)	650 (1,5%)	805 (1,8%)
Ácido folínico, 1 mg	1635 (8,3%)	1656 (7,1%)	1458 (5,0%)	1067 (3,3%)	991 (2,8%)	749 (1,8%)	735 (1,6%)
Ácido folínico, más de 1 mg	7623 (38,9%)	9652 (41,2%)	11 564 (39,4%)	7782 (24,3%)	5669 (15,9%)	5514 (13,0%)	4832 (10,5%)
Ácido fólico, 0,4 mg y vitamina B <sub>12</sub>	-	-	-	-	-	37 (0,1%)	11 662 (25,4%)
<b>TOTAL UNIDADES</b>	19 612 (100%)	23 429 (100%)	29 332 (100%)	31 990 (100%)	35 756 (100%)	42 569 (100%)	45 978 (100%)

## **8.4.2 Resultados**

La tabla 8.7 sintetiza la progresión de la prevención secundaria en los distintos registros españoles y en Mallorca. Hemos escogido como punto de corte el año 1993 (cribado bioquímico universal). En los registros incluidos, sólo en Asturias se utiliza el cribado con AFP en suero materno (SM), mientras que en Barcelona y el País Vasco el cribado poblacional no está instituido<sup>5</sup>. Las proporciones máximas de IVEs para los DTNs totales pertenecen a Asturias (81% en 1990-93 y 83% en 1994-99) y las mínimas a Mallorca (55% en 1990-93) y Barcelona (70% en 1994-99). Menos del 90% de acráneos son objeto de interrupción gestacional en Asturias durante 1990-93 (88%) y en Barcelona en 1994-99 (82%), mientras que los valores máximos pertenecen al País Vasco para 1990-93 (97%) y a Asturias para 1994-99 (95%). Las proporciones de IVEs de los fetos con espina bífida son inferiores en todos los casos y alcanzan sus valores máximos en Asturias (75% en ambos intervalos) y los mínimos en Mallorca durante 1990-93 (32%) y el País Vasco durante 1994-99 (50%). Con relación al encefalocele las cifras son muy variables y oscilan entre el 10% de interrupciones en el País Vasco en 1990-93 y el 100% de Mallorca durante el mismo periodo y del País Vasco en 1994-99. Por último, apreciamos que la proporción de IVEs de DTNs ha aumentado significativamente en el País Vasco y en Mallorca. Si desglosamos los valores de estas razones entre las distintas modalidades de DTNs, objetivamos ausencia de cambios significativos para la anencefalia e incrementos significativos para el encefalocele en el País Vasco y la espina bífida en Mallorca.

## **8.5 Caracterización de los defectos del tubo neural nacidos de madres residentes en Mallorca entre 1980 y 2002**

### **8.5.1 Material y métodos**

Los datos que se van a exponer a continuación corresponden a DTNs y se obtuvieron de forma concomitante con los de la sección 8.2.1. También contamos con los datos correspondientes al Hospital Son Dureta para 1980-89 y 2002, aunque no los hemos utilizado para el cálculo de las correspondientes prevalencias, ya que presumimos que nuestra captación de afectados ha sido incompleta durante estos periodos. Atribuimos nuestra falta de cobertura a la difusión subóptima de la ecografía obstétrica rutinaria durante la década de los 80, lo cual motivaba que algunos casos diagnosticados al nacimiento no llegaran al Hospital Son Dureta, a causa de su elevada mortalidad perinatal y a la ausencia de datos definitivos para el año 2002 en el momento de concluir esta tesis. En resumen, poseemos información referente a 163 DTNs que, a su vez, son hijos de 159 mujeres.

Las entrevistas personales a la madre, en los casos en los que se la pudo localizar, han constituido unas fuentes de información adicionales. Hasta septiembre de 2000, éstas se realizaron transcurrido un periodo de tiempo variable tras el na-

**Tabla 8.7.- Comparación de la proporción de interrupciones gestacionales de los defectos del tubo neural considerados globalmente y de sus tipos entre los periodos 1990-93 y 1994-99 en los registros de Asturias, Barcelona, País Vasco y en Mallorca.**

	<i>Registro</i>	<i>1990-93</i>	<i>1994-99</i>	<i>Diferencias (IC 95%)</i>	<i>p</i>
<b>DTNs (740-742.0)</b>	<i>Asturias (RDCA)*</i>	34/42 (81%)	40/48 (83%)	2,4% (-13,4%-18,7%)	0,768
	<i>Barcelona (REDCB)*</i>	22/27 (81%)	44/63 (70%)	-11,6% (-27,6%-9,1%)	0,091
	<i>País Vasco (RACAV)*</i>	39/67 (58%)	63/84 (75%)	<b>16,8% (1,7%-31,2%)</b>	<b>0,029</b> ↑
	<i>Mallorca</i>	17/31 (55%)	42/55 (76%)	<b>21,5% (1,1%-40,9%)</b>	<b>0,039</b> ↑
<b>ANENCEFALIA (740-740.2)</b>	<i>Asturias (RDCA)*</i>	14/16 (88%)	21/22 (95%)	8,0% (-11,5%-31,8%)	0,369
	<i>Barcelona (REDCB)*</i>	15/16 (94%)	27/33 (82%)	-11,9% (-28,9%-12,1%)	0,263
	<i>País Vasco (RACAV)*</i>	28/29 (97%)	38/41 (93%)	-3,9% (-16,3%-10,7%)	0,492
	<i>Mallorca</i>	9/10 (90%)	22/24 (92%)	1,7% (-17,7%-32,7%)	0,876
<b>ENCEFALOCELE (742.0)</b>	<i>Asturias (RDCA)*</i>	2/2 (100%)	4/6 (67%)	-33,3% (-70,0%-36,6%)	1,0
	<i>Barcelona (REDCB)*</i>	0/0 (0%)	3/7 (43%)	-	-
	<i>País Vasco (RACAV)*</i>	1/10 (10%)	7/7 (100%)	<b>90% (43,3%-98,2%)</b>	<b>&lt;0,001</b> ↑
	<i>Mallorca</i>	2/2 (100%)	4/6 (67%)	-33,3% (-70,0%-36,6%)	1,0
<b>ESPINA BÍFIDA (741-741.9)</b>	<i>Asturias (RDCA)*</i>	18/24 (75%)	15/20 (75%)	0,0% (-25,4%-24,2%)	1,0
	<i>Barcelona (REDCB)*</i>	7/11 (64%)	14/23 (61%)	-2,8% (-32,0%-30,2%)	0,877
	<i>País Vasco (RACAV)*</i>	10/28 (36%)	18/36 (50%)	14,3% (-9,8%-35,9%)	0,253
	<i>Mallorca</i>	6/19 (32%)	16/25 (64%)	<b>32,4% (2,7%-55,0%)</b>	<b>0,033</b> ↑

IC 95% (intervalos de confianza del 95%).

\* RDCA (Registro de Defectos Congénitos de Asturias), REDCB (Registro de Defectos Congénitos de Barcelona), RACAV (Registro de Anomalías Congénitas de la Comunidad Autónoma Vasca).

Los valores estadísticamente significativos se han destacado en negrita.

cimiento o la IVE del feto afectado; a partir de esta fecha se abordó a la madre durante el ingreso a causa de la gestación problema en el Hospital Son Dureta. Aunque se entrevistaba a las madres en presencia de la documentación referente al embarazo del feto con DTN, en algunos casos era incompleta a causa del largo tiempo transcurrido. Por otra parte, no pudimos entrevistar a las pacientes atendidas en el Hospital de Manacor. Con la mencionada información se cumplimentaron, en la medida de lo posible, unas fichas con las siguientes variables: número de historia clínica, nombre y apellidos, diagnósticos realizados (codificados según la novena revisión de la CIE), variedad de DTN (acráneo, encefalocele, espina bífida), punto-s de cierre afectados

(siete categorías), forma de presentación clínica (aislados y polimalformados con/sin causa ambiental, síndromes génicos y cromosómicos), manejo (parto de feto vivo, parto de feto muerto, IVE, feticidio selectivo), año y semanas de gestación en el momento de la IVE/feticidio/parto, sexo del afectado (varón, mujer, desconocido), edad de la madre al realizarse IVE/feticidio/parto, condición socioeconómica de los progenitores (directivos/técnicos, administrativos/comerciantes, trabajadores manuales/rentistas), intervalo entre la conclusión de la gestación previa y la fecha de última regla (FUR) de la gestación con DTN, aborto espontáneo previo al embarazo problema (ninguno, uno, dos, más de dos), orden de la gestación problema, embarazo gemelar (sí, no), primera prueba diagnóstica alterada (ecografía, cribado bioquímico, AFP en líquido amniótico (LA), hallazgo inesperado al nacer), semanas de gestación de ecografía diagnóstica, AFP-SM (en múltiplos de mediana (MoM)), AFP-LA (en MoM), cariotipo fetal (normal, anormal, desconocido), factores ambientales (fiebre perineurulación, diabetes mellitus, fármacos teratogénicos, enolismo), antecedentes familiares malformativos (ausentes, DTN en hijo-s previo-s, padre y/o madre, abuelo-s, hermano-s, tío-s, primo-s, sobrino-s, otras malformaciones), toma de folatos durante gestación problema (no, periconcepcional, inicio antes de las siete semanas de amenorrea, inicio después de las siete semanas, desconocido) y toma de folatos durante gestación inmediatamente posterior a la problema (misma gama de respuestas que para la variable anterior).

Los puntos de cierre afectados (capítulo 4) se han determinado a partir de los informes descriptivos de las necropsias y de las radiografías de los niños afectados si han estado disponibles. La categorización de los puntos de cierre ha obedecido a criterios de prudencia si el punto o puntos afectados no se podían determinar con exactitud.

La inclusión de algunas de las variables anteriores tenía como finalidad su comparación con una muestra representativa de la población general obtenida por medio de datos censales, de la misma forma que se puede realizar en otros países europeos<sup>6</sup>. Lamentablemente, el secreto estadístico ha imposibilitado nuestro acceso a esta información, puesto que el Instituto Nacional de Estadística no puede proporcionar bajo ningún concepto, ni aun para finalidades de investigación debidamente documentadas, datos relativos al nivel de instrucción, la condición socioeconómica, la fecha de nacimiento o las edades ni de los integrantes de las familias de los afectados ni de otras familias controles<sup>7</sup>. Como consecuencia de esta circunstancia, hemos recurrido a los datos disponibles del IBAE referentes a la población mallorquina<sup>1</sup> o nos hemos limitado a exponer los datos obtenidos sobre ciertas variables sin poder establecer las comparaciones poblacionales que hubiéramos deseado.

Como veremos, en numerosas ocasiones efectuamos los análisis estadísticos pertinentes tras la selección conjunta de los DTNs aislados y múltiples, de causas desconocida y ambiental (se excluyen síndromes génicos, cromosómicos, secuencias y asociaciones de alta frecuencia). Ello obedece a que su herencia no sigue un patrón mendeliano y a que existen evidencias a favor de su folato-sensibilidad<sup>8-10</sup>.

Aparte de los métodos estadísticos y el software enunciados en la sección 8.4.1, hemos utilizado la prueba de Kruskal-Wallis para comparar más de dos series numéricas, al no cumplirse los criterios de normalidad.

## 8.5.2 Resultados

### 8.5.2.1 Características clínicas

Como se ha comentado, durante el periodo 1980-2002 tuvimos acceso a información procedente de 163 DTNs, que se desglosan en: 75 anencefalias (46% del total), 17 encefalocelos (10%) y 70 espinas bífidas (43%). Si dividimos el conjunto de nuestra casuística según los puntos de cierre afectados (capítulo 6), apreciamos que los más frecuentemente implicados son el 2 (50% de los casos) y el 1 y/o 5 (38%) (tabla 8.8).

**Tabla 8.8.- Nacidos con defectos del tubo neural de madres residentes en Mallorca durante el periodo 1980-2002, incluidos en nuestro estudio y distribuidos según sus puntos de cierre.**

<i>Puntos de cierre afectados</i>	<i>Número absoluto</i>	<i>Porcentaje</i>
<i>1 y/o 5<sup>a</sup></i>	62	38%
<i>2±4<sup>b</sup></i>	81	50%
<i>4±1<sup>c</sup></i>	9	6%
<i>Sólo canalización<sup>d</sup></i>	1	<1%
<i>No contiguos</i>	1	<1%
<i>No tipificados<sup>e</sup></i>	2	1%
<i>Desconocidos</i>	7	4%
<b><i>Total</i></b>	163	100%

<sup>a</sup> Espinas bífidas de cualquier localización hasta S2 (segunda vértebra sacra) con/sin afectación de la canalización y sin defecto encefálico.

<sup>b</sup> Meroacranias, holoacranias con/sin raquisquisis cervical, craneorraquisquisis, faciocraneorraquisquisis, encefalocelos parietal y occipitoparietal.

<sup>c</sup> Encefalocelos occipitales con/sin afectación raquídea.

<sup>d</sup> Espinas bífidas por debajo de S2.

<sup>e</sup> No se corresponden con ninguno de los cinco puntos de cierre conocidos.

También hemos repartido a los DTNs en los grupos que siguen: anomalías de causa desconocida (aislados y polimalformados), síndromes ambientales, génicos y cromosómicos. En este trabajo, los polimalformados son aquellos individuos con anomalías distintas y no secundarias al propio DTN (p. ej. duplicidad pieloureteral, atresia anal, onfalocele, etc.). Entonces, si un paciente sufre, aparte del DTN, defectos del sistema nervioso central que son comunes en estos pacientes (p. ej. siringomielia, paquigiria, agenesia del cuerpo calloso) (sección 2.7.4.1.2), o de otros sistemas pero que se integran en una secuencia en las que el DTN es el evento iniciador (p. ej. anencefalia e hipoplasia suprarrenal bilateral; mielomeningocele (MM) y pies zambos, hidrocefalia por deformidad de Arnold-Chiari, reflujo vésico-ureteral, etc.) se le considera portador de un DTN aislado. Los DTNs sin causa conocida constituyen el grupo más numeroso (el 72% de los casos son aislados y el 13% son polimalformados), seguidos por los de causa ambiental (7%), los síndromes génicos (4%) y los cromosómicos (3%). En definitiva, sólo el 14% de los DTNs presentados en este

trabajo se pueden adscribir a algún factor predisponente o causal reconocido.

Los síndromes génicos comprenden seis casos de Meckel-Gruber. Las cromosopatías incluyen tres trisomías 18, una trisomía 13 y un síndrome XXY (Klinefelter). Los factores ambientales maternos detectados fueron diabetes mellitus pregestacional (cinco casos), fármacos teratogénicos (cuatro casos, uno con valproato, un segundo caso con carbamazepina, un tercer caso con carbamazepina y valproato, y un último caso con isotretionina), fiebre materna en la época del cierre del tubo neural (un caso) y alcoholismo (un caso). El 29% de 17 encefaloceles se asociaron a estos factores de riesgo frente al 4% del grupo integrado por 76 acráneos y 69 espinas bífidas ( $p < 0,001$ ).

Los casos de síndrome de Meckel-Gruber se repartieron entre los hijos de dos mujeres y los DTNs asociados a este síndrome son cuatro encefaloceles, un acráneo y un MM.

Las tres trisomías 18 se manifestaron en forma de MMs lumbosacros. En uno de los casos este hallazgo se informó de forma aislada y en otro fue acompañado de alteraciones menores del fenotipo. Sólo el caso restante presentó alteraciones anatómicas cardíacas, digestivas y urogenitales concomitantes. El feto afectado de trisomía 13 tenía un encefalocele occipitoparietal, aparte de holoprosencefalia, y otros defectos cardíacos, genitales y digestivos severos. El cariotipo 47,XXY se halló en un feto con holoacrania aislada.

Las embriopatías diabéticas resultaron en tres fetos acráneos, uno con encefalocele occipital y un MM dorsolumbar. La carbamazepina se asoció a dos encefaloceles, uno asociado a acrania y otro a celosomía (uso concomitante de carbamazepina y valproato), mientras que el consumo aislado de valproato dio lugar a un MM lumbar aislado. El consumo de isotretionina se asoció a un feto polimalformado con un defecto no tipificado en la teoría de los múltiples puntos de cierre, esto es, un encefalocele esfenoidal.

Las ubicaciones más frecuentes de las anomalías asociadas son: nefrourológicas y óseas (diez casos cada una), digestivas (nueve casos), cardíacas y las celosomías (ocho casos cada una). Si sólo consideramos los DTNs de causa ambiental y los de origen desconocido, los sistemas más afectados son: el óseo (nueve casos), el cardiovascular (siete casos) y el digestivo (seis casos).

En la tabla 8.9 se muestran los puntos de cierre afectados en los distintos diagnósticos. El fallo más común reside en el punto de cierre 2 con/sin implicación del 4, salvo en los síndromes cromosómicos en los que la afectación de los puntos 1 y/o 5 es predominante.



**Tabla 8.9.- Afectación de los puntos de cierre de los defectos del tubo neural incluidos en nuestro estudio según los distintos diagnósticos.**

<i>Puntos de cierre afectados</i>	<i>Diagnóstico (n (%))</i>			
	<i>Aislados y poli-malformados sin causa conocida*</i>	<i>Aislados y poli-malformados de causa ambiental</i>	<i>Síndromes</i>	
			<i>Génicos</i>	<i>Cromosómicos</i>
<i>1 y/o 5<sup>a</sup></i>	56 (40%)	3 (27%)	0 (0%)	<b>3 (60%)</b>
<i>2±4<sup>b</sup></i>	<b>71 (50%)</b>	<b>5 (45%)</b>	<b>3 (50%)</b>	2 (40%)
<i>4±1<sup>c</sup></i>	5 (4%)	2 (18%)	2 (33%)	0 (0%)
<i>Sólo canalización<sup>d</sup></i>	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>No contiguos</i>	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>No tipificados<sup>e</sup></i>	1 (<1%)	1 (9%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Desconocidos</i>	6 (4%)	0 (0%)	1 (16%)	0 (0%)
<b><i>Totales</i></b>	141 (100%)	11 (100%)	6 (100%)	5 (100%)

N (número de participantes), % (porcentaje). Se han sombreado los puntos afectados más frecuentemente en cada diagnóstico.

\* Se han incluido en esta categoría las secuencias y las asociaciones de alta frecuencia. <sup>a</sup> Espinas bifidas de cualquier localización hasta S2 (segunda vértebra sacra) con/sin afectación de la canalización y sin defecto encefálico. <sup>b</sup> Meroacranias, holoacranias con/sin raquisquisis cervical, craneorraquisquisis, faciocraneorraquisquisis, encefaloceles parietal y occipitoparietal. <sup>c</sup> Encefaloceles occipitales con/sin afectación raquídea. <sup>d</sup> Espinas bifidas por debajo de S2. <sup>e</sup> No se corresponden con ninguno de los cinco puntos de cierre conocidos.

De entre 159 DTNs, el 4% fueron el resultado de embarazos múltiples (dobles) y se repartieron en la misma proporción entre acráneos y espinas bifidas. Si para el periodo 1990-2001 comparamos nuestros datos con los del IBAE, advertimos una diferencia significativa entre la proporción de partos múltiples con feto afecto de DTN, esto es, cinco entre 102 gestaciones con DTNs (5,2%) y la de la población mallorquina, o 1062 partos múltiples entre 79 435 embarazos de fetos vivos (1,3%) (p=0,002).

Si incluimos todos los afectados por DTNs cuyo sexo se conoce, encontramos que el 58% de 71 anencefalias, el 40% de 15 encefaloceles y el 55% de 67 MMs son mujeres, esto es, el sexo femenino es el predominante en las acranias y las espinas bifidas. Al excluir las aneuploidías, los síndromes génicos, las bridas amnióticas y las asociaciones de alta frecuencia, se mantiene el predominio femenino en las anencefalias (60%) y en las raquisquisis (57%), mientras que la proporción de ambos sexos se iguala en los encefaloceles (50%). Si comparamos los últimos datos sobre anencefalias y raquisquisis correspondientes al intervalo 1990-2001 con los del IBAE para nacidos vivos durante el mismo periodo la ratio de masculinidad es de 0,8 (37 varones/49 mujeres) frente al 1,1 de la población mallorquina (41 431/39 096) (p=0,118).

Se escrutaron los antecedentes familiares de las anomalías que nos ocupan para 143 casos. Hallamos que el 99% de 67 anencefalias, el 81% de 16 encefaloceles y el 97% de 60 raquisquisis carecían de dichos precedentes. Si seleccionamos los DTNs de causa desconocida o ambiental, sólo en dos casos se encontraron antecedentes familiares de DTNs (uno en un sobrino de la madre y otro en dos hermanos maternos), y no hubo casos documentados de recurrencia entre los hermanos de los casos de DTNs. Estos DTNs fueron el resultado de una primera gestación en el 40% de 147 casos, de una segunda en el 30%, de una tercera en el 20%, y de una cuarta o quinta gestación en el 9%. Se recogió el intervalo entre la FUR de la gestación problema y

la fecha de finalización del embarazo inmediatamente anterior, para aquellos casos en los que el feto con DTN no era el primero. La mediana del mencionado intervalo para los casos de DTNs fue de 33 meses, y los valores mínimo y máximo fueron uno y 108 meses, respectivamente. La mediana para 40 acráneos fue de 34 meses y para 29 MMs fue de 23 meses ( $p=0,952$ ). Si consideramos el orden de nacimiento, tras restar las gestaciones previas que duraron menos de seis meses, encontramos que en el 47% de 147 casos el DTN se produjo en el primer embarazo, en el 33% durante el segundo, en el 15% durante el tercero y en el 6% restante fue en el cuarto o su orden fue superior. Si seleccionamos los datos previos correspondientes al lapso 1990-2001 y los comparamos con los del IBAE para el mismo periodo, encontramos que el 53,1% de 98 DTNs de causa desconocida o ambiental eran el resultado de una primera gestación frente al 50,2% de 79 543 nacidos vivos, el 30,6% lo eran de una segunda frente al 37,1% y el 16,4% de una tercera gestación o superior frente al 12,8%. La comparación de ambos porcentajes resultó en un valor de  $p$  no significativo ( $p=0,327$ ). En 143 casos se pudo conocer si hubo o no abortos espontáneos anteriores a la gestación problema y se encontró que el 80% de mujeres no contaban con este antecedente, pero el 17% habían sufrido una pérdida gestacional y el 3% dos o más.

Se catalogaron las FURs de acuerdo con la estación del año y, de nuevo, se incluyeron sólo los DTNs de causa desconocida y ambiental. Se apreció que en el 33% de 147 DTNs la FUR fue en primavera y en el 18% fue en verano. Si sólo contabilizamos los DTNs previos a 1994 (año en el que a las madres de los afectados se les empezó a prescribir ácido fólico), el máximo porcentaje de últimas reglas también tuvieron lugar en primavera (33% de 72) y las demás se distribuyeron de forma homogénea durante el resto del año.

### **8.5.2.2 Características sociodemográficas**

Las madres de los niños con DTNs tienen, al nacer éstos, una edad media de 29 años con una desviación estándar de seis. La amplitud oscila entre 16 y 43 años. Si excluimos las cinco cromosopatías (se agregan en las edades genésicas más avanzadas), los síndromes génicos (son independientes de la edad materna) y tenemos en cuenta las edades de las madres con partos y/o IVEs entre 1990 y 2001 (años de máxima cobertura de nuestros datos), obtenemos los datos representados en la tabla 8.10. La diferencia máxima entre los porcentajes correspondientes a los DTNs y a los nacidos vivos está en el estrato de 25-34 años, esto es, parece que hay una tendencia de los DTNs a acumularse en los extremos de la edad genésica, sin embargo, la diferencia no es estadísticamente significativa ( $p=0,150$ ).

Se ha recogido la condición socioeconómica paterna en el conjunto de DTNs de causa ambiental y desconocida. Así, en el 61% de 88 casos en los que se ha podido averiguar son trabajadores manuales y rentistas, el 23% son administrativos y comerciantes y el 16% restante pertenecen a directivos y técnicos. Si consideramos la misma variable para el lapso 1990-01, las cifras correspondientes a las categorías anteriores son 61,3% de 62 casos, 22,6% y 16,1% respectivamente. Al comparar estas proporciones con las del IBAE para progenitores de nacidos vivos durante este mismo periodo (60,1%, 23,5% y 16,3% de 71 250, respectivamente) no se aprecian diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,981$ ).

**Tabla 8.10.- Comparación de las edades de las madres de hijos vivos con las de las madres de los defectos del tubo neural nacidos en Mallorca durante el periodo 1990-2001.**

<b>Estrato de edad</b>	<b>Hijos vivos* (n, %)</b>	<b>DTNs (n, %)</b>
<b>&lt;25 años</b>	14 422 (18%)	21 (21%)
<b>25-34 años</b>	54 773 (68%)	58 (59%)
<b>&gt; 34 años</b>	11 305 (14%)	19 (19%)

( $\chi^2=3,79$ ;  $p=0,150$ )

\* Datos obtenidos del IBAE (Institut Balear d'Estadística).  
n (número absoluto), % (porcentaje).

### 8.5.2.3 Características diagnósticas

El diagnóstico se llevó a cabo mediante ecografía en el 51% de 157 casos de DTNs (59% de 73 anencefalías, 47% de 17 encefalocelos y 42% de 66 espinas bífidas). La determinación de AFP-LA contribuyó únicamente al diagnóstico de las espinas bífidas (3% de 66 MMs). Al contrario, el 29% fueron hallazgos inesperados al nacimiento, esto es, el 14% de anencefalías, el 35% de encefalocelos y el 44% de espinas bífidas ( $p<0,001$  para anencefalías frente a espinas bífidas).

A partir de 1994 (cribado bioquímico instaurado) se pudo averiguar cómo se diagnosticaron 79 DTNs. En el 54% de los mismos la primera prueba alterada fue la ecografía, en el 38% el cribado bioquímico y en el 8%, esto es, en seis casos no se hallaron alteraciones en las exploraciones practicadas. Estos últimos DTNs fueron diagnosticados en el momento del parto y comprenden dos encefalocelos, y cuatro raquisquisis. La madre de uno de los encefalocelos inició tarde su control gestacional y el hijo sufría malformaciones múltiples secundarias a la ingesta de isotretinina hasta las 24 semanas de gestación. Una de las espinas bífidas se restringía a los niveles sacros primero y segundo, mientras que otra no tenía bolsa. Por último, destacamos que sólo en dos de estos últimos casos se solicitó cribado bioquímico, con los resultados de un falso negativo y un verdadero positivo con ecografía negativa. En definitiva, desde 1994 la AFP-SM elevada ha levantado la sospecha de DTN en el 49% de 41 acráneos, en el 33% de nueve encefalocelos y en el 24% de 29 espinas bífidas.

La sensibilidad de la ecografía morfológica se ha calculado mediante la selección de aquellos casos sin cribado bioquímico y con ecografía rutinaria efectuada entre las 14 y 23 semanas de amenorrea para la anencefalia, y las 16 y 23 semanas para la espina bífida. Se detectaron el 100% (intervalo de confianza del 95% (IC 95%) 73-100) de 14 anencefalías y el 45% (IC 95% 18-75) de 11 espinas bífidas.

La sensibilidad para la AFP-SM superior o igual a 2 MoM es del 95% (IC 95% 74-100) para 21 anencefalías, del 50% (IC 95% 9-91) para cuatro encefalocelos y del 62% (IC 95% 32-85) para 13 espinas bífidas. Las medianas de AFP-SM son de 5,1 MoM para los acráneos y de 2,1 MoM para las espinas bífidas ( $p=0,005$ ). En cambio, la sensibilidad para la AFP-LA de 2,0 MoM es del 100% (IC 95% 79-100) para 19 anencefalías, 50% (IC 95% 9-91) para cuatro encefalocelos y 94% (IC 95% 69-100)

para 17 espinas bífidas. Las medianas de AFP-LA son de 19,6 MoM para 19 acranias y de 4,5 MoM para 17 MMs (p=0,005).

La repercusión favorable de la ecografía y la AFP-SM rutinarias sobre la detección prenatal se pone de manifiesto al comparar el número de diagnósticos de DTNs realizados al nacer antes de 1994 y a partir de entonces, esto es, el 50% de 78 frente al 8% de 79 casos (p<0,001). También se constata el beneficio significativo de los despistajes bioquímico y ecográfico al observar una mayor precocidad en el diagnóstico de las anomalías del tubo neural en su conjunto (20,5 frente a 16,0 semanas) (p<0,001), y de la anencefalia (22,0 frente a 16,0 semanas) (p<0,001) y de la espina bífida (21,0 frente a 19,5) (p=0,036) por separado tras su instauración (tabla 8.11). El cribado bioquímico aislado es prácticamente el único responsable del avance cronológico diagnóstico experimentado por las raquisquisis, puesto que antes de su instauración no se detectó ninguna de ellas antes de las 15 semanas de amenorrea (fecha recomendada para la realización del cribado) y tras su implantación sólo una se diagnosticó antes de estas semanas de gestación, es decir, los diagnósticos de estas anomalías entre las 15 semanas y las 19-21 semanas (edad gestacional recomendada para la realización de la ecografía morfológica) van guiados por pruebas de imagen realizadas más precozmente como consecuencia de los resultados del despistaje bioquímico. Si tenemos en cuenta los DTNs detectados o bien por ecografía, o bien por cribado más ecografía dirigida, constatamos que la mediana de semanas gestacionales en el primer supuesto es de 20 (mínimo de 13 y máximo de 39) frente a 19 semanas en el segundo (mínimo de 18 y máximo de 20) (p=0,034).

**Tabla 8.11.- Semanas de gestación del diagnóstico ecográfico de los defectos del tubo neural mallorquines incluidos en este estudio pre y postimplantación del cribado bioquímico.**

Tipo de defecto del tubo neural	Periodo		Medianas de las diferencias e IC 95%	p
	Previo al cribado bioquímico (mediana (n))	Posterior al cribado bioquímico (mediana (n))		
<i>Anencefalia</i>	22,0 (20)	16,0 (42)	<b>-7,0 (-15,0- -3,0)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<i>Encefalocele</i>	19,5 (2)	15,0 (7)	-	0,111
<i>Espina bífida</i>	21,0 (12)	19,5 (24)	<b>-2,5 (-9,0- -0,0)</b>	<b>0,036</b>
<i>Todos</i>	20,5 (34)	16,0 (73)	<b>-5,0 (-8,0- -3,0)</b>	<b>&lt;0,001</b>

n (número de casos), IC 95% (intervalo de confianza del 95%).

Los resultados estadísticamente significativos se han destacado en negrita.

Sólo se incluyen aquellos defectos diagnosticados antes del nacimiento.

En el 40% de los 149 casos no se disponía de resultados de cariotipo, sin embargo, la proporción de los mismos ha ascendido con el devenir del tiempo. Así, el 96% de los DTNs no tenían cariotipo en el periodo 1980-89 frente al 74% del intervalo 1990-93, el 42% de 1994-97, y el 24% de 1998-02 (p<0,001).

### 8.5.2.4 Características de su manejo

El 56% de los 163 DTNs fueron objeto de IVE, el 33% nacieron vivos, el 10%

nacieron muertos y en el 1% se efectuó un feticidio selectivo (dos MMs). Hemos observado una progresión creciente de interrupciones (IVEs y feticidios selectivos), esto es, 14% de las 50 gestaciones para el periodo 1980-89, 55% de las 31 para el lapso 1990-93, 74% de las 35 para 1994-97 y 92% de las 47 para 1998-2002 ( $p < 0,001$ ). Las medianas de las semanas de gestación en las que se realizaron las IVEs fueron de 18,0 para los acráneos, 18,5 para los encefaloceles y 21,0 para los MMs ( $p = 0,009$  para encefalocele frente a MM y  $p < 0,001$  para acrania frente a MM). La mediana de semanas de gestación para el periodo 1980-93 es de 20 semanas y para 1994-2002 de 18 semanas, los mínimos y máximos para ambos intervalos han sido de 16-30 y 12-25 semanas, respectivamente ( $p = 0,018$ ).

La mayoría de las gestaciones de acráneos y encefaloceles fueron interrumpidas (69% y 65% respectivamente), mientras que en el 57% de los MMs la gestación siguió su curso habitual ( $p = 0,004$ ). Los fallecimientos anteparto fueron más frecuentes entre los fetos anencéfalos (16% de los mismos), y menos prevalentes entre los afectados por encefalocele (6%) y por MM (3%) ( $p = 0,006$  para la comparación entre acráneos y el resto de DTNs).

Parece que las interrupciones de embarazos de fetos únicos son aceptadas en nuestra población, puesto que sólo el 5% de las madres de 55 acráneos cuyo diagnóstico se efectuó dentro del plazo del aborto legal lo rehusaron frente a un caso de entre 70 MMs ( $p = 0,319$ ). No hubo ningún caso de rechazo a la IVE para los encefaloceles diagnosticados dentro del plazo para la realización de esta maniobra.

### **8.5.2.5 Características de la prevención primaria**

De entre 116 casos con DTNs de causa desconocida o ambiental en los que se pudo averiguar la ingesta de ácido fólico, se objetivó que esos suplementos se iniciaron en el periodo periconcepcional o antes de las siete semanas de gestación (próximo a la neurulación) en el 16% de los embarazos. El 22% de las 59 madres de acráneos los tomaron cerca de la embriogénesis del tubo neural (periconcepcional más inicio antes de las siete semanas) frente al 10% de 51 madres de espinas bífidas ( $p = 0,084$ ). En definitiva, nos hemos percatado de una afectación prioritaria de los puntos 2 con/sin implicación del 4 entre los DTNs folato-resistentes (aparecidos tras la toma de ácido fólico próximo a la neurulación).

Se pudo conocer la ingesta de suplementos vitamínicos en las gestaciones inmediatamente posteriores a las que dieron lugar a un DTN de causa desconocida o ambiental en 19 madres con embarazos a partir de 1994 (inicio de prevenciones con folatos entre nuestra casuística). Se objetivó que 15 madres tomaron folatos periconcepcionales y una los inició postconcepcionalmente pero antes de las siete semanas de amenorrea. La toma de estos suplementos cerca de la neurulación se produjo en proporciones similares de madres de acráneos y de espinas bífidas (82% frente a 88%;  $p = 1,0$ ).

## 8.6 Discusión

La veracidad de nuestras cifras sobre anomalías congénitas puede ser motivo de controversia, ya que no disponemos en Mallorca de registro oficial de estos defectos. Sin embargo, abogamos por la reproducibilidad de nuestros datos, ya que hemos recurrido a fuentes de información con alto grado de solapamiento (sección 8.2.1). Además, los casos de mortalidad perinatal elevada (principalmente anencefalias) no son susceptibles de omisión, ya que se ha asegurado su captación completa por medio de los datos de mortalidad perinatal del IBAE. Todos los nacidos viables con espina bífida y encefaloceles son tributarios de tratamiento neuroquirúrgico, y sólo nuestro Hospital puede brindar este tipo de atención tan especializada. En la última década se ha objetivado la tendencia del Hospital Son Dureta a aglutinar aquellos casos de pronóstico más desfavorable, e incluso letal (éxitus anteparto y defectos congénitos, entre otros) que se desvían desde otros centros sanitarios<sup>11</sup>. La comparabilidad con otros registros se ve favorecida por que los DTNs tienen un diagnóstico inequívoco al nacimiento, incluso en entornos con posibilidades diagnósticas desiguales. Los valores de prevalencia total de DTNs en línea, e incluso superiores, a los de otros registros poblacionales españoles respaldan la ausencia de un subregistro relevante. Obviamente, también disponemos de argumentos que fundamentan la solidez de nuestros datos con referencia al resto de las anomalías especificadas en la tabla 8.1, pero remitimos al lector interesado a los artículos pertinentes, por no considerar este asunto objeto directo de esta tesis<sup>12-3</sup>.

Las prevalencias totales de los DTNs ponen de manifiesto su importancia relativa con respecto a otros defectos congénitos y la magnitud de su repercusión potencial sobre la salud de la población afectada, ya que tanto el encefalocele como la espina bífida suelen ser muy invalidantes (capítulos 3 y 4). A pesar de que nuestra serie no es exigua (163 casos), no tenemos ningún caso documentado de iniencefalia, hallazgo más propio de áreas con prevalencias muy superiores a la nuestra, como el Norte de China<sup>14</sup>.

El aumento de las prevalencias totales de los defectos congénitos está directamente relacionado con el acceso al diagnóstico prenatal, sin embargo este efecto es más relevante para las aneuploidías<sup>15</sup>. En el caso de los DTNs, sólo se producen un 5% de abortos entre las 15 y las 20 semanas de amenorrea<sup>16-7</sup>, circunstancia que favorece que no se alteren de forma significativa las prevalencias totales de DTNs en nuestro entorno antes y después de la implantación del cribado bioquímico. Se podría esgrimir que ni los datos asturianos ni los mallorquines se pueden parangonar ni con los barceloneses ni con los vascos, puesto que en las áreas monitorizadas por estos últimos no se utiliza el despistaje bioquímico rutinario. Por otra parte, el diagnóstico prenatal también gravita sobre la ecografía y la anencefalia se detectará más a mayor disponibilidad de las mencionadas pruebas de imagen. En consecuencia, se precisaría un análisis pormenorizado de la práctica del diagnóstico prenatal en cada zona monitorizada para averiguar si las diferencias entre Mallorca y los registros poblacionales se han sobrevalorado. Por último, las cifras mallorquinas ya eran relativamente elevadas antes de la introducción del cribado, y la diferencia entre las cifras de Barcelona-País Vasco y Asturias-Mallorca excede ampliamente del 5% de incremento atribuible al diagnóstico antes de las 20 semanas de gestación, lo que nos inclina a pen-

sar que el liderazgo en prevalencia total de DTNs en Asturias y Mallorca es real. Además, en Asturias y Mallorca los DTNs constituyen un problema de salud pública de mayor envergadura que en los otros dos registros considerados, puesto que el número de espinas bífidas supera al de anencefalías, entonces, al problema numérico hay que sumarle el derivado de las repercusiones y secuelas multiorgánicas aparejadas a los meningoceles y MMs (capítulos 2 y 3).

Parece que nuestras cifras, junto con las del resto de los registros poblacionales españoles, tienden a la estabilización e incluso a un descenso lento. Constatamos que las áreas cuyas cifras de DTNs eran muy superiores a las nuestras (Reino Unido, Irlanda) han experimentado una caída muy importante en los últimos años. Este descenso se inició antes de la implantación rutinaria del diagnóstico prenatal<sup>18-9</sup>, y se produjo incluso en áreas en las que no se practican IVEs<sup>20</sup>, a pesar de un uso periconcepcional subóptimo de suplementos de folatos<sup>21</sup>. Sin embargo, este descenso parece haber alcanzado una meseta en los últimos años<sup>22</sup>. Esta disminución en otras zonas junto con la estabilización en la población mallorquina parece haber contribuido a que nuestras cifras se sitúen en niveles medios-altos con respecto a otras áreas europeas monitorizadas. Entonces, si establecemos comparaciones para la prevalencia total de DTNs durante la década 90-99, nuestras cifras son de 1,32‰ mientras que las de los registros del EUROCAT con mayor prevalencia (Mainz, Glasgow y Asturias) exhiben valores de 1,84‰, 1,81‰ y 1,31‰ respectivamente<sup>2</sup> (capítulo 7).

En nuestro entorno, la repercusión de la prevención primaria sobre las cifras de DTNs es imperceptible. La incorrección de la ingesta de folatos<sup>23-4</sup> (capítulo 11), a pesar de su consumo creciente según datos de la Cooperativa d'Apotecaris (aunque es posible que una pequeña fracción de estas especialidades se haya utilizado para el manejo de pacientes con anemia megaloblástica o para enfermos oncológicos) son coherentes con nuestra observación. Si asumimos que dos tercios de los DTNs responden a la prevención con folatos (capítulo 10), que aproximadamente el 10% de la población gestante los toma en el periodo periconcepcional (capítulo 11), y que nuestra prevalencia total es del 1,3‰, entonces, la disminución esperada de DTNs sería del orden de 8,7 cada 100 000 nacimientos, esto es, si el número de nacimientos en la isla se mantuviera constante la prevención primaria "ahorraría" seis DTNs cada diez años. Obviamente, esta disminución tan modesta va a ser difícil de demostrar. Parece que únicamente el enriquecimiento de los cereales con ácido fólico puede conseguir que se supere la meseta de prevalencia que se ha alcanzado en los últimos años. La utilidad de esta medida de salud pública ya se ha comprobado en EE.UU. y en Canadá<sup>25-7</sup> (capítulo 11).

Con referencia a la prevención secundaria, en el quinquenio 1994-99 nuestra tendencia en incremento de proporción de IVEs es paralela al País Vasco, y en nuestro caso, este hallazgo es particularmente relevante para la espina bífida. Los argumentos que atribuyen esta evolución al cribado bioquímico son: en el cuatrienio 1995-98 su cobertura superaba al 79% de las gestantes (Dra. Inmaculada Martín, comunicación personal), por consiguiente, los diagnósticos realizados entre el cribado bioquímico (15 semanas) y la ecografía morfológica rutinaria (19-21 semanas) suelen corresponder a pruebas de imagen adelantadas a causa de niveles elevados de AFP-SM. Además, tenemos constancia en la literatura médica de que los casos con cribado positivo ecográfico y bioquímico no tienen porqué solaparse y que ambas

estrategias son necesariamente complementarias<sup>28-9</sup>. De hecho, no es lo mismo practicar una ecografía “rutinaria” que otra “dirigida”, esto es, realizada por ecografistas más experimentados, alertados por un despistaje positivo y con los mejores equipos disponibles. Adicionalmente, nuestra sensibilidad de la ecografía aislada para el despistaje para las espinas bífidas fue escasa, esto es, de un 45%, cifra que dista mucho de nuestro 64% de interrupciones para la espina bífida. Lamentablemente, la detección de las espinas bífidas es más baja y variable que la de la anencefalia y ello también ocurre en los registros del EUROCAT. En un magnífico estudio de Boyd y cols.<sup>30</sup> se informa de unos índices de detección para la espina bífida aislada antes de las 24 semanas de entre el 40% y el 93% para las áreas con cribado de AFP-SM y de 8%-78% para las áreas sin el mismo, por consiguiente, los pilares de la detección prenatal precoz de la espina bífida son el acceso universal a una ecografía rutinaria de calidad y el cribado con AFP-SM. La sensibilidad de la AFP-SM en nuestro medio parece similar a la documentada por otros trabajos para la acrania (95% frente a 92%) y para la espina bífida (62% frente a 64%)<sup>29</sup>. Por último, pensamos que hay que pedir más cariotipos aun en diagnósticos tardíos de DTNs. Las alteraciones de dotación cromosómica son frecuentes (5-6%), incluso si el feto presenta únicamente un DTN aislado (2%)<sup>31-2</sup>, tal y como hemos podido apreciar en nuestra casuística de trisomías 18. La presencia de un cariotipo patológico modifica la atención obstétrico-pediátrica en estos enfermos y el consejo genético a los progenitores<sup>33</sup>.

La evolución positiva de la detección prenatal se refleja tanto en el aumento progresivo de gestaciones con DTNs interrumpidas como en la precocidad de las IVEs. De hecho, en nuestra casuística el límite inferior para una interrupción es de 12 semanas de amenorrea. Si bien la mencionada precocidad puede traducirse en una mejor tolerancia físico-psíquica materna, no hay que dejar de lado que los estudios anatomopatológicos en productos del primer trimestre son menos fidedignos, tanto a causa de las dimensiones del material como por la fragilidad del mismo, ya que el producto puede destruirse involuntariamente ya sea durante la realización de las maniobras abortivas, ya sea durante su manejo en Anatomía Patológica. Estos factores pueden privar a los padres de un diagnóstico exacto y, por consiguiente, de un consejo genético de calidad<sup>33-4</sup>.

En nuestro medio, la IVE para los DTNs constituye una maniobra aceptada. Los datos europeos proporcionados por Boyd y cols. van en el mismo sentido y objetivan que las proporciones de IVEs, si el defecto se diagnostica durante el plazo legal para su realización, son superiores para la acrania que para la espina bífida. Los límites inferiores exhibidos por estos autores en distintos registros miembros del EUROCAT son del 89% para la acrania y del 20% para la espina bífida, y los superiores son del 100% para ambos supuestos<sup>30</sup>. Por otra parte, parece que el diagnóstico de un feto acráneo o con espina bífida determina un importantísimo incremento del consumo periconcepcional de folatos con respecto a la población sin estos antecedentes (capítulo 11), hecho que podemos atribuir al temor a la repetición de estas situaciones en gestaciones posteriores.

Nuestros datos sobre una mayor implicación de los puntos 2 con/sin afectación del 4 y 1 y/o 5 son coherentes con los hallazgos documentados por el ECEMC<sup>35</sup>, salvo que en esta última serie los puntos más frecuentemente afectados son el 1 y/o 5 en lugar del 2 con/sin el 4, circunstancia que atribuimos a la monitorización prioritaria de los nacidos y no de las IVEs por parte de este registro. En la línea del ECEMC,



el síndrome de Meckel-Gruber destaca entre los DTNs sindrómicos y la trisomía 18 es la cromosopatía que se asocia de modo más consistente con los DTNs. Como no hemos hallado ningún caso publicado de síndrome XYY asociado a acrania, es posible que este hallazgo se deba al azar.

En cinco de los seis síndromes de Meckel-Gruber se pudo confirmar la afectación del punto 4; mientras que en la trisomía 18 destacó el punto 5, al igual que han mostrado otras publicaciones<sup>35-7</sup>. También se reproduce el patrón de DTNs folato-resistentes documentado por Seller, es decir, los acráneos parecen menos sensibles a los efectos preventivos de los suplementos con folatos<sup>38</sup>, aunque no se alcance la significación estadística ( $p=0,084$ ). Sólo un caso tenía puntos de cierre afectados no contiguos, hallazgo infrecuente que respalda la hipótesis de los múltiples puntos de cierre<sup>39-40</sup>.

De entre las malformaciones que se suelen asociar a los DTNs destacan las cardiopatías, las nefropatías y las anomalías digestivas<sup>41-2</sup>, fenómeno que también se reproduce en nuestra casuística.

El sexo fetal femenino constituye un factor de riesgo ya consolidado de DTN<sup>41,43-6</sup> y ello se ve adecuadamente reproducido en nuestra casuística. Al contrario, no hemos constatado casos recurrentes entre los hermanos de una misma familia, que suelen ocurrir en el 2% en el caso de un hermano afectado y en el 5% si hay dos hermanos enfermos<sup>47-8</sup>, aunque estas predicciones varían con la prevalencia de cada área en particular<sup>49</sup> (capítulo 7). Atribuimos este hecho al tamaño de nuestra población, a las pérdidas de seguimiento de los casos más antiguos y a la presencia de factores moduladores como el consumo de ácido fólico periconcepcional<sup>50</sup>.

Al igual que en otros muchos trabajos, hemos percibido que nuestros DTNs tienden a ser más prevalentes entre las gestaciones múltiples<sup>45-6</sup>, entre los hijos más jóvenes de una misma fratría<sup>46</sup>, y en los extremos de la edad genésica, aunque estos dos últimos hallazgos no han alcanzado la significación estadística<sup>51-2</sup>. La agregación de las últimas reglas en primavera nos retrotrae a los resultados de estudios realizados hace varias décadas en el Reino Unido, área de alta prevalencia de DTNs<sup>53</sup>, pero estos hallazgos son controvertidos a la luz de estudios más recientes<sup>54</sup>. Por otra parte, es tentador atribuir la mayor concentración de estos casos en primavera a una dieta más pobre en folatos durante el invierno previo. De hecho, un estudio reciente sobre población irlandesa ha documentado la disminución primaveral de las concentraciones de folato sérico y eritrocitario<sup>55</sup>.

No hemos hallado diferencias con respecto a la condición socioeconómica de nuestros DTNs en comparación con la población mallorquina, al igual que ocurre en algunos trabajos<sup>56</sup>.

Lamentablemente, no hemos dispuesto de una población control que nos permita averiguar si nuestras cifras de abortos espontáneos previos a la gestación con DTN son o no equivalentes. Sin embargo, los datos constatados en nuestra casuística no parecen diferir demasiado de los manejados en la literatura sobre el tema, esto es, 10-15% de incidencia de abortos clínicos en la población general y 2% de incidencia de dos abortos<sup>57</sup>. En la bibliografía médica hay trabajos que respaldan la influencia positiva de los abortos previos sobre la concepción de un hijo con DTN<sup>58-9</sup>, pero tampoco faltan otros que abogan por lo contrario, por lo tanto, la influencia de esta variable sigue siendo discutida<sup>60</sup>.

En resumen, en nuestra casuística se reproducen la mayoría de los hallazgos epidemiológicos propios de los DTNs. En cuanto a las maniobras preventivas, la administración de ácido fólico a las gestantes no se ha traducido en una disminución evidente de la prevalencia y nuestra prevención secundaria está en línea con los registros europeos de base poblacional.

## 8.7 Bibliografía

1. Institut Balear d'Estadística (Islas Baleares). Demografía. Palma de Mallorca: Institut Balear d'Estadística; 1990-2001.
2. EUROCAT. Report 8 Customised Tabulations. Disponible en: URL: <http://www.eurocat.ulster.ac.uk/pubdata/report8tab.html> (acceso 3/3/03).
3. Bermejo Sánchez E, Martínez-Frías ML. Vigilancia epidemiológica de anomalías congénitas en el periodo 1980-1998 en España. Bol ECEMC: Rev Dismor Epidemiol 1998;IV,4:35-184.
4. EUROCAT. Surveillance. Disponible en: URL: <http://www.eurocat.ulster.ac.uk/surveillance> (acceso 29/5/03).
5. EUROCAT. Members and Central Registry. List of Members. Disponible en: URL: <http://www.lshtm.ac.uk/php/eeu/eurocat> (acceso 16/12/01).
6. Irgens ML. The Medical Birth Registry of Norway. Epidemiological research and surveillance throughout 30 years. Acta Obstet Gynecol Scand 2000;79:435-9.
7. Ley 12/1989 de la Función Estadística Pública (Ley 12/1989, de 9 de mayo de 1989, de la Función Estadística Pública. (BOE 11-05-1989)). Disponible en: URL: <http://www.ine.es/leyes/leyespa/11289.htm> (acceso 26/5/03).
8. Khoury MJ, Shaw GM, Moore CA, Lammer EJ, Mulinare J. Does periconceptional multivitamin use reduce the risk of neural tube defects associated with other birth defects? Data from two population-based case-control studies. Am J Med Genet 1996;61:30-6.
9. Hernández-Díaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Neural tube defects in relation to use of folic acid antagonists during pregnancy. Am J Epidemiol 2001;153:961-8.
10. Correa A, Botto L, Liu Y, Mulinare J, Erickson JD. Do Multivitamin Supplements Attenuate the Risk for Diabetes-Associated Birth Defects? Pediatrics 2003;111:1146-51.
11. González González ML, Lardinois R. La mortalidad entre los recién nacidos de la Comunidad Balear al final del siglo XX. Clin Invest Gin Obst 2001;28:373-81.
12. Gibert Castañer MJ, Martín Navas I, Juncosa Álvarez de Sotomayor N. Prevalencia total de una serie de anomalías congénitas en la isla de Mallorca durante la década de los noventa. Prog Obstet Ginecol 2003;46:208-16.
13. Gibert Castañer MJ, Martín Navas I. Interrupción voluntaria del embarazo por anomalías congénitas en Mallorca en la década de los 90. Prog Obstet Ginecol. En prensa 2003.
14. Moore CA, Li S, Li Z, Hong S, Gu H, Berry RJ, y cols. Elevated rates of severe neural tube defects in a high prevalence area in northern China. Am J Med Genet 1997;73:113-8.
15. Martínez-Frías ML, Gómez-Ullate J, Valdor C, Bermejo E. Significado de las cifras de frecuencia de defectos del tubo neural y de síndrome de Down en recién nacidos, corregidas y no corregidas por las interrupciones de la gestación tras el diagnóstico prenatal de esos defectos congénitos. Prog Obstet Ginecol 2000;43:403-9.
16. Creasy MR, Alberman ED. Congenital malformations of the central nervous system in spontaneous abortions. J Med Genet 1976;13:9-16.
17. MacHenry JC, Nevin NC, Merrett JD. Comparison of central nervous system malformations in spontaneous abortions in Northern Ireland and South-east England. Br Med J 1979;1(6175):1395-7.
18. Yen IH, Khoury MJ, Erickson JD, James LM, Waters GD, Berry RJ. The changing epidemiology of neural tube defects. United States, 1968-89. AJDC 1992;146:857-61.
19. Murphy M, Seagroatt V, Hey K, O'Donnell M, Godden M, Jones N, Botting B. Neural tube defects 1974-94 – down but not out. Arch Dis Child 1996;75:F133-4.
20. McDonnell RJ, Johnson Z, Delaney V, Dack P. East Ireland 1980-1994: epidemiology of neural tube defects. J Epidemiol Community Health 1999;53:782-8.
21. Sayers G, Johnson Z, McDonnell R, Scallan E. Knowledge and use of peri-conceptional folic acid among antenatal patients. Ir Med J 1997;90:236-8.
22. Kadir RA, Sabin C, Whitlow B, Brockbank E, Economides D. Neural tube defects and periconceptional folic acid in England and Wales: retrospective study. BMJ 1999;319:92-3.
23. Gibert MJ, Juncosa N, Martín I. Prevención primaria de los defectos del tubo neural en la población atendida en un hospital de referencia. Prog Obstet Ginecol 2000;43:13-20.
24. Gibert MJ, Martín I, Ramos M. Uso de folatos para la prevención de los defectos del tubo neural en la población atendida en un hospital de referencia [carta]. Med Clin (Barc). En prensa 2003.
25. Olney RS, Mulinare J. Trends in neural tube defect prevalence, folic acid fortification, and vitamin supplement use. Semin Perinatol 2002;26:277-85.
26. Perdad VL, Van den Hof MC, Dubé JM, Zimmer P. Incidence of open neural tube defects in Nova Scotia after folic acid fortification. CMAJ 2002;167:241-5.
27. Ray JG, Meier C, Vermeulen MJ, Boss SJ, Wyatt PR, Cole DEC. Association of neural tube defects and folic acid fortification in Canada. Lancet 2002;360:2047-8.
28. Persson PH, Kullander S, Gennser G, Grennert L, Laurell CB. Screening for fetal malformations using ultrasound and measurements of alpha-fetoprotein in maternal serum. Br Med J (Clin Res Ed) 1983;286:747-9.

29. Chan A, Robertson EF, Haan EA, Ranieri E, Keane RJ. The sensitivity of ultrasound and serum alpha-fetoprotein in population-based antenatal screening for neural tube defects. South Australia 1986-1991. *Br J Obstet Gynaecol* 1995;102:370-6.
30. Boyd PA, Wellesley HEK, De Walle HEK, Tenconi R, García-Miñaur S, Zandwijken GRJ, y cols. Evaluation of the prenatal diagnosis of neural tube defects by fetal ultrasonographic examination in different centres across Europe. *J Med Screen* 2000;7:169-74.
31. Hume RF Jr, Drugan A, Reichler A, Lampinen J, Martin LS, Johnson MP, Evans MI. Aneuploidy among prenatally detected neural tube defects. *Am J Med Genet* 1996;61:171-3.
32. Harmon JP, Hiatt AK, Palmer CG, Golichowski AM. Prenatal ultrasound detection of isolated neural tube defects: is cytogenetic evaluation warranted? *Obstet Gynecol* 1995;86(4 Pt 1):595-9.
33. Steinhaus KA, Bernstein R, Bocian ME. Importance of accurate diagnosis in counseling for neural tube defects diagnosed prenatally. *Clin Genet* 1991;39:355-61.
34. Martínez-Frías ML. Propuesta del Comité de Epidemiología de la SIADP. Creación en España de un registro nacional de interrupciones voluntarias del embarazo por malformaciones congénitas. *Prog Diagn Pren* 1995;7:198-200.
35. Sanchis Calvo A, Martínez-Frías ML. Estudio clínico epidemiológico de los defectos del tubo neural clasificados por los cinco puntos de cierre del mismo. *An Esp Pediatr* 2001;54:165-73.
36. Van Allen MI. Multisite neural tube closure in humans. *Birth Defects: Original Article Series* 1996;30:203-25.
37. Van Allen MI, Kalousek DK, Chernoff GF, Juriloff D, Harris M, McGillivray BC, y cols. Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans. *Am J Med Genet* 1993;47:723-43.
38. Seller MJ. Multi-site neural tube closure in humans and maternal folate supplementation. *Am J Med Genet* 1995;58:222-4.
39. Seller MJ. Further evidence for an intermittent pattern of neural tube closure in humans. *J Med Genet* 1994;31:383-7.
40. Martínez-Frías ML, Sanchis A, Aparicio P, Blanco M, García MJ, Gómez-Ullate J, y cols. Description of the characteristics of cases with noncontiguous neural tube defects identified in a series of consecutive births. *Teratology* 1998;57:13-6.
41. Journel H, Milon J, Dabadie A, Parent P, Roussey M, Le Marec B. Les défauts de fermeture du tube neural (spina bifida et anencephalie) en Bretagne. *Pédiatrie* 1985;6:461-8.
42. Källén B, Robert E, Harris J. Associated malformations in infants and fetuses with upper or lower neural tube defects. *Teratology* 1998;57:56-63.
43. James WH. The sex ratio in spina bifida. *J Med Genet* 1979;16:384-8.
44. Abrate M, Baracchini P, Fulcheri E, Lapertosa G, Pantarotto MF, Mastroiacovo P. Studio epidemiologico dell'encefalia in Italia e rilievi anatomopatologici sui casi di nostra osservazione. *Pathologica* 1990;82:133-54.
45. Källén B, Cocchi G, Knudsen LB, Castilla EE, Robert E, Daltveit AK, y cols. International study of sex ratio and twinning of neural tube defects. *Teratology* 1994;50:322-31.
46. Whiteman D, Murphy M, Hey K, O'Donnell M, Goldacre M. Reproductive factors, subfertility, and risk of neural tube defects: a case-control study based on the Oxford Record Linkage Study Register. *Am J Epidemiol* 2000;152:823-8.
47. Main DN, Mennuti MT. Neural tube defects: issues in prenatal diagnosis and counselling. *Obstet Gynecol* 1986;67:1-15.
48. Czeizel A, Metneki J. Recurrence risk after neural tube defects in a genetic counselling clinic. *J Med Genet* 1989;26:160-6.
49. Byrne J, Cama A, Vigliarolo M, Levato L. Patterns of inheritance in Irish and Italian families with neural tube defects: comparison between high and low rate areas. *Ir Med J* 1997;90:32-4.
50. Wild J, Read AP, Sheppard S, Seller MJ, Smithells RW, Nevin NC, y cols. Recurrent neural tube defects, risk factors and vitamins. *Arch Dis Child* 1991;66:1223-6.
51. Bound JP, Francis BJ, Harvey PW. Neural tube defects, maternal cohorts, and age: a pointer to aetiology. *Arch Dis Child* 1991;66:1223-6.
52. Owen TJ, Halliday JL, Stone CA. Neural tube defects in Victoria, Australia: potential contributing factors and public health implications. *Aust N Z J Public Health* 2000;24:584-9.
53. Bound JP, Harvey PW, Francis BJ. Seasonal prevalence of major congenital malformations in the Fylde of Lancashire 1957-1981. *J Epidemiol Community Health* 1989;43:330-42.
54. Castilla EE, Orioli IM, Lugarinho R, Dutra GP, López-Camelo JS, Campana HE, y cols. Monthly and seasonal variations in the frequency of congenital anomalies. *Int J Epidemiol* 1990;19:399-404.
55. McKinley MC, Strain JJ, McPartlin J, Scott JM, McNulty H. Plasma homocysteine is not subject to seasonal variation. *Clin Chem* 2001;47:1430-6.
56. Vrijheid M, Dolk H, Stone D, Abramsky L, Alberman E, Scott JE. Socioeconomic inequalities in risk of congenital anomaly. *Arch Dis Child* 2000;82:349-52.
57. Balasch Cortina J, Ación Álvarez P, Egozcue J, Viscasillas Molins P, Comino Delgado R, Parrilla Paricio JJ. Aborto de repetición. En: Documentos de Consenso. S.E.G.O. 1996. Madrid: Meditex; 1996. p. 157-81.
58. Shiota K. Maternal fertility, reproductive loss, and defective human embryos. *J Epidemiol Community Health* 1989;43:261-7.
59. Carmi R, Gohar J, Meizner I, Katz M. Spontaneous abortion – high risk factor for neural tube defects in subsequent pregnancy. *Am J Med Genet* 1994;51:93-7.
60. Todoroff K, Shaw GM. Prior spontaneous abortion, prior elective termination, interpregnancy interval, and risk of neural tube defects. *Am J Epidemiol* 2000;151:505-11.

# 9 Las vertientes fisiológica y patológica del metabolismo del folato y de la homocisteína

## 9.1 Introducción

Las experiencias positivas sobre la prevención primaria de los defectos del tubo neural (DTNs) con ácido fólico (capítulo 10) han desplazado el interés de los científicos hacia el folato y otros compuestos relacionados con su metabolismo, es decir, la homocisteína y las vitaminas B<sub>12</sub> y B<sub>6</sub>; por lo tanto creemos que la explicación de estas vías metabólicas contribuirá a la mejor comprensión de los trabajos sobre la etiopatogenia y la prevención de las anomalías del tubo neural. Finalizamos este capítulo con la exposición de los mecanismos de defensa oxidativos, anticipando una serie de conceptos vinculados al metabolismo de los folatos que nos serán de utilidad para interpretar los resultados de la investigación original que detallamos en el capítulo 13.

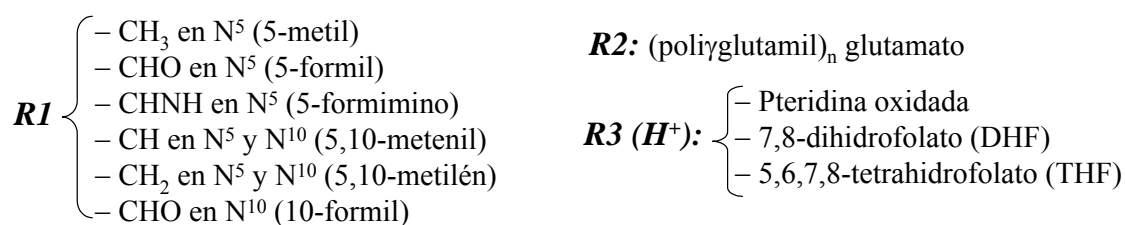
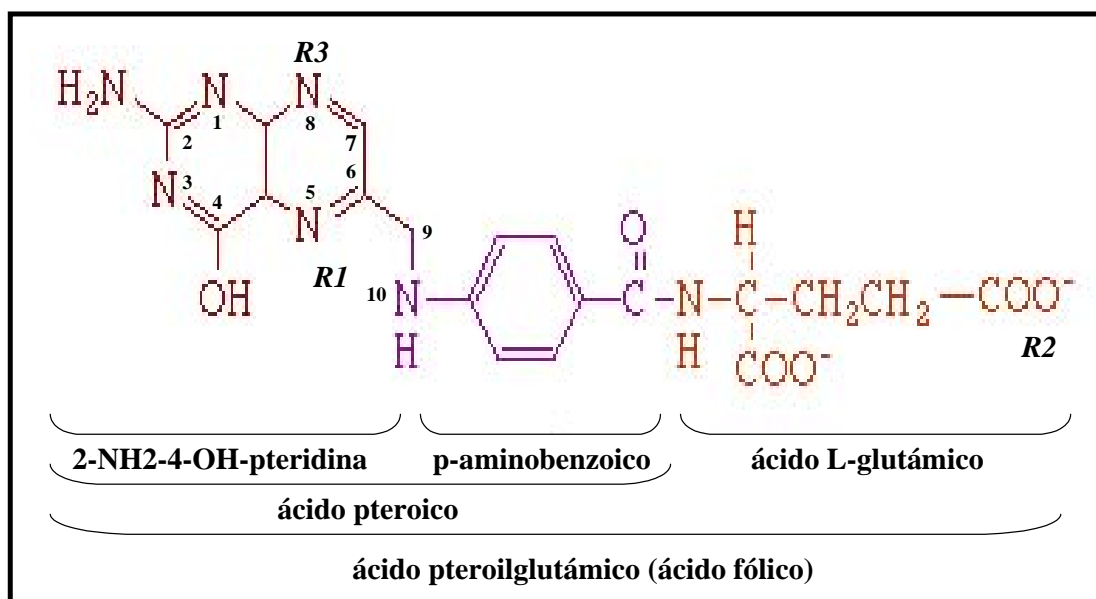
## 9.2 El ácido fólico

### 9.2.1 Concepto y estructura química<sup>1,2</sup>

Folatos es el término genérico que se utiliza para denominar una vitamina hidrosoluble del grupo B, que interviene en las reacciones de transferencia de radicales monocarbonados. El ácido fólico o folato es una molécula constituida por un anillo de pteridina, ácido paraaminobenzoico (PABA) y un residuo de ácido glutámico (ácido pteroilglutámico). La denominación de ácido fólico se introdujo en 1941 y procede del latín “folium” u hoja, puesto que abunda en los vegetales de hoja verde. Pocos años más tarde, esta vitamina se sintetizó en forma de pteroilmonoglutamato, que es la forma más oxidada y termoestable, por lo tanto, es la que se utiliza en la mayoría de suplementos vitamínicos y en la fortificación de alimentos. Los compuestos derivados de la molécula básica (pteroilglutamato)<sup>3</sup> se representan en la figura 9.1.

Los residuos de ácido glutámico se unen entre sí mediante enlaces  $\gamma$ -peptídicos; si la molécula tiene hasta tres residuos glutámicos hablamos de oligoglutamatos, mientras que los poliglutamatos tienen un número de residuos superior. El folato total agrupa a los mono y oligoglutamatos (folato libre) y a los poliglutamatos.

Figura 9.1.- Estructura química de los folatos.



## 9.2.2 Absorción, transporte, almacenamiento y eliminación

En la naturaleza hay hasta 150 coenzimas distintos de los folatos<sup>4</sup>. Las fuentes alimentarias más ricas en folatos son los vegetales de hoja verde, el zumo de naranja, las legumbres, el hígado y los riñones. En los alimentos, los folatos están en forma de poliglutamatos de las distintas variedades del tetrahidrofolato (THF) exhibidas en la figura 9.1<sup>3,5</sup>, pero las coenzimas más abundantes son el N<sup>5</sup>-metil-THF, seguido del formil-THF<sup>4</sup>. El N<sup>5</sup>-metil-THF se oxida a N<sup>5</sup>-metil-5,6-dihidrofolato que llega a constituir hasta el 50% del folato alimentario.

En la etapa postprandial el pH gástrico es ligeramente ácido (pH 3,5) y el N<sup>5</sup>-metil-5,6-dihidrofolato se degrada. La presencia del ácido ascórbico endógeno en el lumen gástrico posibilita la conversión del N<sup>5</sup>-metil-5,6-dihidrofolato en N<sup>5</sup>-metil-THF que es más estable<sup>6</sup>, este factor es crucial para optimizar la biodisponibilidad del folato. Los folatos se hidrolizan a monoglutamatos mediante una enzima asociada al ribete en cepillo intestinal, la pteroil-γ-glutamil-hidrolasa (también denominada conjugasa y pteroilpoliglutamil hidrolasa; EC 3.4.19.9), aunque es posible cierta contribución de la secreción pancreática a esta hidrólisis<sup>7</sup>. La absorción tiene lugar en el yeyuno proximal mediante un mecanismo de transporte activo que es pH-dependiente y saturable, de forma que si las concentraciones intestinales de folato

superan los 5-10  $\mu\text{mol/L}$  se recurre a la difusión pasiva<sup>8</sup>, a consecuencia de la saturación del primer mecanismo.

Sólo los monoglutamatos o, como mucho, los oligoglutamatos pueden atravesar el enterocito. El pH óptimo para el transporte del folato es de 5<sup>8</sup> y para la hidrólisis de los residuos glutámicos es de 6-7<sup>9</sup>. Dentro de la célula entérica, el ácido pteroilglutámico se transforma en THF, gracias a la dihidrofolato reductasa (EC 1.5.1.3), después se metila ( $\text{N}^5$ -metil-THF) y pasa al torrente circulatorio. Aún no se ha esclarecido si la metilación del THF tiene lugar dentro del enterocito o dentro del hepatocito<sup>10</sup>.

Dos terceras partes del  $\text{N}^5$ -metil-THF del plasma están unidas a proteínas. La mitad del folato plasmático se une de forma laxa a la albúmina, proteína inespecífica y de baja afinidad; aunque también hay otros ligandos de mayor afinidad (ver más adelante), pero en bajas concentraciones<sup>1</sup>.

El paso del folato a las células acontece mediante dos mecanismos:

- El primero depende de una proteína de transporte (RFC o reduced folate carrier) y consume energía. Tiene mayor afinidad por el  $\text{N}^5$ -metil-THF que por el ácido pteroilglutámico, y también acumula metotrexate y otros agentes antifolato. Es primordial para el transporte de folatos hacia el interior de las células tumorales y actúa a altas concentraciones de los mismos (rango micromolar)<sup>11</sup>.
- El segundo utiliza diferentes isoformas de receptores de folatos (FRs) y tiene mayor afinidad para el pteroilglutamato que por otras formas reducidas de folatos como el  $\text{N}^5$ -metil-THF o el  $\text{N}^5$ -formil-THF. Su afinidad por los folatos es alta a concentraciones nanomolares. Aunque se hallan en líquidos extracelulares, sobre todo son proteínas de membrana, cuya expresión se regula negativamente a mayor concentración de folatos extracelulares. Distinguimos las formas solubles de FRs y las ligadas a la membrana celular. La fracción soluble protege a los folatos reducidos de la oxidación y es una forma de almacenamiento. La fracción de membrana acumula el folato en la superficie celular y lo transporta dentro de las células<sup>12</sup>. Las isoformas humanas conocidas de FRs son el  $\text{FR}\alpha$ ,  $\text{FR}\beta$ ,  $\text{FR}\gamma$  y  $\text{FR}'\gamma$  (se cree que las dos últimas son las variedades solubles)<sup>13-4</sup> y el gen codificante se localiza en la región 11q13.3-11q13.5<sup>15</sup>. La placenta contiene  $\text{FR}\alpha$  y  $\text{FR}\beta$  que ligan el  $\text{N}^5$ -metil-THF en su cara materna, después los niveles de este coenzima se concentran en sangre intervellosa hasta tres veces más que en sangre materna, y por último difunden de forma pasiva hacia la circulación fetal<sup>16</sup>. De hecho, la concentración de ácido fólico en el feto es superior a la materna<sup>17</sup>. Aunque parece que la placenta provee de suficiente folato al feto, nada se sabe del transporte del folato antes de la formación placentaria.

Al pasar el  $\text{N}^5$ -metil-THF a los tejidos se utiliza como sustrato de la metilfolato-homocisteína metiltransferasa o metionina sintetasa (MTR; EC 2.1.1.13), que lo transforma en THF monoglutamato. La enzima folipoliglutamato sintetasa (EC 6.3.2.17) le añade cadenas de ácido glutámico y lo convierte en THF hexaglutamato. Parece que los folilpenta y hexaglutamatos son los coenzimas intracelulares activos<sup>18</sup>, esto es, sólo los poliglutamatos y especialmente los penta y hexaglutamatos

son las formas metabólicamente funcionales. Las cadenas de glutamatos favorecen la retención celular, regulan las velocidades de las reacciones y permiten el paso de sustratos de unos enzimas a otros<sup>4</sup>. Los poliglutamatos del THF se pueden hidrolizar a monoglutamatos mediante una conjugasa intracelular y pasar a la circulación. El hígado es la reserva principal de los folatos puesto que es la primera víscera que lo capta postabsorción a través de la circulación portal; allí quedan retenidos, o se liberan a la sangre o a la bilis. Otros órganos destacados en el almacenamiento de folatos son el páncreas, los riñones y el cerebro.

Las reservas de folato del organismo se han estimado a partir de las concentraciones de folato en material de biopsias hepáticas (4,5-10  $\mu\text{g/g}$ )<sup>19</sup>. Entonces, si el hígado femenino pesa aproximadamente 1200 g, dentro del mismo habría entre 5,4 y 12 mg de folatos. Si asumimos que el 50% de las reservas de folatos son hepáticas, entonces cada mujer dispone de un depósito de folatos de entre 11 y 24 mg.

Los folatos se catabolizan mediante el clivaje o escisión de los folilpoliglutamatos intracelulares en el enlace C<sup>9</sup>-N<sup>10</sup>, que resulta en p-aminobenzoilpoliglutamatos que se hidrolizan a monoglutamatos, los cuales se N-acilan antes de su excreción. Entonces, el folato excretado está constituido principalmente por moléculas de folato escindidas. Las moléculas de folato intactas sólo representan una mínima parte, ya que la mayor parte del folato secretado es reabsorbido en el túbulo proximal renal. La excreción biliar de folato se estima en 100  $\mu\text{g}$  diarios<sup>20</sup>, pero la mayor parte del mismo se reabsorbe en el intestino delgado (circulación enterohepática<sup>21</sup>). Es difícil distinguir entre el folato fecal excretado y el sintetizado por la flora intestinal<sup>22</sup>.

Si las dosis de ácido fólico ingeridas son altas (a partir de 400-1000  $\mu\text{g}$ ) aparece en sangre el pteroilmonoglutamato sin metabolizar<sup>23-5</sup>, puesto que los procesos habituales de reducción y metilación no tienen lugar. Así, tras la administración oral de dosis únicas de folato sintético entre 0,1 y 0,2 mg a adultos sanos, sólo se detectan trazas de folato en la orina; en cambio, si las dosis administradas son superiores, la capacidad máxima de reabsorción tubular se ve sobrepasada y el folato excedente se excreta sin metabolizar en la orina. Tras dosis de 2,5-5 mg, un 50% de la dosis se elimina por orina y tras una dosis de 15 mg hasta el 90% de la dosis se puede recuperar de la orina<sup>25</sup>.

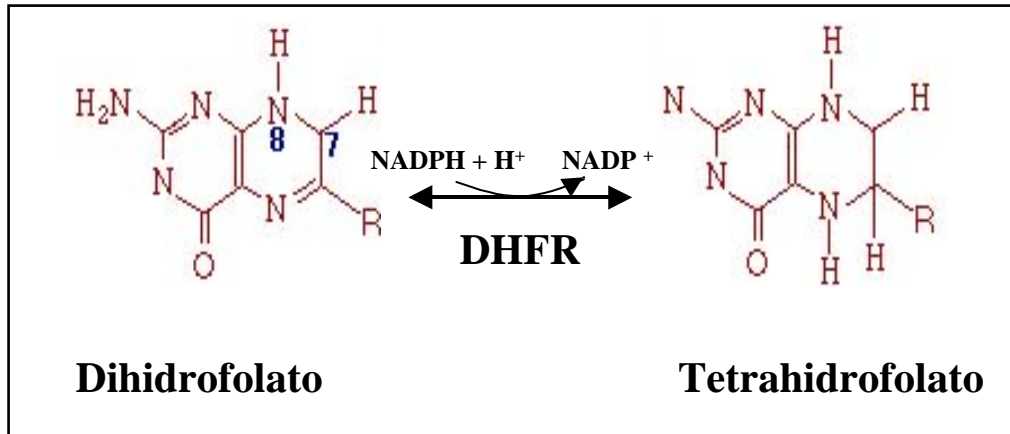
### 9.2.3 Funciones metabólicas

Como hemos visto, la forma activa del folato es el THF. Para disponer de THF se tienen que producir dos reacciones catalizadas por la misma enzima, la dihidrofolato reductasa. De ahí que la inhibición o ausencia de la misma conduce a la deficiencia clínica de folatos (figura 9.2). La secuencia de sustratos y productos es: el folato se reduce a dihidrofolato, y el dihidrofolato se reduce de nuevo a THF.

Ya hemos señalado que la función característica de los folatos es el transporte de radicales monocarbonados. Los mismos proceden del metabolismo de ciertos aminoácidos, como veremos. Los radicales transferidos son los correspondientes a R1 en la figura 9.1, y determinan las diferentes variedades de THFs (N<sup>5</sup>-metil-THF,

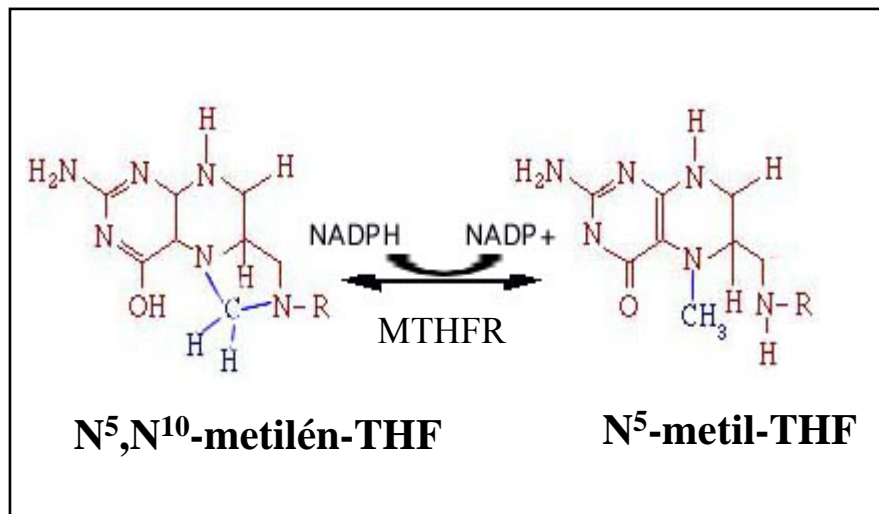
$N^5, N^{10}$ -metilén-THF, etc.). Los distintos THFs se pueden interconvertir entre sí gracias a una serie de reacciones químicas, un ejemplo de las cuales se representa en la figura 9.3.

**Figura 9.2.- Activación del ácido fólico.**



DHFR (dihidrofolato reductasa; EC 1.5.1.3), NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato).

**Figura 9.3.- Interconversión entre  $N^5, N^{10}$ -metilén-THF y  $N^5$ -metil-THF.**



MTHFR ( $N^5, N^{10}$ -metilén-THF reductasa; EC 1.7.99.5), NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato).

En los humanos tienen lugar cinco reacciones que son folato-dependientes:

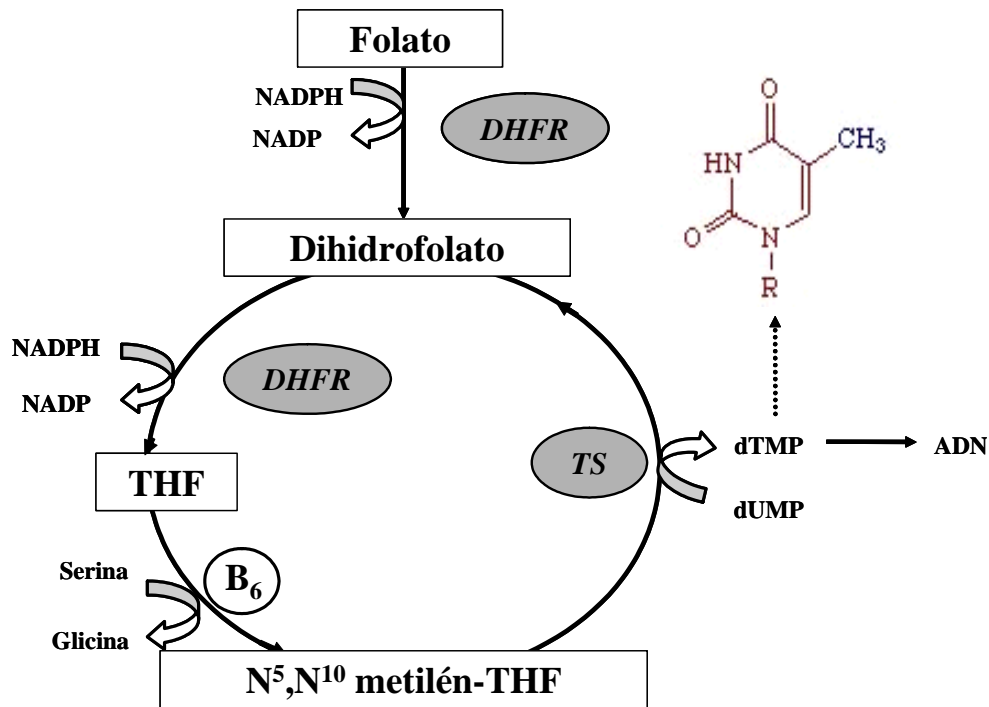
1. Conversión de dUMP (ácido desoxiuridílico) a dTMP (ácido desoxitimidílico), nucleótido precursor de la base nitrogenada pirimidínica timina. Esta reacción es la única que genera dihidrofolato in vivo y es vital para la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN), de forma que si no hubiera suficiente folato para llevarse a cabo, la replicación del ADN y la mitosis se verían comprometidas (figura 9.4).
2. Síntesis de las purinas mediante el aporte de los carbonos de las posiciones



dos y ocho (figura 9.5). Los folatos transfieren los radicales formato del N<sup>10</sup>-formil-THF para la síntesis de formilglicinamida ribonucleótido (FGAR) y 5-formilaminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (FAICAR), que son precursores de las bases purínicas.

3. Remetilación de la homocisteína (Hcy) para transformarla en metionina (figura 9.6). Los fallos de esta vía metabólica son tanto más importantes, cuanto más escasa es la metionina exógena. La enzima MTR cataliza el paso de Hcy a metionina y utiliza la vitamina B<sub>12</sub> (metilcobalamina) como cofactor. Un derivado de la metionina, la S-adenosil-metionina (SAME) es el mayor transportador de metilos del organismo, esto es, interviene en más de 100 reacciones de transmetilación. Los aceptores de los metilos son el ADN, la adrenalina, la carnitina, la coenzima Q10, la mielina, la melatonina, la metilcobalamina y los compuestos participantes en reacciones de detoxificación, entre otros<sup>26</sup>. Explicaremos esta vía de forma pormenorizada más adelante.

**Figura 9.4- Síntesis del desoxitimidilato.**



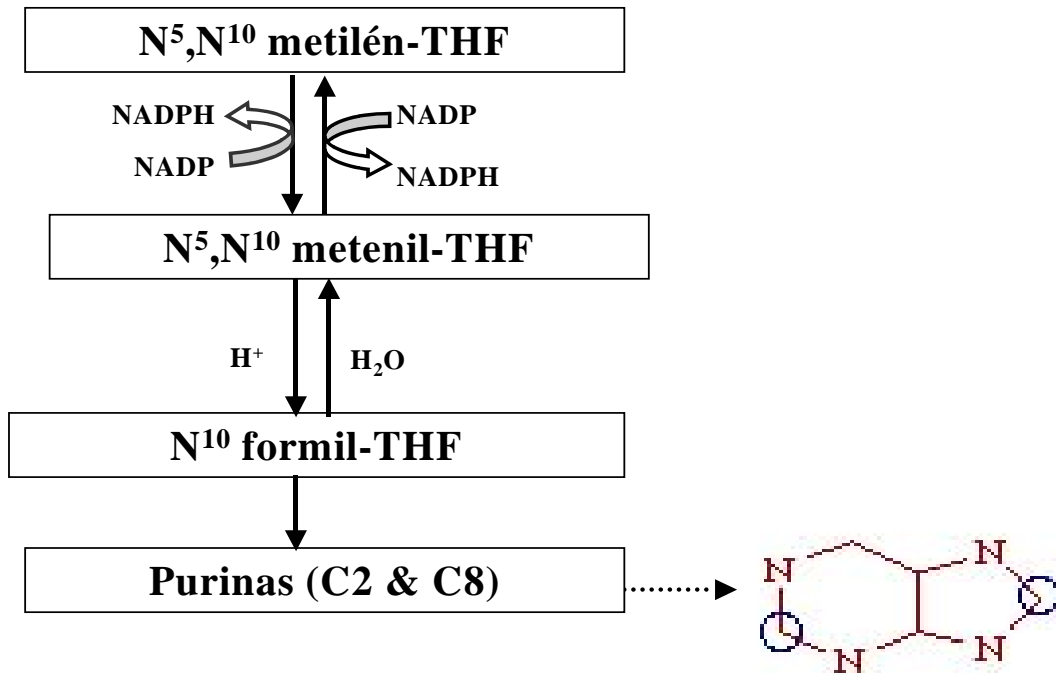
DHFR (dihidrofolato reductasa; EC 1.5.1.3), NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), TS (timidilato sintetasa), dUMP (desoxiuridilato), dTMP (desoxitimidilato).

4. Paso de serina a glicina. La serina es probablemente la mayor fuente de grupos monocarbonados transferidos por los folatos. La serina procede de la glucosa.
5. Hidrólisis de histidina a glutamato, mediante la cual el THF se transforma en formimino-THF.

En definitiva, las funciones metabólicas del folato se concretan en su participación en la síntesis de ácidos nucleicos y en la interconversión de aminoácidos. El folato aporta los carbonos necesarios para la producción de bases purínicas (adenina

y guanina) y pirimidínicas (timina); interviene en el catabolismo de la histidina a glutamato, en la conversión de Hcy a metionina y en la interconversión serina-glicina; también acumula y transfiere formatos. En la figura 9.7 se representan todas las vías metabólicas conocidas en las que interviene el folato<sup>27</sup>.

**Figura 9.5- Papel de los folatos en la síntesis de los precursores de las purinas.**



THF (tetrahidrofolato), NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato).

## 9.2.4 Requerimientos

Los humanos dependemos completamente del aporte exógeno de folatos. Los folatos naturales de la dieta son menos biodisponibles que los sintéticos (ácido fólico y folínico o N<sup>5</sup>-formil-tetrahidrofolato).

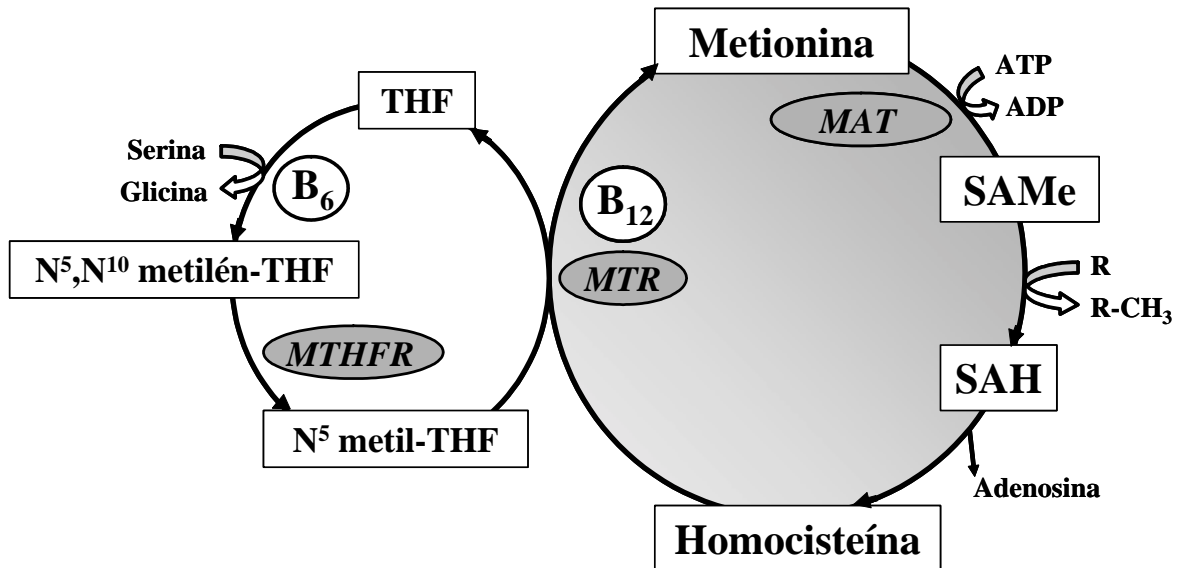
Según el Institute of Medicine, el RDA (Recommended Daily Allowance) para los varones y mujeres de EE.UU. y Canadá es de 400 µg diarios de equivalentes dietéticos del folato (EDFs). Un µg de EDF = 0,6 µg de ácido fólico sintético tomado durante las ingestas = 0,5 µg de ácido fólico sintético tomado en ayunas = 1 µg folato de la dieta. En las mujeres de edad fértil se recomienda obtener los 400 µg diarios a partir de folatos sintéticos y además consumir una cantidad adicional e indeterminada de los mismos a partir de una dieta variada, con el fin de prevenir los DTNs<sup>2</sup>.

Según el Comité Científico para la Alimentación de la Unión Europea, el PRI (Population Reference Intake) es de 200 µg/día de folatos para adultos europeos, aunque se reconoce la utilidad de tomar 400 µg/día periconcepcionales en forma de suplementos<sup>28</sup>.

El RDA y el PRI son términos equivalentes, es decir, son las ingestas dietéticas

promedio diarias que son suficientes para satisfacer los requerimientos de nutrientes del 97,5% de los individuos sanos.

Figura 9.6.- Remetilación de la homocisteína.

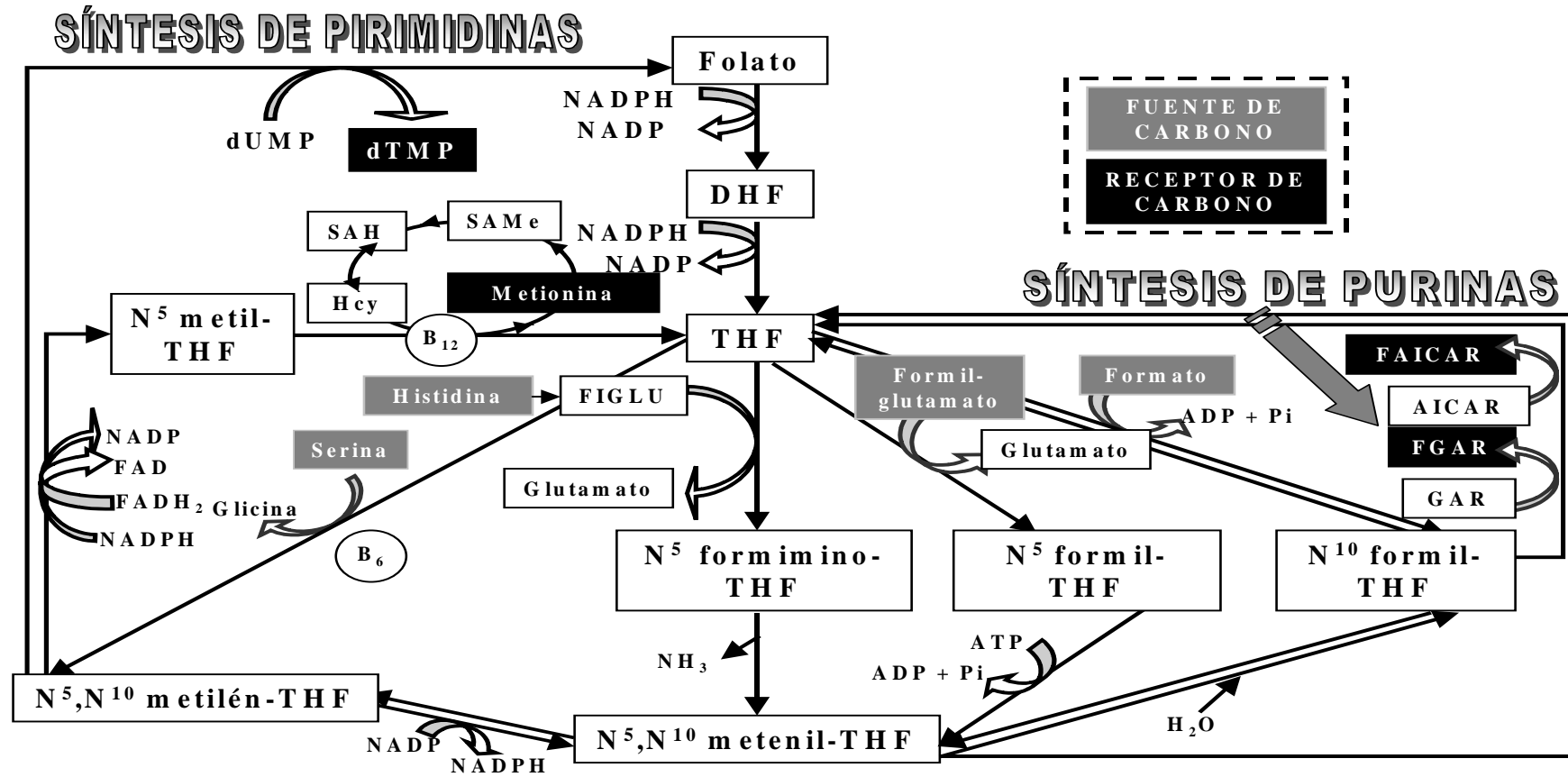


MTHFR ( $N^5,N^{10}$ -metilén-tetrahidrofolato reductasa), MTR (metionina sintetasa), MAT (metionina adenosil transferasa), ATP (adenosín trifosfato), ADP (adenosín difosfato), SAME (S-adenosil-metionina), R (receptor o aceptor), SAH (S-adenosil-homocisteína).

## 9.2.5 Cifras de frecuencia de la deficiencia de folatos

Las enfermedades por carencia de nutrientes no representan a priori un problema de salud para los países desarrollados pero, como veremos, el déficit subclínico de los micronutrientes abordados en este capítulo predispone a enfermedades cardiovasculares u oncológicas, que en España causan el 60% de la mortalidad<sup>29</sup>. La deficiencia de ácido fólico es una de las más frecuentes en los países desarrollados, siendo los sectores más vulnerables los adolescentes, las gestantes, las ma-

Figura 9.7.- Metabolismo del ácido fólico.



ADP (adenosín difosfato), AICAR (5-amidoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido), ATP (adenosín trifosfato), DHF (dihidrofolato), dUMP (ácido desoxiuridílico), dTMP (ácido desoxitimidílico), FAD (flavina adenina dinucleótido), FAICAR (5-formilaminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido), FGAR (formilglicinamida ribonucleótido), FIGLU (ácido formiminoglutámico), GAR (glicinamida ribonucleótido), Hcy (homocisteína), NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), SAH (S-adenosil-homocisteína), SAMe (S-adenosil-metionina), THF (tetrahydrofolato).

dres lactantes y los ancianos. Aun con todo, es difícil aventurar datos sobre su frecuencia, máxime cuando no se dispone de un patrón oro para el diagnóstico de esta deficiencia ni de un punto de corte aceptado de forma unánime para clasificar el status de folatos de un individuo.

Los datos epidemiológicos sobre el status de folatos en España de los que disponemos proceden del Estudio Nacional de Nutrición y Alimentación (ENNA 91)<sup>30</sup>, del estudio eVe<sup>31</sup>, de la Evaluación del Estado Nutricional de la Población Catalana (1992-1993)<sup>32</sup> y de la Encuesta de Nutrición Valenciana de 1994<sup>33</sup>. Estas investigaciones se basan tanto en encuestas dietéticas como en indicadores bioquímicos, y ambas fuentes de datos son complementarias al estar expuestas a errores no coincidentes<sup>34</sup>. El folato sérico es el indicador bioquímico utilizado en los estudios basados en determinaciones analíticas, sin embargo, éste valora la ingesta reciente de los mismos y no la situación de sus reservas<sup>35</sup>. Además, lo deseable es considerar conjuntamente las concentraciones de cobalamina y de folatos, puesto que en presencia de concentraciones bajas de cobalamina sérica el folato sérico aumenta y el eritrocitario disminuye<sup>36-7</sup>.

El estudio ENNA 91 se basa en encuestas de presupuestos familiares de 1991<sup>30</sup>. Lamentablemente, estas encuestas sólo nos brindan datos indirectos. Si escogemos como punto de corte el PRI de 200 µg, únicamente las Comunidades Autónomas de Castilla-La Mancha, Galicia, La Rioja y Navarra alcanzan esta cifra de ingesta media<sup>30</sup>. Al contrario, el estudio eVe sobre las vitaminas en la alimentación de los españoles<sup>31</sup> nos aporta resultados distintos. Así, la ingesta media de folatos entre la población femenina fue de 252 µg diarios, lo cual supera claramente el PRI para esta vitamina. Sólo la región geográfica del Noroeste de España tiene una ingesta media inferior al PRI (172 µg diarios para las mujeres). Las determinaciones bioquímicas ponen de manifiesto niveles subóptimos de folatos séricos que afectan a más del 5% de la población en Andalucía, País Vasco y Canarias. Los grupos más susceptibles a la depleción de folatos son los individuos de edad más avanzada, los viudos, las mujeres que viven solas y de nivel de instrucción o entorno socioeconómico bajos. El estudio de García Closas y cols.<sup>32</sup> sobre determinaciones séricas de vitaminas en una submuestra de 372 individuos entre 18 y 75 años que participó en la Evaluación del Estado Nutricional de la Población Catalana (1992-1993) mostró una concentración media de 8,5 ng/mL de folato sérico para el total de los individuos estudiados, no existiendo diferencias significativas entre sexos salvo para el grupo de edad entre 50 y 64 años en el que la concentración fue superior en las mujeres que en los varones. El 5,6% de individuos de la muestra mostraron valores de folato sérico inferiores o iguales a 4,5 ng/mL, este porcentaje ascendió al 12,9% en las mujeres de 18 a 34 años. Aparte de la edad, el consumo de alcohol superior a 20 g diarios y el tabaquismo fueron más frecuentes entre los individuos con los niveles más bajos de folato sérico<sup>32</sup>. Vioque y cols.<sup>33</sup> informaron que la ingesta media estimada para 538 mujeres entre 15 y 44 años participantes en la Encuesta de Nutrición Valenciana de 1994 era de 392 µg diarios. Aunque sólo el 2,2% de las mujeres presentaron un consumo de ácido fólico inferior a 200 µg, el 58% ingirieron menos de 400 µg diarios. Las mujeres más jóvenes, con menor práctica deportiva, menor masa corporal y menarquia más temprana eran más proclives al consumo inferior a 400 µg/día. Los datos expuestos si bien no son plenamente coincidentes, hecho que atribuimos a la distinta metodología, a las diferentes poblaciones escrutadas, y a los indicadores y pun-

tos de corte utilizados tienen como nexo común la elevada prevalencia de mujeres en edad fértil que no llegan al RDA del Institute of Medicine.

Con respecto a los EE.UU. queremos destacar que, según la encuesta NHANES III (Third National Health and Nutrition Examination Survey), realizada entre 1988 y 1994 sobre población civil no institucionalizada, las concentraciones medias de folato sérico y eritrocitario fueron de 7,2 y 196 ng/mL respectivamente, y el grupo más susceptible a la deficiencia de folatos fueron los hispanos<sup>38</sup>. Tras la implantación de la fortificación alimentaria con folatos las concentraciones medias de folato sérico han pasado de 6,3 ng/mL a 16,2 ng/mL en el grupo de mujeres entre 15 y 44 años de edad, mejora que es atribuible a la antedicha medida de salud pública<sup>39</sup>.

## 9.2.6 Etiología de la deficiencia de folatos

Las causas de depleción de folatos vienen especificadas en la tabla 9.1<sup>1,5,21,31,37,40-2</sup>.

## 9.2.7 Clínica de la deficiencia de folatos

La depleción de folatos comprende las siguientes manifestaciones ordenadas cronológicamente: disminución primero del folato sérico y después del eritrocitario, aumento de la Hcy plasmática, cambios megaloblásticos en la médula ósea y en otros tejidos de división celular rápida (epitelios), hipersegmentación de leucocitos polimorfonucleares en sangre periférica, macrocitosis y descenso de hemoglobina. La manifestación clínica más característica es la anemia megaloblástica que en su fase avanzada se acompaña de cierto grado de leucopenia y trombopenia. La “regla de los cinco” es útil para el diagnóstico de la hipersegmentación neutrofilica propia de esta condición, esto es, más de un 5% de neutrófilos con cinco o más lóbulos tras el recuento de 100 neutrófilos<sup>43</sup>. La alteración epitelial se concreta en glositis, estomatitis y malabsorción a causa de atrofia vellositaria intestinal<sup>44</sup>.

Entonces, hay que sospechar deficiencia de folatos en caso de anemia inexplicada o macrocitosis. Si hay trastornos neuropsiquiátricos en pacientes con depleción de folatos hay que descartar un déficit coexistente de vitamina B<sub>12</sub> (ver más adelante).

Aunque el déficit de folatos se ha vinculado tradicionalmente a la anemia megaloblástica, un enfoque más moderno de esta deficiencia incluye manifestaciones en otros muchos órganos, por lo que la carencia de esta vitamina puede tener repercusión multisistémica<sup>44</sup>, como se verá en los párrafos siguientes.

**Tabla 9.1.- Causas de deficiencia de folatos según sus mecanismos etiopatogénicos (modificado de C. F. Snow<sup>37</sup>).**

Fisiología	Patogenia	Enfermedad/condición subyacente
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Los folatos de la dieta son poliglutamatos y han de hidrolizarse a monoglutamatos para absorberse.</li> <li>* El RDA para los folatos es de 400 µg/día de EDFs para adultos, 600 µg/día para gestantes y 500 µg/día para madres lactantes.</li> <li>* No está claro que la fibra alimentaria disminuya la biodisponibilidad de folato. Sólo el salvado de trigo puede afectar la absorción de ciertas formas de folato y sólo en condiciones muy concretas.</li> <li>* La retención alimentaria de los folatos depende del alimento portador y de la forma de preparación (oscila entre el 44% del brécol hervido y ausencia de cambios significativos para las patatas hervidas, carne a la plancha o cocción al vapor de espinacas y brécol).</li> </ul>	<p>El RDA sólo es de aplicación a personas sanas, pero no a las que tienen sus necesidades y/o requerimientos aumentados.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ingesta insuficiente: niños alimentados con leche de cabra (muy pobre en folatos), alcohólicos crónicos, ancianos con escasos recursos económicos.</li> <li>- Requerimientos aumentados: prematuros, infancia, gestación, lactancia, enfermedades con proliferación celular rápida (hemólisis, dermatitis exfoliativa, leucemias, etc.).</li> </ul>
<p>La absorción de los folatos se produce en el yeyuno, aunque su resección hace que el íleon supla parcialmente esta función.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ La disfunción y/o exéresis del yeyuno implica una disminución de la absorción.</li> <li>▪ El etanol disminuye la absorción de folatos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Celiaquía.</li> <li>- Esprúe tropical.</li> <li>- Enfermedad de Crohn.</li> <li>- Intestino corto.</li> <li>- Competición biológica con el folato dietético: sobrecrecimiento bacteriano.</li> <li>- Fármacos antifolato.</li> </ul>
<p>El hígado retiene el 50% de las reservas de folatos del organismo. La distribución del folato a otros tejidos depende fundamentalmente de la circulación enterohepática.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ La obstrucción del drenaje biliar causa un descenso inmediato de los niveles de folato sérico.</li> <li>▪ La ingesta de alcohol interfiere con la liberación de folato hepático a la bilis.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hepatopatías crónicas.</li> <li>- Cirrosis hepática.</li> <li>- Alcoholismo crónico.</li> </ul>
<p>Los folatos se catabolizan mediante el clivaje o escisión de los folilpoliglutamatos intracelulares en el enlace C<sup>9</sup>-N<sup>10</sup>, pero una mínima parte del folato excretado por vía urinaria son moléculas intactas, puesto que la mayor parte de folato secretado es reabsorbido en el túbulo proximal renal.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Las nefropatías causan mayor pérdida de folatos por defecto en la reabsorción tubular.</li> <li>▪ El etanol aumenta la excreción urinaria de folatos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Insuficiencia renal.</li> <li>- Diálisis.</li> <li>- Alcoholismo crónico.</li> </ul>

RDA (recommended daily allowance), EDFs (equivalentes dietéticos del folato).

### 9.2.7.1 Enfermedades cardiovasculares

El origen del vínculo entre la Hcy y la enfermedad cardiovascular procede de la constatación de la elevada morbimortalidad cardiovascular en los afectados por homocistinuria<sup>45</sup>. El conocido metaanálisis de Boushey<sup>46</sup> que incluyó 27 estudios sobre enfermedad vascular arteriosclerótica y Hcy, concluyó que por cada incremen-

to de 5  $\mu\text{mol/L}$  de Hcy total (tHcy) plasmática la odds ratio (OR) de desarrollo de cardiopatía isquémica aumentaba un 40%, y que el incremento de 5  $\mu\text{mol/L}$  era equivalente al de 20 mg/dL de colesterol. Análogamente, la enfermedad cerebrovascular y la arteriopatía ocliterante de extremidades inferiores mostraron una asociación significativa con los aumentos de Hcy. Como los niveles de tHcy plasmática constituyen un marcador funcional del status de folatos (capítulo 12), en este trabajo también se analizaron 11 estudios sobre la repercusión del ácido fólico en las concentraciones de tHcy y se objetivó que una ingesta de 200  $\mu\text{g/día}$  reducía los niveles de tHcy en 4  $\mu\text{mol/L}$ . Un metaanálisis más reciente de Wald y cols. ha obtenido resultados similares<sup>47</sup>. Otro estudio, del European Concerted Action Project<sup>48</sup>, reunió 750 casos de arteriosclerosis y 800 controles, y concluyó que el aumento de Hcy era un factor de riesgo independiente de enfermedad cardiovascular de cuantía similar al tabaquismo o a la hiperlipemia.

Tampoco faltan estudios que relacionen directamente la folicopenia y la enfermedad cardiovascular. En este contexto, el estudio de cohortes retrospectivo del Nutrition Canada Survey<sup>49</sup> incluyó 5056 varones y mujeres sin antecedentes personales de cardiopatía isquémica y halló una disminución de riesgo en torno al 70% del grupo con folato sérico superior a 6 ng/mL con respecto al grupo con niveles inferiores a 3 ng/mL. El estudio prospectivo del Nurses' Health Study<sup>50</sup> documentó el beneficio de la ingesta de folatos y de vitamina B<sub>6</sub> por encima del RDA para prevenir la cardiopatía isquémica en una cohorte de 80 082 mujeres mediante una reducción de riesgo del 30% en el quintil superior de ingesta de folatos frente al inferior. Por último, también se ha informado del beneficio del tratamiento conjunto con ácido fólico y vitaminas B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub> para la prevención de recurrencias entre afectados de cardiopatía isquémica tras haber sido sometidos a angioplastia coronaria percutánea<sup>51</sup>.

### 9.2.7.2 Enfermedades neuropsiquiátricas

El papel del ácido fólico en el sistema nervioso central no sólo se limita a su formación y desarrollo (capítulo 10), sino que se extiende a su preservación anatómica y funcional en las distintas etapas de la vida.

En la *infancia* y en la *adolescencia* los diferentes errores congénitos de la absorción y del metabolismo del folato causan una gran variedad de síntomas que se solapan entre sí, e incluyen retraso psicomotor, convulsiones y alteraciones del comportamiento, cuya base anatómica puede estar constituida por una mielinización anormal o por una vasculopatía. La deficiencia homocigota severa de la N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metilén-THF reductasa (MTHFR; EC 1.7.99.5), metabolopatía congénita del folato más prevalente causada por varias mutaciones del gen codificante de la MTHFR (MIM #236250), es la entidad que suele ocasionar las manifestaciones clínicas mencionadas<sup>52-3</sup> junto con concentraciones disminuidas de folato, metionina y SAME en el líquido cefalorraquídeo (LCR)<sup>54</sup>.

En la *edad adulta*, destacan la depresión, la degeneración subaguda combinada medular y las polineuropatías periféricas, siendo la primera más frecuente en la folicopenia y las dos últimas más características de la carencia de vitamina B<sub>12</sub><sup>44,55-6</sup>. No todas las folicopenias con repercusión neurológica cursan con anemia megaloblásti-



ca, y viceversa. Sin embargo, se cree que si estas anemias no se trataran aparecerían manifestaciones neuropsiquiátricas en casi todos los pacientes<sup>56</sup>.

En muestras de *población geriátrica* se ha detectado sobre todo deficiencia de vitamina B<sub>12</sub><sup>57-8</sup>, aunque también se ha informado de mayor prevalencia de depleción de folatos<sup>59-60</sup>, de la asociación de ambas deficiencias<sup>61</sup>, y de hiperhomocisteinemia<sup>62</sup> que en otros grupos de edad. Estas alteraciones analíticas se han correlacionado con cuadros depresivos, demencia y deterioro cognitivo<sup>63-5</sup>.

Los pacientes depresivos tienen niveles de folatos significativamente inferiores a los controles sanos<sup>66-9</sup>, aunque esta observación no se ha podido confirmar en algunos estudios<sup>70</sup>. Los suplementos con folatos han contribuido a la curación de pacientes deprimidos<sup>71-2</sup>, sin embargo no todas las investigaciones muestran resultados coincidentes<sup>73</sup>. Las hipótesis más recientes apuntan a que la depresión está causada por un desequilibrio en la relación receptores-neurotransmisores, principalmente en el sistema límbico. Los receptores presinápticos son los responsables del almacenamiento, liberación y captación de neurotransmisores, entre los que destacan las monoaminas serotonina y noradrenalina. Los fármacos inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, utilizados exitosamente en el tratamiento de la depresión, bloquean la captación de la serotonina, favoreciendo su presencia en la hendidura intersináptica<sup>74</sup>. El vínculo entre la depresión y los folatos parece originarse en las monoaminas. El N<sup>5</sup>-metil-THF, predominante en el LCR<sup>75</sup>, transfiere su radical metilo para la síntesis de SAME, implicada en las reacciones de metilación de fosfolípidos, neurotransmisores, y monoaminas<sup>76</sup>. Kaufman ha propuesto otra hipótesis explicativa de las depresiones folato-sensibles en la que el N<sup>5</sup>-metil-THF regeneraría la tetrahidrobiopterina, cofactor esencial para las hidrolasas o enzimas claves en la síntesis de monoaminas<sup>77</sup>.

Botez y cols. relacionaron el déficit de folatos con la degeneración medular subaguda combinada, las fatigas muscular e intelectual y las polineuropatías, aisladas o asociadas entre sí<sup>78-80</sup> y encontraron un sustrato anatómico de atrofia cerebral<sup>79</sup>. La degeneración subaguda combinada de la médula espinal es el resultado de la degeneración progresiva de la mielina, que afecta inicialmente a los nervios periféricos largos y a las astas posteriores de la médula espinal, alcanzando con el tiempo las astas espinales laterales y los haces espinocerebelosos y piramidales. La clínica incluye parestesias, pérdida de sensibilidad vibratoria, hiporreflexia y ataxia. Eventualmente, pueden aparecer espasticidad y paraplejía. Los casos avanzados no responden al tratamiento, son irreversibles y potencialmente mortales<sup>44</sup>. Parece que la degeneración mielínica es secundaria a la hipometilación derivada de la restricción de la síntesis de SAME y a la acumulación del inhibidor de la metilación S-adenosil-Hcy<sup>81</sup>. Las polineuropatías folato-sensibles son cuadros de afectación neurosensorial de simetría variable, afectación predominante de extremidades inferiores, hiporreflexia, disminución de la sensibilidad vibratoria y síndrome de piernas inquietas ("restless legs syndrome")<sup>80.82</sup>.

El estudio de las alteraciones neuropsiquiátricas folato-sensibles se ha visto obstaculizado por el desconocimiento del nivel a partir del cual el déficit de folatos repercute en el sistema nervioso central. Es muy probable que la duración, la magnitud de la deficiencia y la existencia de factores predisponentes modulen la relación de los folatos con el tejido nervioso<sup>56</sup>. Obviamente, aunque los hallazgos menciona-

dos nos hacen albergar nuevas perspectivas con respecto a la prevención y al tratamiento de las enfermedades neuropsiquiátricas, no es menos cierto que la utilidad de los suplementos con folatos está pendiente de confirmar mediante ensayos clínicos randomizados.

### 9.2.7.3 Neoplasias

La predisposición al cáncer mediada por los folatos se atribuye a hipometilación del ADN, fragilidad cromosómica<sup>83-6</sup> e incorporación de uridilato en el ADN en lugar del timidilato<sup>87</sup>. El déficit de folatos se ha asociado al desarrollo de múltiples cánceres entre los que destacan el de cérvix y el colorrectal.

Con respecto al cuello uterino, destacamos el estudio de casos y controles de Butterworth y cols., que estimó una OR ajustada significativa de 5,1 de infección por el HPV-16 entre mujeres con concentraciones de folato eritrocitario por debajo de 304 ng/mL<sup>88</sup>. Las pacientes con uno o dos alelos con la mutación C677T (variante termolábil de la MTHFR) (capítulo 10) e ingestas de folatos por debajo de la mediana tuvieron una OR de 5,0 de lesión intraepitelial en comparación con las mujeres sin la mencionada mutación e ingestas de folatos por encima de la mediana<sup>89</sup>. Al contrario, los estudios sobre concentraciones de folato sérico y cáncer cervical invasivo no han podido mostrar incrementos de riesgo estadísticamente significativos para aquellas pacientes con niveles inferiores<sup>90-2</sup>.

Se ha averiguado que los suplementos con folatos reducen el cáncer de colon en un 62% en los pacientes con colitis ulcerosa frente a los que no los toman<sup>93</sup>. Además, los portadores homocigotos de la variante termolábil de la MTHFR tienen una frecuencia inferior de cáncer de colon<sup>94-5</sup> que se atribuye a los altos niveles de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metilén-THF lo cual frena la incorporación incorrecta de uridina en el ADN.

Una revisión de 2001 que recogió la evidencia epidemiológica existente sobre folatos y cánceres colorrectal, mamario y cervical<sup>96</sup> concluyó que:

- El efecto del folato sobre el cáncer cervical está pendiente de dilucidar.
- Los estudios epidemiológicos apoyan una asociación inversa entre el status de folatos y el padecimiento de adenomas y carcinomas colorrectales.
- Existe una relación inversa entre la aparición de cáncer de mama y los folatos en las mujeres que consumen dos o más bebidas alcohólicas diarias de forma regular.

### 9.2.7.4 Enfermedades gestacionales

El metabolismo del folato y de la Hcy también se ha estudiado con referencia a distintas anomalías congénitas aparte de los DTNs y a un amplio espectro de enfermedades propias de la gestación. En el capítulo 11 se proporciona una muestra representativa de los abundantes trabajos publicados sobre la protección que ejercen los folatos contra las fisuras labiopalatinas, la reducción de extremidades, las malforma-

ciones nefrourológicas y las cardiopatías congénitas. Sólo deseamos destacar una nueva línea de investigación sobre la trisomía 21 abierta por James y cols., y dada a conocer por medio de un trabajo sobre 57 madres de niños con síndrome de Down y 50 controles apareados por edad<sup>97</sup>. Los resultados mostraron un aumento significativo de tHcy plasmática y una mayor linfotoxicidad por metotrexate entre los casos. Muy recientemente se ha publicado una investigación sobre 493 familias con alto riesgo de DTN y 516 familias con riesgo elevado de síndrome de Down, en las que se ha evidenciado un número muy superior al esperado de trisomías 21 y DTNs respectivamente, fenómeno que nos aporta otra prueba sobre un posible origen común de los DTNs y esta aneuploidía<sup>98</sup>.

En cuanto a las complicaciones obstétricas y los resultados perinatales adversos destacamos dos estudios. El primero es un metaanálisis de Nelen y cols. sobre la hiperhomocisteinemia y el aborto recurrente<sup>99</sup> en el que se calculó un riesgo conjunto significativo de 2,1 para niveles de tHcy basales considerados elevados por los autores de los estudios aislados (siempre superiores a 10  $\mu\text{mol/L}$ ). El segundo proviene del Hordaland Homocysteine Study e incluyó 5883 mujeres entre 40 y 42 años. Los ORs significativos obtenidos al comparar el cuartil superior de tHcy plasmática con el inferior fueron de 1,38 para la prematuridad, y de 2,01 para el crecimiento intrauterino retardado. La OR ajustada para el desprendimiento prematuro de placenta de las concentraciones superiores a 15  $\mu\text{mol/L}$  comparadas con las inferiores fue significativo y alcanzó el valor de 3,13<sup>100</sup>. Por último, nos permitimos recomendar las revisiones sobre folatos y problemas obstétricos de Mahomed<sup>101</sup> y de Scholl y Johnson<sup>102</sup> que revisan la evidencia existente y su calidad.

## 9.3 La vitamina B<sub>12</sub>

### 9.3.1 Concepto y estructura química

La vitamina B<sub>12</sub> o cobalamina es el nombre genérico de un grupo de compuestos corrinoideos, es decir, constituidos por un anillo tipo corrina con un átomo de cobalto en el centro (figura 9.8)<sup>103</sup>. La corrina es un anillo tetrapirrólico, estructura compartida por el grupo heme y las porfirinas. Las variedades de vitamina B<sub>12</sub> vienen determinadas por los radicales que se unen al ion cobalto: cianocobalamina (grupo cianuro o -CN), hidroxicobalamina (grupo hidroxilo u -OH), hidrocobalamina (H<sub>2</sub>O), adenosilcobalamina (grupo 5'-adenosil) y metilcobalamina (grupo metilo o -CH<sub>3</sub>). Esta vitamina es hidrosoluble y se halla en carnes rojas, volatería, pescado, marisco, huevos y lácteos. Los suplementos farmacológicos contienen sobre todo cianocobalamina y menos frecuentemente hidroxicobalamina<sup>104</sup>. Sin embargo, la hidroxicobalamina tiene una menor afinidad por las proteínas séricas que la cianocobalamina, lo que hace que se excrete más rápidamente<sup>105</sup>. La ubicación y función de las distintas formas de cobalamina viene sintetizada en la tabla 9.2.



**Tabla 9.2.- Formas de vitamina B<sub>12</sub>.**

Ubicación/función	Formas
Alimentos	Deoxiadenosilcobalamina Hidroxicobalamina Metilcobalamina unida a polipéptidos
Suplementos farmacológicos	Cianocobalamina
Coenzimas	Deoxiadenosilcobalamina Metilcobalamina

La vitamina B<sub>12</sub> de la ingesta debe liberarse de la matriz alimentaria (se une a los polipéptidos de la dieta), mediante la acción de la pepsina, enzima producida por las células principales gástricas y que requiere un pH bajo. Entonces, la cobalamina liberada interactúa con dos tipos de proteínas: las proteínas R (procedentes de la saliva y del jugo gástrico) y el FI (producido por las células parietales gástricas estimuladas por la ingesta). Las proteínas R tienen alta afinidad por la vitamina B<sub>12</sub>, aunque no son receptores específicos. El vínculo proteína R-vitamina B<sub>12</sub> es destruido por las proteasas pancreáticas en el intestino delgado, donde se une al FI. El complejo B<sub>12</sub>-FI entra en los enterocitos ileales por endocitosis. Dentro de la célula se debe disociar del FI y combinar con la transcobalamina (TC) II para pasar en forma de complejo TC II-B<sub>12</sub> a la circulación. El proceso de absorción es lento, ya que la vitamina B<sub>12</sub> aparece en sangre a partir de tres-cuatro horas postingesta y sus concentraciones alcanzan un pico tras 8-12 horas de una dosis de carga<sup>104</sup>.

La TC II es la proteína de transporte que conduce a la cobalamina a los tejidos extrahepáticos, allí el complejo TC II-B<sub>12</sub> es captado mediante endocitosis por las células y conducido al lisosoma, donde la cobalamina se convierte en coenzima. Existen otros dos tipos de cobalaminas distintas en la circulación: la TC I o proteína R que liga el 80% de la cobalamina y la TC III, cuya misión se desconoce<sup>108</sup>.

El 50% de vitamina B<sub>12</sub> absorbida es captada por el hígado y el resto es transportado a otros tejidos<sup>104</sup>. La estimación de las reservas corporales es de 2-3 mg<sup>109-10</sup>, mientras que su contenido en el tejido hepático es de 1,0 µg/g<sup>111</sup>.

La vitamina no absorbida se elimina por vía fecal junto con la excretada a través de la bilis, la procedente de las secreciones gastrointestinales, las células digestivas descamadas y las bacterias colónicas. La vía biliar constituye la ruta primaria de excreción, aunque el 50% de la vitamina se reabsorbe (circulación enterohepática). La pérdida por vía renal sólo tiene lugar si la cobalamina circulante excede la capacidad de unión a las TCs, fenómeno que ocurre habitualmente tras la inyección de cobalamina<sup>104</sup>. Aunque se estima que las pérdidas diarias suponen el 0,1-0,2% de las reservas, las pérdidas urinarias son más bajas en situaciones de depleción de cobalamina<sup>112-3</sup>.

### 9.3.3 Funciones metabólicas

Las dos únicas reacciones B<sub>12</sub>-dependientes que tienen lugar en el ser humano son: la metilación de Hcy a metionina, que cuenta con la presencia de metilcobalamina como cofactor; y la isomerización mitocondrial de la L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA por la enzima metilmalonil-CoA mutasa (EC 5.4.99.2) y la 5'-deoxiadenosilcobalamina como cofactor. Como consecuencia de los estados deficitarios de cobalamina, aparece homocistinuria y aciduria metilmalónica<sup>35,37</sup>.

El fracaso de la metilación de la Hcy parece ser la clave de la precipitación de la clínica neurológica tras la administración de folatos en sujetos con déficit subclínico de cobalamina. La hipótesis que sustenta este fenómeno se denomina “trampa del metilfolato” y las explicaciones más aceptadas sobre el mecanismo subyacente apuntan a la transformación subóptima de N<sup>5</sup>-metil-THF en THF, con la consiguiente deficiencia de coenzimas derivadas. La importancia del THF viene respaldada por su utilidad para corregir parcialmente las pruebas de supresión de la desoxiuridina alteradas (sección 12.2.4.2), tanto si hay deficiencia de folatos como de cobalamina<sup>114</sup>.

### 9.3.4 Requerimientos

Según el Institute of Medicine, el RDA para los varones y mujeres de EE.UU. y Canadá es de 2,4 µg diarios de vitamina B<sub>12</sub>. En este caso, la población vulnerable es la geriátrica, entonces esta institución recomienda que los sujetos mayores de 50 años alcancen los valores del RDA mediante la ingesta de alimentos fortificados o suplementos<sup>104</sup>. Para el Comité Científico para la Alimentación de la Unión Europea, el PRI es de 1,4 µg/día de cobalamina para adultos<sup>115</sup>.

### 9.3.5 Cifras de frecuencia de la deficiencia de cobalamina

La estimación de las cifras de deficiencia de cobalamina nos plantea los mismos problemas que la depleción de folatos. Según Pennypacker y cols. la deficiencia de cobalamina puede afectar al 15% de adultos de más de 65 años<sup>116</sup>, no obstante, esta situación no parece reproducirse en parte de la población española<sup>60</sup>. En general, en los países desarrollados el déficit nutricional de vitamina B<sub>12</sub> por ingesta insuficiente es raro, fuera de los vegetarianos estrictos y de la población geriátrica<sup>32</sup>.

El estudio ENNA 91 informa de unas estimaciones sobre la ingesta media de cobalamina que superan ampliamente el RDA y el PRI. El valor más bajo corresponde a Canarias con 4,9 µg/día y el máximo a La Rioja con 10,8 µg diarios<sup>30</sup>. El estudio eVe nos aporta datos análogos al ENNA 91, sin embargo, ha detectado niveles subóptimos de cobalamina sérica en más del 5% de la población del País Vasco<sup>31</sup>.

De acuerdo con los datos de la Evaluación del Estado Nutricional de la Población

ción Catalana (1992-1993)<sup>32</sup> no se ha detectado ningún caso de déficit importante de cobalamina (inferior a 100 pg/mL), y sólo un 1,9% presentó concentraciones entre 100 y 199 pg/mL, intervalo no específico de la carencia de cobalamina<sup>32</sup>.

En resumen, la hipovitaminosis B<sub>12</sub> no suele afectar en nuestro país a las mujeres en edad genésica y sí suele ser una condición más prevalente entre los vegetarianos estrictos y los sujetos de mayor edad.

### 9.3.6 Etiología de la deficiencia de cobalamina

La malabsorción se produce si hay aclorhidria (sube el pH y no puede actuar la pepsina), insuficiencia pancreática (falta de proteasas pancreáticas) o carencia de FI<sup>104</sup>. Aun con todo, la deficiencia de B<sub>12</sub> tarda muchos años en desarrollarse clínicamente, a pesar de que se desarrolla más rápidamente en aquéllos que no tienen FI o malabsorben la cobalamina que en los vegetarianos estrictos sin las alteraciones antedichas. La tabla 9.3<sup>104</sup> contiene tanto las causas más prevalentes de esta hipovitaminosis como los procesos patogénicos asociados.

**Tabla 9.3.- Causas de la deficiencia de cobalamina.**

Causa	Patogenia
Aporte dietético deficiente	Ingesta insuficiente de B <sub>12</sub> (p.ej. vegetarianos estrictos)
Anemia perniciosa	Carencia de factor intrínseco
Gastrectomía	Carencia de factor intrínseco
Gastritis atrófica	Incapacidad de digestión de la cobalamina ligada a proteínas y captación intestinal y/o conversión de B <sub>12</sub>
Sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado	Captación bacteriana de B <sub>12</sub> y/o conversión de B <sub>12</sub>
Infestación por <i>Diphyllobotrium latum</i>	Captación parasitaria de B <sub>12</sub>
Resección ileal o ileitis terminal (enfermedad de Crohn)	Malabsorción de cobalamina
Insuficiencia pancreática exocrina	Incapacidad de digestión de la cobalamina ligada a proteínas

### 9.3.7 Clínica de la deficiencia de cobalamina

La manifestación clínica más frecuente es la anemia perniciosa, estadio final de una enfermedad autoinmune en la que hay anticuerpos anti-células parietales gástricas que bloquean la unión de cobalamina a sus receptores correspondientes, no formándose los complejos cobalamina-FI. En sujetos de más de 60 años se estima que la prevalencia de anticuerpos anti-FI es del 2,9% y que la prevalencia de anemia perniciosa no diagnosticada es del 2%<sup>117</sup>. La repercusión gastrointestinal de la deficiencia se asocia con flatulencia, diarrea y disminución de la orexia<sup>104</sup>.

La neuropatía es otro cuadro clínico característico y suele aparecer tras diez

años o más de depleción. Aparece en el 75%-90% de los individuos con deficiencia clínica de cobalamina y puede presentarse aislada en el 25% de los casos<sup>104</sup>. Parece que los pacientes con anemia leve-moderada muestran unas complicaciones neurológicas más evidentes que los no anémicos<sup>118-9</sup>. La clínica abarca desde alteraciones sensitivomotoras predominantes en extremidades inferiores hasta cambios cognitivos (demencia, cambios de humor, impotencia, incontinencias esfinterianas, etc.). La reversibilidad de las complicaciones neurológicas postratamiento depende de la duración de la deficiencia.

## 9.4 La vitamina B<sub>6</sub>

### 9.4.1 Concepto y estructura química

La vitamina B<sub>6</sub>, también denominada piridoxina, está compuesta de seis derivados de la piridina, esto es, el piridoxal (PL), la piridoxamina (PM), la piridoxina (PN) y sus correspondientes 5'-fosfatos (fosfato de piridoxina (FPN), fosfato de piridoxal (FPL) y fosfato de piridoxamina (FPM))<sup>120-1</sup>. El FPL y el FPM están en los tejidos animales, mientras que la PN y su fosfato se hallan en los vegetales.

Los alimentos ricos en esta vitamina son las semillas, los cereales, el hígado, las carnes rojas, y en menos cuantía, la leche, los huevos y las verduras de hoja verde<sup>121</sup>.

### 9.4.2 Absorción, transporte, almacenamiento y eliminación

La absorción intestinal tiene lugar tras la hidrólisis enzimática del grupo fosfato seguida del transporte hacia el citosol del enterocito mediante difusión pasiva, de forma que dosis muy altas se absorben bien<sup>122</sup>. El glucósido de PM (habitual en plantas) se absorbe menos efectivamente que el FPL y el FPM. La biodisponibilidad en una dieta variada es del 75%. La absorción de las distintas formas de B<sub>6</sub> es similar en ausencia de alimento<sup>123</sup>.

Las formas no fosforiladas pasan mayoritariamente al hígado postabsorción y se convierten en los fosfatos correspondientes gracias a la acción de una quinasa. Los fosfatos de PM y PN se oxidan a FPL mediante una oxidasa. La ulterior unión del FPL a las proteínas tisulares les protege de la acción de las fosfatasa, pero limita su acumulación en los tejidos<sup>124</sup>. Si se excede la capacidad de almacenamiento, el FPL libre se hidroliza y hallamos vitamina B<sub>6</sub> no fosforilada en la circulación. Sin embargo, la capacidad de retención corporal es alta y se pone de manifiesto tras la administración de dosis farmacológicas de B<sub>6</sub> que se almacenan en el músculo, el plasma y la hemoglobina cuando otros tejidos ya se han saturado<sup>125</sup>.

La albúmina es su mayor transportador y deriva enteramente del hígado del



cual se libera en forma del complejo FPL-albúmina<sup>126</sup>.

Coburn y cols.<sup>127</sup> estimaron el contenido muscular de vitamina B<sub>6</sub> a partir de biopsias y asumiendo que el músculo contenía el 80% de reservas del organismo calcularon que las reservas corporales totales eran de 167 mg. Los tejidos y los hematíes captan formas no fosforiladas de la vitamina que posteriormente fosforilan y unen a proteínas para facilitar su retención. El citosol y las mitocondrias son las ubicaciones preferentes de la vitamina B<sub>6</sub>. La excreción es en forma de ácido 4-piridóxico que da cuenta de la mitad de compuestos de B<sub>6</sub> urinarios<sup>121</sup>.

Si se administran grandes dosis de piridoxina, ésta se excreta en orina sin modificar. No se sabe la cantidad de B<sub>6</sub> excretada por heces, ya que la síntesis de esta vitamina por parte de los microorganismos intestinales dificulta su medición<sup>128</sup>.

### 9.4.3 Funciones metabólicas

El FPL actúa como coenzima para más de 100 enzimas implicadas en el metabolismo de los aminoácidos, esto es, aminotransferasas, decarboxilasas, racemasas y deshidratasas; del glucógeno; y de las bases esfingoides. También es cofactor de la cistationina β-sintetasa (CBS; EC 4.2.1.22) y de la γ-cistationasa (EC 4.4.1.1)<sup>120</sup>. En el organismo, hallamos el fosfato de piridoxal en el músculo, unido a una fosforilasa, puesto que esta forma de vitamina B<sub>6</sub> es la coenzima de una reacción en la que media la fosforilasa<sup>121</sup>.

### 9.4.4 Requerimientos

El RDA de vitamina B<sub>6</sub> estimado para adultos jóvenes estadounidenses y canadienses es del 1,3 mg<sup>121</sup>, mientras que el PRI estimado para los europeos es de 1,5 mg diarios para los varones y 1,1 mg para las mujeres<sup>121</sup>.

## 9.4.5 Cifras de frecuencia de la deficiencia de piridoxina

Ninguna comunidad autónoma española tiene una ingesta media de piridoxal inferior a 1,3 mg diarios, aunque también es cierto que la mayoría de las cifras medias están en torno a 1,3-1,5 mg<sup>30</sup>. Según el estudio eVe, en el noroeste de España se dan las ingestas medias mínimas para las mujeres (1,34 mg/día), mientras que en el resto de las zonas escrutadas se alcanza el PRI para ambos sexos. Por otra parte, más del 5% de la población catalana y andaluza tiene niveles subóptimos de vitamina B<sub>6</sub> en sangre<sup>31</sup>.

En países desarrollados, la deficiencia de esta vitamina es muy rara y es propia de la edad geriátrica a causa de malnutrición o de dietas poco variadas<sup>129</sup>.

## 9.4.6 Etiología de la deficiencia de piridoxina

La deficiencia de esta vitamina no se suele presentar aislada sino que converge con otras hipovitaminosis del grupo B a causa de dietas pobres, estados malabsortivos, insuficiencia renal o diálisis. La depleción aislada suele deberse al tratamiento con isoniacida que la antagoniza; otros fármacos como la cicloserina, la hidralacina, la penicilamina, la pirazinamida, o los anticonceptivos aumentan los requerimientos de esta coenzima<sup>129</sup>.

## 9.4.7 Clínica de la deficiencia de piridoxina

La clínica de la deficiencia de B<sub>6</sub> consiste en dermatitis seborreica<sup>130</sup>, anemia microcítica<sup>131</sup>, convulsiones<sup>132</sup>, depresión y confusión<sup>133</sup>. La anemia microcítica se atribuye a la disminución de la síntesis de hemoglobina secundaria a la falta de FPL para la síntesis del ácido  $\delta$ -aminolevulínico. Las manifestaciones neurológicas parecen secundarias al papel de la B<sub>6</sub> como coenzima de decarboxilasas implicadas en la síntesis de neurotransmisores (dopamina, serotonina)<sup>134</sup>. Guilarte propone el acúmulo de metabolitos del triptófano en el cerebro como causa de las convulsiones<sup>135</sup>. Por último, Brattström y cols.<sup>136</sup> estudiaron una serie de 72 pacientes menores de 55 años con arteriopatía oclusiva carotídea, cerebral o aorto-iliaca y hallaron una frecuencia de hiperhomocisteinemia basal y post-sobrecarga de metionina (estudia el déficit de B<sub>6</sub>) significativamente superior a los controles. En 20 pacientes, el tratamiento con cloruro de piridoxina (240 mg/día) y ácido fólico (10 mg/día) redujo los niveles basales y post-sobrecarga de tHcy, lo que apunta a la posibilidad de que la vitamina B<sub>6</sub> también pueda estar relacionada con la arteriosclerosis.

## 9.5 El metabolismo de la homocisteína y su regulación<sup>137</sup>

### 9.5.1 Conocimientos actuales

La metionina es un aminoácido esencial, esto es, no lo podemos producir a partir de otros aminoácidos<sup>138</sup>. Sólo en condiciones experimentales la metionina puede ser sustituida por la Hcy, pero in vivo la metionina es indispensable para producir la Hcy, ya que ésta no está presente en los alimentos.

En todas las células de mamíferos tienen lugar la síntesis de proteínas y de SAME, procesos que precisan la metionina. La SAME se genera a partir de la metionina y una molécula de adenosín trifosfato (ATP) por medio de la metionina adenosil transferasa (MAT; EC 2.5.1.6). Esta enzima regula el metabolismo de la metionina, puesto que elimina el exceso de la misma. Hay tres isoenzimas de la MAT (I, II y III), de las cuales sólo la I y la III están presentes en los hepatocitos maduros, mientras que la II se encuentra en todos los tejidos<sup>139</sup>. La actividad de las isoenzimas I y III de la MAT no se ve disminuida por la acumulación intracelular de SAME, dado que tienen capacidad para seguir transformando a la metionina en SAME a pesar de las altas concentraciones intracelulares de esta última. La MAT II tiene gran afinidad por la metionina, pero poca capacidad para metabolizarla, puesto que la SAME la inhibe intensamente<sup>139</sup>, por consiguiente, en los tejidos extrahepáticos la concentración intracelular de SAME es constante ya que no existe la capacidad de producir más SAME en respuesta al excedente de metionina. La SAME producida por una célula no se moviliza sino que queda retenida en la célula que la ha generado. La SAME sufre dos procesos: la transmetilación y la descarboxilación.

La transmetilación hace de la SAME la mayor donante de metilos del organismo, puesto que se estima que transfiere estos radicales en el 80% de reacciones intracelulares por medio de las metilasas SAME-dependientes. Las metilasas SAME-dependientes se ven inhibidas por la presencia de S-adenosil-Hcy (SAH), producto de la transmetilación de la SAME. La glicina N-metiltransferasa (GNMT; EC 2.1.1.20) es una de las metilasas más abundantes y transforma la glicina en N-metilglicina (sarcosina). Su presencia es más frecuente en el hígado y en el páncreas exocrino<sup>140-1</sup>. La glicina constituye un aceptor disponible y la sarcosina un producto no tóxico que se regenera fácilmente a glicina. La GNMT se adapta a las altas concentraciones de SAME y se ve mínimamente afectada por uno de sus productos, la SAH; además está unida de forma no covalente al metil-THF pentaglutamato<sup>142</sup> que actúa como inhibidor del enzima tanto in vivo como in vitro<sup>143-5</sup>. Entonces, la metilación mediada por la GNMT depende de la disponibilidad de metionina.

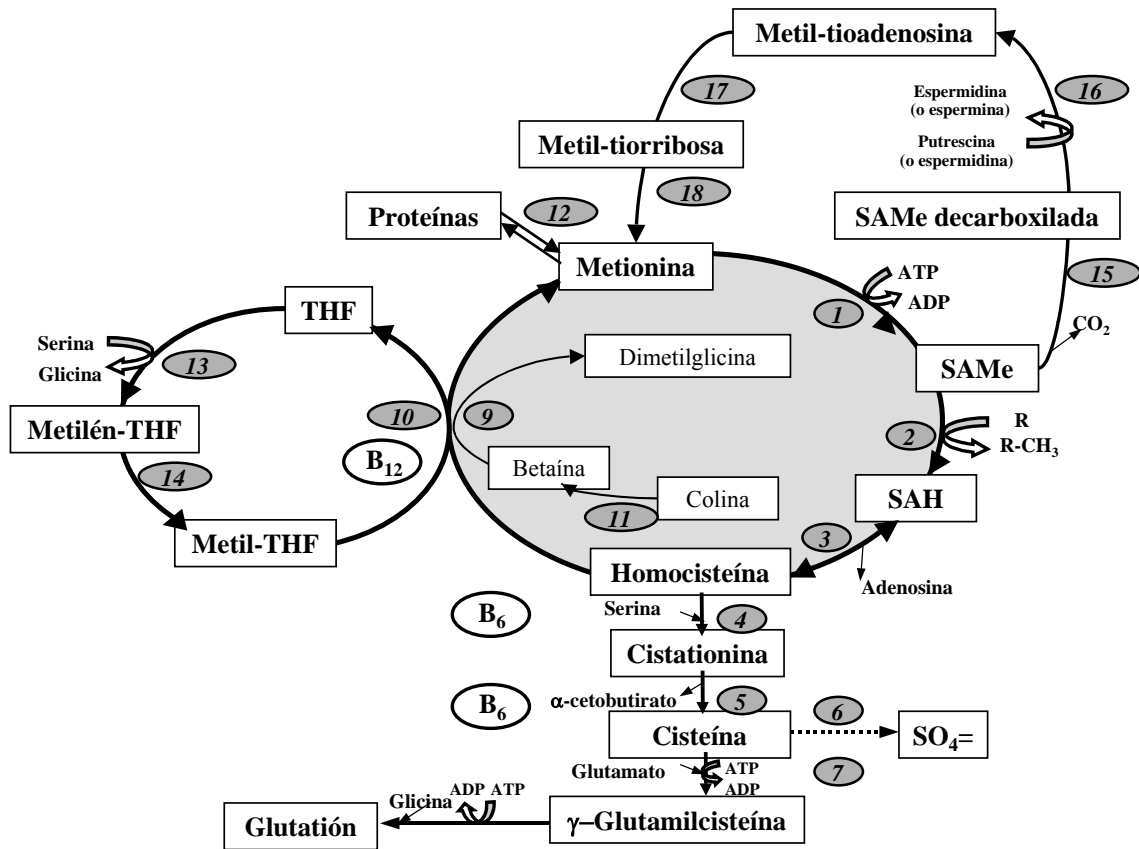
La descarboxilación transforma la SAME en 5-metiltioadenosina y metionina, a la vez que la putrescina/espermidina se transforman en espermidina/espermina (poliaminas) (figura 9.9)<sup>137</sup>. Este proceso consume menos del 10% de la SAME, entonces, no compite con la transmetilación<sup>146</sup>. Parece que la acumulación de poliaminas inhibe la acción de la MAT<sup>147</sup>. Hay indicios de que las poliaminas contribuyen a la fidelidad de la transcripción del ADN y de la traducción del ácido ribonucleico<sup>148</sup>.

La SAH y la Hcy se interconvierten entre sí y como el equilibrio de esta reacción favorece la síntesis de SAH, la eliminación de la Hcy mediante la remetilación y la transulfuración impulsa esta reacción en sentido contrario, favoreciendo la degradación de la SAH. Sin embargo, la SAH no tiende a acumularse en exceso, puesto que se une a proteínas intracelulares y si éstas se saturan, sale de la célula, pasa al líquido extracelular y es eliminada por vía renal. La Hcy, al igual que la SAH, se une a proteínas intracelulares y puede expulsarse de la célula, por lo tanto, la Hcy detectada en el plasma sería la Hcy que está en camino entre las células de origen y las células de destino que bien podrían ser las de su catabolismo, esto es, los hepatocitos.

La Hcy participa en tres reacciones (figura 9.9):

- Remetilación: son dos reacciones en las que intervienen la MTR y la betaína hidroximetiltransferasa o betaína-Hcy metiltransferasa (BHMT; EC 2.1.1.5). La primera enzima es ubicua y es la más importante, mientras que la segunda sólo está presente en el riñón y en el hígado. En la remetilación por la MTR, el grupo metilo del metil-THF se transfiere primero al complejo monovalente MTR-cobalamina (MTR-Co(I)) para formar el complejo MTR-metilcobalamina (MTR-Co-CH<sub>3</sub> o MTR-Co(III)). Este último complejo cede directamente el grupo metilo a la Hcy y el Co(I) resultante se remetila por medio del metil-THF. Una vez de entre 100-2000 reacciones, la cobalamina monovalente (Co(I)) se oxida a Co(II), constituyendo un complejo MTR-Co(II) inactivo. La restitución de la Co(I) se produce por la catálisis de la MTR reductasa (EC 2.1.1.135)<sup>149-150</sup> (figura 9.10). Aún no se ha desentrañado la importancia de la BHMT que elimina la Hcy a la vez que cataboliza la colina.
- Transulfuración: es una secuencia de reacciones irreversibles que se pueden llevar a cabo en su totalidad en el hígado, el páncreas, el intestino delgado y los riñones. Sólo estos tejidos tienen la dotación necesaria de CBS y de  $\gamma$ -cistationasa, ambas piridoxal-dependientes. Estos tejidos son los que tienen el recambio más acelerado de glutatión ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cisteinglicina), por lo que se cree posible que la transulfuración se utilice para la resíntesis de este tripéptido. En el corazón, los pulmones, los testículos, las glándulas suprarrenales y el bazo no hay CBS, mientras que en el sistema nervioso central y en el tejido adiposo no hay  $\gamma$ -cistationasa. Los tejidos sin dotación enzimática completa no tienen cisteína propia, o sea, son auxotrópicos para la cisteína y, por otra parte, en ellos se acumula la cistationina. La transulfuración es la única reacción que puede eliminar la Hcy.

Figura 9.9.- Metabolismo de la homocisteína en los mamíferos (modificado de J. D. Finkelstein<sup>137</sup>).



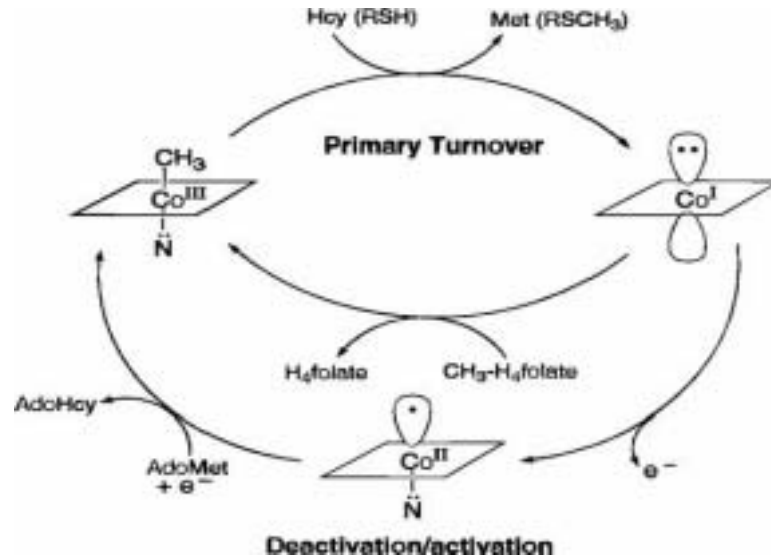
ATP (adenosín trifosfato), ADP (adenosín difosfato), R (receptor o aceptor), SAME (S-adenosil-metionina), SAH (S-adenosil-homocisteína), THF (tetrahidrofolato); 1 metionina adenosil transferasa (EC 2.5.1.6); 2 transmetilaciones dependientes de la S-adenosil-metionina; 3 adenosilhomocisteinasa o S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa (EC 3.3.1.1); 4 cistationina β-sintetasa (EC 4.2.1.22); 5 γ-cistationasa (EC 4.4.1.1); 6 degradación de la cisteína; 7 γ-glutamyl-cisteína sintetasa (EC 6.3.2.2); 8 glutión sintetasa (EC 6.3.2.3); 9 betaína-homocisteína metiltransferasa (EC 2.1.1.5); 10 metilfolato-homocisteína metiltransferasa o metionina sintetasa (EC 2.1.1.13); 11 colina oxidasa (EC 1.1.99.1) y betaína aldehído-deshidrogenasa (EC 1.2.1.8); 12 equilibrio entre la metionina libre y la ligada a proteínas; 13 serina hidroximetil transferasa (EC 2.1.2.1); 14 N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metilén-tetrahydrofolato reductasa (EC 1.7.99.5); 15 S-adenosil-metionina decarboxilasa (EC 4.1.1.50); 16 espermidina (espermina) sintetasa (EC 2.5.1.16 y EC 2.5.1.22); 17 metil-tioadenosina fosforilasa (EC 2.4.2.28); 18 formación de metionina vía metil-tiorribosa-1-fosfato.

Las enzimas del metabolismo de la metionina se pueden clasificar según su capacidad de preservar o destruir la metionina. Las enzimas que conservan la metionina tienen  $K_m$  más bajos, mientras que las segundas tienen  $K_m$  más altos. Ello se representa en la tabla 9.4<sup>137</sup> que, a la vez, pretende transmitir los siguientes conceptos:

- Las enzimas conservadoras de la metionina pertenecen a la remetilación, tienen una  $K_m$  baja para los sustratos azufrados y se ven inhibidas por los productos de la reacción. La SAME y la SAH no sólo ejercen efecto sobre las enzimas que las producen, sino que también inhiben a la BHMT y la MTR. Su contenido hepático disminuye en respuesta a un aumento de metionina o de proteínas de la dieta.
- Las enzimas destructoras de la metionina pertenecen a la transulfuración, tienen una  $K_m$  alta y no se ven inhibidas por los productos de la reacción. La SAME y la SAH activan estas enzimas. Su contenido hepático aumenta en respuesta a un

aumento de metionina o de proteínas de la dieta.

**Figura 9.10.- Participación del cofactor cobalamina en la función de su apoenzima metionina sintetasa. Representación de la cobalamina en sus distintos grados de oxidación<sup>149</sup>.**



De la tabla 9.4 también se puede inferir el fundamento de la distribución de la Hcy entre la remetilación y la transulfuración:

1. La  $K_{\text{hcy}}$  para las enzimas de la remetilación es muy inferior a las de la transulfuración, por consiguiente, la remetilación se verá favorecida por las bajas concentraciones del metabolito y, al contrario, la transulfuración actuará sobre la Hcy a unas concentraciones más altas, esto es, cuando la capacidad de las enzimas de la remetilación se vea sobrepasada.
2. Las moléculas SAME, SAH y metil-THF ejercen un papel regulador. Así, la SAME activa la CBS, la MAT III y la GNMT e inhibe la BHMT, las MAT I-II y la MTHFR<sup>151</sup>. Ello se interpreta como que altas concentraciones de SAME favorecen el catabolismo de la metionina o transulfuración, mientras que las bajas concentraciones favorecen la conservación de la metionina<sup>146</sup>. Sin embargo, el papel regulador de la SAME sólo se ejerce en el hígado. La SAH regula la síntesis de metil-THF por medio de la supresión de la inhibición de la MTHFR ejercida por la SAME. Este último efecto puede ser relevante en los tejidos extrahepáticos en los que la concentración de SAH varía más que la de SAME. Al contrario, la SAH inhibe las enzimas MTR y BHMT, y activa la CBS favoreciendo por lo tanto la transulfuración. Es probable que la concentración intracelular de SAME esté más controlada que la de SAH, por consiguiente, es posible que la amplitud más variable de esta última redunde en una función reguladora metabólica más amplia. En resumen, la regulación ejercida por la SAME y la SAH es de signo opuesto salvo para la CBS y la BHMT. Por último, el metil-THF inhibe la GNMT, mientras que en presencia de bajas concentraciones ocurre lo contrario<sup>143-5</sup>.

**Tabla 9.4.- Clasificación de las enzimas del metabolismo de la homocisteína según su constante de Michaelis y sus metabolitos reguladores (tomado de J. D. Finkelstein<sup>137</sup>).**

Enzima (o clase)	K <sub>m</sub> (mM)	Efecto de los metabolitos		
		Met	SAMe	SAH
<b>Conservadoras de la metionina</b>				
MAT I [ $\alpha$ ]*	0,003-0,041	S	P,I	
MAT II [ $\beta$ ]	0,004-0,023	S	P,I	
Adenosilhomocisteinasa				
Hidrólisis	0,008-0,06			S
Síntesis	0,16			P,I
BHMT	0,012-0,06	P,I	I	I
MTR	0,06	P,I	CoS	I
MTHFR	-		I	A
<b>Destructoras de la metionina</b>				
MAT III [ $\gamma$ ]	0,03-1,3	S	P,A	
CBS	1-25		A	A
$\gamma$ -cistationasa	3			
Glicina metiltransferasa	0,03-0,18		S,A	P,I
SAMe decarboxilasa	0,05-0,08		S	

K<sub>m</sub> (constante de Michaelis para el sustrato azufrado), S (sustrato), P (producto), I (inhibidor), CoS (cosustrato), A (activador), Met (metionina), SAMe (S-adenosil-metionina), SAH (S-adenosil-Hcy), MAT (metionina adenosil transferasa), BHMT (betaína hidroximetiltransferasa), MTR (metionina sintetasa), MTHFR (N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metilén-tetrahidrofolato reductasa), CBS (cistationina  $\beta$ -sintetasa).

\* Finkelstein<sup>137</sup> afirma que la actividad de la MAT I se ve inhibida por su producto, la SAMe, mientras que Martínez-Chantar y cols.<sup>139</sup> aseveran que la actividad de la MAT I no se ve disminuida por la concentración intracelular de SAMe.

La hiperhomocisteinemia se puede clasificar en tres grupos:

- Fallo de la CBS.
- Hipometilación de la Hcy por baja disponibilidad de metil-THF (déficit de folato, hipofunción de la MTHFR).
- Hipometilación de la Hcy con disponibilidad adecuada de metil-THF (déficit de cobalamina, antagonismo de la cobalamina ejercido por el óxido nítrico).

En general, se cree que la hiperhomocisteinemia no es una respuesta ni al exceso de aporte de metionina ni a la producción excesiva de Hcy, puesto que la remetilación y la transulfuración tienen la capacidad de adaptarse al exceso de metionina. Sólo en caso de fallo simultáneo de la remetilación y de la transulfuración se produce un incremento de los niveles de Hcy en sangre.

## 9.5.2 Perspectivas de futuro en la investigación del metabolismo de la homocisteína

En una excelente revisión del metabolismo de la Hcy disponible en la red<sup>152</sup> se

destacan una serie de aspectos pendientes de dilucidar. Es probable que los avances en los siguientes temas contribuyan a mejorar la prevención primaria de los DTNs:

1. Translocación de metabolitos: si bien la Hcy del plasma es la fracción en tránsito desde los tejidos periféricos hacia el hígado y el riñón, al contrario, la SAH extracelular no parece ni ser captada ni utilizada por otros tejidos. Tampoco está claro si la SAME y el glutatión pasan de un tejido a otro. La SAME administrada a altas dosis se concentra principalmente en el riñón y menos en el hígado y en el cerebro. En este sentido, disponemos de una investigación reciente de Garibotto y cols.<sup>153</sup> que informa del intercambio de los aminotioles entre los diferentes órganos. La cisteinglicina se libera de los tejidos periféricos y de los órganos esplácnicos como resultado de la hidrólisis del glutatión y es filtrada por el riñón; la cisteína es retornada a la circulación por el riñón con el fin de ser reciclada para la síntesis de glutatión. Por otra parte, la Hcy es liberada por los tejidos periféricos en escasa cantidad y es eliminada por el riñón.
2. Compartimentación intracelular: al igual que la vía de la colina-betaína se mueve de la mitocondria al citosol, es probable que ocurra lo mismo con el metabolismo de la metionina. Además, se cree que deben de existir agregados de proteínas enzimáticas y de transporte, de forma que la SAME o la Hcy al salir de su lugar de origen no se vean obligadas a reaccionar con el primer complejo enzimático que encuentren al azar.
3. Rol del metabolismo de la Hcy en el estrés oxidativo (ver más adelante).
4. Regulación metabólica: hay que profundizar en el conocimiento de las funciones reguladoras de la SAH, del metil-THF y de las poliaminas. Los conocimientos sobre las poliaminas se han obtenido de tejidos en reposo, y por lo tanto, el papel de estos compuestos puede ser muy distinto en células en fase de proliferación.
5. Funciones de los distintos metabolitos: la betaína tiene un papel imprescindible en la degradación de la colina y es posible que su función sea importante para el metabolismo de la Hcy en el hígado y en el riñón. La capacidad de los tejidos humanos para sintetizar betaína es muy inferior a la de otras especies no primates, por consiguiente, hay que proseguir los estudios sobre la betaína en primates y no en roedores. La cistationina también necesita investigarse más.
6. Patogenia de las lesiones inducidas por la hiperhomocisteinemia: aunque parece claro que las concentraciones extremas de tHcy ejercen un efecto tóxico directo sobre el árbol vascular, no está tan claro el mecanismo de actuación de la hiperhomocisteinemia moderada. En esta misma línea, no se ha averiguado la razón por la que la Hcy ejerce efectos deletéreos sobre el producto de la gestación.
7. Polimorfismos de los genes implicados en el metabolismo del folato y la Hcy: tanto la enfermedad cardiovascular como los DTNs parecen, en parte, folato-sensibles. El descubrimiento de las mutaciones que hacen a los sujetos más susceptibles al déficit subclínico de folatos contribuirá a profilaxis y tratamientos más individualizados.
8. Importancia de la remetilación: la interrupción o hipofunción de esta vía genera tanto la acumulación de Hcy como la depleción de metionina y, consiguientemente, de SAME. Las reacciones de metilación catalizadas por la SAME afectan a distintos sustratos: proteínas (del envejecimiento y del golpe de calor (heat shock



proteínas)), fosfolípidos (función desconocida), ADN (regula las actividades de los genes y la diferenciación celular)<sup>154</sup>, etc. La experimentación animal ha vinculado la hipometilación de proteínas contráctiles celulares<sup>155</sup> y de ADN<sup>156</sup> a la génesis de DTNs.

## 9.6 La agresión oxidativa y su vínculo con el metabolismo de la homocisteína<sup>157</sup>

### 9.6.1 ¿Qué es la agresión oxidativa?

El metabolismo aerobio es más ventajoso que el anaerobio, pues consigue la combustión completa de la glucosa. Durante la fosforilación oxidativa la mayoría del oxígeno consumido se une a átomos de hidrógeno, formando agua. Se estima que el 4%-5% del oxígeno utilizado durante la respiración no se reduce completamente a agua, y forma radicales libres. Los radicales libres son moléculas que contienen un electrón impar en el orbital más externo y, por consiguiente, necesitan otro electrón para poseer una configuración bioquímica y electromagnética estable. Esta característica les hace especialmente ávidos por reaccionar con otras moléculas, con el fin de eliminar este orbital incompleto, pero esta interacción las desestabiliza químicamente, esto es, se convierten en especies de oxígeno reactivo (EOR) y pueden desencadenar reacciones en cadena. Entonces, la agresión oxidativa es la consecuencia del desequilibrio entre la producción de radicales libres-EOR y la defensa antioxidante, viéndose favorecido el primer proceso. Estas especies se forman continuamente durante el metabolismo oxidativo y se generan más fácilmente en los órganos más activos (elevado consumo de oxígeno por unidad de peso) tal es el caso del miocardio o del cerebro y en las situaciones de alto consumo de energía (ejercicio físico, gestación). Otros procesos como el envejecimiento, la inflamación, la carcinogénesis, la isquemia-reperusión, etc. también se asocian a la agresión oxidativa. En la actualidad, aún se desconoce si la lesión oxidativa constituye una causa o una consecuencia.

Los radicales libres pueden ser tanto moléculas inorgánicas (anión superóxido ( $O_2^-$ ) y radicales hidroxilo ( $OH^\cdot$ )) como moléculas orgánicas (radicales alcóxilo ( $RO^\cdot$ ) y peróxilo ( $ROO^\cdot$ )). Por otra parte, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y los lipoperoxidos orgánicos no son propiamente radicales libres, ya que no poseen electrones desapareados, pero tienden a transformarse en ellos y producir reacciones oxidativas en cadena al aceptar fácilmente electrones procedentes de metales reducidos como el  $Fe^{+2}$  y el  $Cu^{+3}$ . La eliminación del superóxido y del peróxido de hidrógeno evita la formación de radicales hidroxilo que se forman por medio de las reacciones de Fenton<sup>158</sup> o de Haber-Weiss<sup>159</sup>.

Los radicales libres y las EOR pueden proceder de fuentes endógenas o exógenas. Los mecanismos endógenos pueden ser los siguientes:

- a) Cadena electrónica mitocondrial, sobre todo en situaciones de lesión mitocondrial, en las que el anión superóxido escaparía al control de los citocromos.

- b) Actividad excesiva de la enzima NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) oxidasa.
- c) Activación del metabolismo del ácido araquidónico en los procesos inflamatorios.
- d) Movilización de los iones metálicos como el  $\text{Fe}^{+2}$  o el  $\text{Cu}^{+3}$  de sus lugares de depósito, proteínas transportadoras, enzimas, etc., lo que les hace intervenir en reacciones de Haber-Weiss o de Fenton catalizadas por metales.
- e) Hiperactividad de la xantina oxidasa (EC 1.1.3.22) que en la reperfusión postisquemia utiliza el oxígeno molecular en lugar del  $\text{NAD}^+$  (nicotinamida adenina dinucleótido) para oxidar en el citoplasma la hipoxantina y la xantina hasta ácido úrico con la consiguiente reducción del oxígeno molecular a anión superóxido.
- f) Activación de la óxido nítrico sintetasa (EC 1.14.13.39) por la acción de citocinas, endotoxinas o aumento del calcio intracelular. El óxido nítrico se convierte en el anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) en presencia de anión superóxido.
- g) Mecanismos protectores antioxidantes insuficientes.

Los mecanismos exógenos también son múltiples:

1. Radiaciones ionizantes.
2. Aumento de disponibilidad de metales de transición tal y como ocurre en ciertas enfermedades de depósito (hemocromatosis, enfermedad de Wilson) o en los procesos inflamatorios.
3. Xenobióticos capaces de generar anión superóxido por medio de la oxidoreducción cíclica de las flavoproteínas.
4. Exceso de concentración de oxígeno en los procesos de isquemia-reperfusión (cardiopatía isquémica, accidentes cerebrovasculares, recuperación postraumática o postquirúrgica de lesiones).

La capacidad lesiva de la agresión oxidativa reside en la capacidad que tienen los radicales libres y las EOR de reaccionar con todas y cada una de las estructuras celulares según se sintetiza en la tabla 9.5<sup>157</sup>. Todos los mecanismos de agresión oxidativa conducen a la destrucción celular ya sea por necrosis, ya sea por apoptosis.

**Tabla 9.5.- Mecanismos fisiopatológicos de la lesión oxidativa celular.**

<i>Lugar de acción</i>	<i>Tipo de lesión</i>
<i>Membranas celulares y de organelas</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Alteración de las propiedades físico-químicas de la membrana → rigidez, ↓ permeabilidad de la membrana</li> <li>▪ Reacciones de peroxidación lipídica en cadena</li> <li>▪ Disfunción de las proteínas de membrana → pérdida de la homeostasis del <math>\text{Ca}^{2+}</math> → incremento citosólico del <math>\text{Ca}^{2+}</math> → activación de fosfolipasas y proteasas</li> <li>▪ Alteración de la cadena electrónica mitocondrial → ↓ síntesis de ATP, ↑ NADH/NAD<sup>+</sup>, ↑ liberación de <math>\text{O}_2^-</math></li> <li>▪ Alteraciones de la permeabilidad mitocondrial</li> </ul>
<i>Citoplasma</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acción sobre proteínas enzimáticas, cofactores y grupos prostéticos → ↓ ATP, ↑ metabolismo anaerobio, inhibición de las bombas de <math>\text{Na}^+/\text{K}^+</math>, <math>\text{Na}^+/\text{H}^+</math> → ↓ <math>\text{Ca}^{2+}</math> intracelular, ↑ NADH/NAD<sup>+</sup></li> <li>- ↑ <math>\text{Ca}^{+2}</math> intracelular → activación de proteasas y fosfolipasas</li> <li>- Movilización de metales de transición → producción de radicales peróxido (<math>\text{ROO}^-</math>) y alcóxido (<math>\text{RO}^-</math>)</li> </ul>
<i>Núcleo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Rotura monocatenaria o bicatenaria del ADN mediante radicales <math>\text{OH}^-</math></li> <li>▪ Activación de la poli-ADP-ribosa polimerasa → ↓ NAD<sup>+</sup> → ↓ ATP</li> <li>▪ Alteraciones transcripcionales</li> <li>▪ Interacción de radicales con el ARNm y los ribosomas</li> <li>▪ Activación del gen y la proteína p53 → inducción de apoptosis</li> <li>▪ Activación del factor de transcripción NFκB</li> <li>▪ Hidroxilación de la deoxiguanosina en 8-OH-deoxiguanosina → mutagénesis y carcinogénesis</li> </ul>

ATP (adenosín trifosfato), NAD (nicotinamida adenina dinucleótido), ADN (ácido desoxirribonucleico), ADP (adenosín difosfato), ARNm (ácido ribonucleico mensajero).

## 9.6.2 El papel del metabolismo de la homocisteína en la agresión oxidativa

El metabolismo de la Hcy participa en el estrés oxidativo por medio de las moléculas Hcy, cisteína, cisteinglicina, metionina y glutatión. Adicionalmente, la actividad de los enzimas implicados se ve modulada por los cambios redox.

La Hcy se puede clasificar como anti o prooxidante según las condiciones que se den en las reacciones. El papel prooxidante de la Hcy explicaría una de las hipótesis de lesión endotelial en las enfermedades tromboembólicas, esto es, la Hcy oxidada favorece la producción de EOR y daña el endotelio<sup>160-1</sup>. Al contrario, la función antioxidante proviene de la fracción de la Hcy reducida<sup>162-3</sup>, no obstante, esta fracción, en condiciones normales, no representa más del 1% de la tHcy plasmática<sup>161</sup>. En pacientes con insuficiencias renal y hepática, enfermedades asociadas con la agresión oxidativa, los cocientes Hcy reducida/tHcy son significativamente inferiores que en los controles sanos<sup>163</sup>.

La cisteína y la cisteinglicina también son antioxidantes menores que pueden actuar como agentes reductores por medio de sus formas libres<sup>162,164</sup>. En pacientes

con insuficiencia renal, la concentración de cisteína reducida disminuye significativamente con relación a los controles sanos<sup>163</sup>.

Los residuos de metionina actúan en apariencia como antioxidantes endógenos y protegen las proteínas funcionales<sup>165</sup>.

El glutatión reducido (GSH) es el agente antioxidante más efectivo; además, contribuye a la detoxificación de xenobióticos, a las reacciones de isomerización y es una forma de almacenamiento y transporte de la cisteína<sup>166</sup>. También es esencial para la proliferación celular<sup>167</sup> y preserva el potencial tiol redox intracelular manteniendo los grupos sulfuro en su forma reducida<sup>168</sup>. Sus niveles intracelulares oscilan entre 0,5 mM y 10 mM<sup>169</sup>, mientras que en el plasma su concentración es de 6  $\mu$ mol/L aproximadamente<sup>162</sup>. Más del 95% de glutatión intracelular está presente en forma reducida<sup>169</sup>, pero en el plasma sólo el 65% tiene esta configuración<sup>162</sup>. Se sintetiza por la acción consecutiva de la  $\gamma$ -glutamyl-cisteína sintetasa (EC 6.3.2.2) que utiliza glutamato y cisteína; la  $\gamma$ -glutamyl-cisteína resultante se combina con la glicina para sintetizar glutatión por medio de la glutatión sintetasa (EC 6.3.2.3). El ATP es el cosustrato de ambas enzimas<sup>166</sup>. El GSH tanto reacciona directamente con radicales en el contexto de reacciones no enzimáticas<sup>170</sup>, como indirectamente por medio de la enzima glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.9). Mediante esta última reacción el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los radicales ROOH se convierten en agua y en ROH respectivamente, con la consiguiente oxidación del glutatión, esto es dos moléculas de glutatión unidas por un puente disulfuro o glutatión disulfuro (GSSG). En los eritrocitos, la vía de la hexosa monofosfato proporciona el NADPH que restituye el GSH a partir del GSSG y mediante la acción de la glutatión reductasa (EC 1.8.1.7). Si la reacción mediada por la glutatión peroxidasa no se produjera, la acumulación de EOR limitaría la vida de los hematíes por incremento de la velocidad de oxidación de la hemoglobina a metahe-moglobina<sup>171</sup>. Las reacciones catalizadas por las distintas isoenzimas de la glutatión peroxidasa y por la glutatión reductasa no consumen el glutatión, sólo lo reciclan. Al contrario, la depleción intracelular de glutatión puede obedecer a la síntesis de conjugados del glutatión por la glutatión-S-transferasa (EC 2.5.1.18), a la liberación del glutatión al espacio extracelular<sup>166</sup> y a la agresión oxidativa que modifica la concentración de glutatión en los distintos tejidos e incrementa su presencia en el plasma<sup>172-3</sup>. El GSH extracelular y los conjugados de glutatión son sustratos de la enzima plasmática  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidasa o  $\gamma$ -glutamyl-transferasa (EC 2.3.2.2) que cataliza el traspaso del grupo  $\gamma$ -glutamyl a aceptores con la consiguiente producción de la cisteinglicina o el conjugado de cisteinglicina. La hidrólisis de la cisteinglicina por las ectopeptidasas a cisteína y glicina constituye una fuente de aminoácidos que son captados por las células y frecuentemente utilizados en la síntesis de novo de GSH<sup>166</sup>.

Ueland y cols. han estudiado el status redox plasmático de la Hcy, la cisteína y la cisteinglicina en sujetos sanos antes y durante las sobrecargas de metionina u Hcy, y en pacientes hiperhomocisteinémicos a consecuencia de homocistinuria o de déficit de cobalamina. Estos trabajos han informado de que las variaciones del status redox de la Hcy se relacionan con las variaciones de los otros aminotioles plasmáticos, lo cual se atribuye al intercambio de enlaces disulfuro entre ellos<sup>162</sup>. En cambio, en sujetos sanos el glutatión no influencia el status redox de la Hcy ni de la cisteína, fenómeno que respalda la función antioxidante no exclusiva del glutatión plasmático<sup>163</sup>.

Por último, el estrés oxidativo regula el metabolismo de la Hcy, o sea, estimula la CBS<sup>174</sup>, inhibe la MTR<sup>175</sup>, y las isoenzimas I y III de la MAT<sup>176-8</sup>. Ello se interpreta como la influencia de la mayor necesidad de glutatión sobre el reparto de la Hcy entre la remetilación y la transulfuración. De hecho, los tejidos de rata con mayor capacidad de transulfuración son los que tienen el recambio de glutatión más acelerado<sup>179</sup>. Sin embargo, la mayor producción de glutatión secundaria a la inactivación de la MAT puede ser perniciosa, ya que a medio plazo su hipofunción causará una disminución de la producción de este importante antioxidante. En esta línea, se estima que el estrés oxidativo produce un incremento de la desviación de la Hcy hacia la transulfuración en dos-tres veces, lo que se considera un aumento moderado<sup>180</sup>.

### 9.6.3 La asociación entre los defectos del tubo neural y la agresión oxidativa

Hay indicios de que la exposición de los embriones de rata a altas concentraciones de oxígeno durante la neurulación precoz causa DTNs, fenómeno que se atribuye a un sistema antioxidante inmaduro<sup>181</sup>. La contribución de la agresión oxidativa a la patogenia de los DTNs se ha explorado sobre todo en la embriopatía diabética<sup>182-3</sup> y no nos consta que se haya escrutado en un contexto de folato-sensibilidad. Uno de los últimos estudios publicados al respecto es de Chang y cols.<sup>184</sup>. Según este trabajo, la diabetes materna inhibió la expresión de Pax-3 e incrementó el número de DTNs en las ratonas gestantes diabéticas, mientras que la vitamina E (antioxidante) bloqueó estos efectos y la antimicina A (prooxidante) los potenció. En los cultivos de tejidos embrionarios, la adición de glucosa también inhibió la expresión de Pax-3, aunque este efecto fue inhibido mediante los antioxidantes vitamina E y un derivado del glutatión y estimulado por medio de la antimicina A. Estos hallazgos han permitido concluir que la agresión oxidativa reprime la expresión de Pax-3, gen necesario para el desarrollo del tubo neural y estructuralmente similar al humano. El factor de transcripción codificado por este gen impide la apoptosis p53-dependiente de las células neuroepiteliales, por consiguiente, si este gen no se expresa suficientemente las células del tubo neural sufren apoptosis y no migran a su posición correcta. Parece que la activación de muchas proteínas, incluyendo los factores de transcripción, depende del potencial redox. En esta línea podemos aventurar que la deficiencia de folato puede causar un estrés oxidativo leve por medio de la acumulación de Hcy que, como hemos visto, puede actuar como agente oxidante.

## 9.7 Bibliografía

1. Steegers-Theunissen R. Folate metabolism and neural tube defects: a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995;61:39-48.
2. Folate. En: Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. Washington (EE.UU.); National Academies Press; 2000. p. 196-305. URL: <http://www.nap.edu/books/0309065542/html/index.html> (acceso 20/2/03).
3. Rosenblatt DS. Inherited disorders of folate transport and metabolism. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic basis of inherited diseases*. Nueva York (EE.UU.): McGraw-Hill; 1989. p. 2049-64.

4. Lucock M, Daskalakis I. New perspectives on folate status: a differential role for the vitamin in cardiovascular disease, birth defects and other conditions. *Br J Biomed Sci* 2000;57:254-60.
5. Gregory JF III. Case study: folate bioavailability. *J Nutr* 2001;131:1376S-82S.
6. Lucock MD, Priestnall M, Daskalakis I, Schorah CJ, Wild J, Levene MI. Nonenzymatic degradation and salvage of dietary folate: physicochemical factors likely to influence bioavailability. *Biochem Mol Med* 1995;55:43-53.
7. Bhandari SD, Gregory JF. Inhibition by selected food components of human and porcine intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase activity. *Am J Clin Nutr* 1990;51:87-94.
8. Mason JB. Intestinal transport of monoglutamyl folates in mammalian systems. En: Picciano MF, Stokstad ELR, Gregory JF, eds. *Folic Acid Metabolism in Health and Disease*. Nueva York (EE.UU.): Wiley-Liss; 1990. p. 47-64.
9. Halsted CH. Intestinal absorption of dietary folates. En: Picciano MF, Stokstad ELR, Gregory JF, eds. *Folic Acid Metabolism in Health and Disease*. Nueva York (EE.UU.): Wiley-Liss; 1990. p. 23-45.
10. Selhub J, Emmanouel BD, Stavropoulos T, Arnold R. Renal folate absorption and the kidney folate binding protein. I. Urinary clearance studies. *Am J Physiol* 1987;252:F750-6.
11. van der Put NMJ, van Straaten HWM, Trijbels FJM, Blom HJ. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp Biol Med* 2001;226:243-70.
12. Antony AC. Folate receptors. *Annu Rev Nutr*. 1996;16:501-21.
13. Shen F, Ross JF, Wang X, Ratnam M. Identification of a novel folate receptor, a truncated receptor, and receptor type beta in hematopoietic cells: cDNA cloning, expression, immunoreactivity, and tissue specificity. *Biochemistry*. 1994;33:1209-15.
14. Wang H, Ross JF, Ratnam M. Structure and regulation of a polymorphic gene encoding folate receptor type gamma/gamma'. *Nucleic Acids Res* 1998;26:2132-42.
15. Ragoussis J, Senger G, Trowsdale J, Campbell IG. Genomic organization of the human folate receptor genes on chromosome 11q13. *Genomics*. 1992;14:423-30.
16. Henderson GI, Perez T, Schenker S, Mackins J, Antony AC. Maternal-to-fetal transfer of 5-methyltetrahydrofolate by the perfused human placental cotyledon: evidence for a concentrative role by placental folate receptors in fetal folate delivery. *J Lab Clin Med*. 1995;126:184-203.
17. Strelling MK. Transfer of folate to the fetus. *Dev Med Child Neurol* 1976;18:533-5.
18. Matthews RG, Chose C, Green JM, Matthews KD, Dunlap RB. Folylpolyglutamates as substrates and inhibitors of folate-dependent enzymes. *Adv Enzyme Regul* 1987;26:157-71.
19. Whitehead VM. Polyglutamyl metabolites of folic acid in human liver. *Lancet* 1973;1:743-5.
20. Herbert V, Das KC. Folic acid and vitamin B12. En: Shils ME, Olson JA, Shike M, eds. *Modern nutrition in health and disease*. 8ª ed. Filadelfia (EE.UU.): Lea & Febiger; 1993. p. 402-25.
21. Weir DG, McGing PG, Scott JM. Commentary: Folate metabolism, the enterohepatic circulation and alcohol. *Biochem Pharmacol* 1985;34:1-7.
22. Krumdieck CL, Fukushima K, Fukushima T, Shiota T, Butterworth CE Jr. A long-term study of the excretion of folate and pterins in a human subject after ingestion of <sup>14</sup>C folic acid, with observations on the effect of diphenylhydantoin administration. *Am J Clin Nutr* 1978;31:88-93.
23. Lucock MD, Wild J, Smithells R, Hartley R. In vivo characterisation of the absorption and biotransformation of pteroylglutamic acid in man: a model for future studies. *Biochem Med Metab Biol* 1989;42:30-42.
24. Kelly P, McPartlin J, Goggins M, Weir DG, Scott JM. Unmetabolised folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1790-5.
25. Medscape DrugInfo. Folic acid oral Uses & Dosage. Disponible en: URL: <http://www.medscape.com/druginfo> (acceso 30/4/03).
26. Miller AL, Kelly GS. Homocysteine metabolism: nutritional modulation and impact on health and disease. *Alt Med Rev* 1997;2:234-54.
27. Shane B, Stokstad ELR. Vitamin B<sub>12</sub> folate interrelationships. *Ann Rev Nutr* 1985;5:115-41.
28. Folate. En: Commission of the European Communities. Reports of the Scientific Committee for Food. Thirty-first series. Nutrient and energy intakes for the European Community. Luxemburgo: Office for Official Publications of the European Communities; 1993. p. 93-8.
29. Martínez de Aragón MV, Llácer A. Mortalidad en España 1995. Mortalidad general y principales causas de muerte y de años potenciales de vida perdidos (I). *Boletín Epidemiológico Semanal* 1998;6:105-16.
30. Instituto Nacional de Estadística. Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Nutrición. Encuesta de presupuestos Familiares 1990-91. Estudio Nacional de Nutrición y Alimentación 1991. Tomo I. Madrid: Instituto Nacional de Estadística; 1995.
31. Aranceta J, Serra LI, Ortega R, Entrala A, Gil A. Libro Blanco: Las vitaminas en la alimentación de los españoles. 1ª ed. Madrid: Panamericana; 2001.
32. García Closas R, Serra Majem L, Sabater Sales G, Olmos Castellvell M, Ribas Barba L, Salleras Sanmartí L. Distribución de la concentración sérica de vitamina C, ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> en una muestra representativa de la población adulta de Cataluña. *Med Clin (Barc)* 2002;118:135-41.
33. Vioque J, Quiles J, García de la Hera M, Guillén M, Ponce E, Muñoz P. Ingestión de ácido fólico y factores asociados en mujeres adultas de 15 a 44 años de la Comunidad Valenciana. *Med Clin (Barc)* 2000;114:414-6.
34. Serra Majem L, Aranceta J, Mataix J, editores. *Nutrición y salud pública. Método, bases científicas y aplicaciones*. Barcelona: Masson, 1995.
35. Zittoun J, Zittoun R. Modern clinical testing strategies in cobalamin and folate deficiency. *Semin Hematol* 1999;36:35-46.
36. Herbert V, Zalusky R. Interrelations of vitamin B12 and folic acid metabolism: Folic acid clearance studies. *J Clin Invest* 1962;41:1263-76.
37. Snow CF. Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency: a guide for the primary care physician. *Arch Intern Med*. 1999;159:1289-98.
38. Wright JD, Bialostosky K, Gunter EW, Carroll MD, Najjar MF, Bowman BA, Johnson CL. Blood folate and vitamin B12: United States, 1988-94. *Vital Health Stat* 1998;243:1-78.
39. Folate Status in Women of Childbearing Age - United States, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000;49:962-5.
40. Bailey LB. Factors that affect folate bioavailability. *Food Technol* 1988;42:206-12.

41. Introduction to Dietary Reference Intakes. En: Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington (EE.UU.); National Academies Press; 2000. p. 17-26. URL: <http://www.nap.edu/books/0309065542/html/index.html> (acceso 20/2/03).
42. McKillop DJ, Pentieva K, Daly D, McPartlin JM, Hughes J, Strain JJ, y cols. The effect of different cooking methods on folate retention in various foods that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. *Br J Nutr* 2002;88:681-8.
43. González-Gross M, Sola R, Castillo MJ. Folate: una vitamina en constante evolución. *Med Clin (Barc)* 2002;119:627-35.
44. Green R, Miller JW. Folate deficiency beyond megaloblastic anemia: hyperhomocysteinemia and other manifestations of dysfunctional folate status. *Semin Hematol* 1999;36:47-64.
45. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56:111-28.
46. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995 Oct 4;274:1049-57.
47. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002;325:1202-6.
48. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, y cols. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA* 1997;277:1775-81.
49. Morrison HI, Schaubel D, Desmeules M, Wigle DT. Serum folate and risk of fatal coronary heart disease. *JAMA* 1996;275:1893-6.
50. Rimm EB, Willett WC, Hu FB, Sampson L, Colditz GA, Manson JE, y cols. Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA* 1998;279:359-64.
51. Schnyder G, Roffi M, Flammer Y, Pin R, Hess OM. Effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid, vitamin B12, and vitamin B6 on clinical outcome after percutaneous coronary intervention. *JAMA* 2002;288:973-9.
52. Clayton PT, Smith I, Harding B, Hyland K, Leonard JV, Leeming RJ. Subacute combined degeneration of the cord, dementia and Parkinsonism due to an inborn error of folate metabolism. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 1986;49:920-927.
53. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). Homocystinuria due to deficiency of N(5,10)-methylene tetrahydrofolate reductase activity. Baltimore, Maryland, (EE.UU.): Johns Hopkins University;2003. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=236250> (acceso 12/5/03).
54. Hyland K, Smith I, Bottiglieri T, Perry J, Wendel U, Clayton PT, y cols. Demyelination and decreased S-adenosylmethionine in 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase deficiency. *Neurology* 1988;38:459-462.
55. Lever EG, Elwes RD, Williams A, Reynolds EH. Subacute combined degeneration of the cord due to folate deficiency: response to methyl folate treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1986;49:1203-7.
56. Reynolds EH. Folic acid, ageing, depression, and dementia. *BMJ* 2002;324:1512-5.
57. Hanger HC, Sainsbury R, Gilchrist NL, Beard ME, Duncan JM. A community study of vitamin B12 and folate levels in the elderly. *J Am Geriatr Soc* 1991;39:1155-9.
58. Baik HW, Russell RM. Vitamin B12 deficiency in the elderly. *Annu Rev Nutr* 1999;19:357-77.
59. Basu TK, Donald EA, Hargreaves JA, Thompson GW, Overton TR, Chao E, Peterson D. Vitamin B12 and folate status of a selected group of free-living older persons. *J Nutr Elder* 1992;11:5-19.
60. Ortega RM, Redondo R, Andres P, Eguileor I. Nutritional assessment of folate and cyanocobalamin status in a Spanish elderly group. *Int J Vitam Nutr Res* 1993;63:17-21.
61. Wolmarans P, Aronson I. Iron, folate and vitamin B12 status of an elderly South African population. *Eur J Clin Nutr* 1997;51:424-30.
62. Herrmann W, Quast S, Ullrich M, Schultze H, Bodis M, Geisel J. Hyperhomocysteinemia in high-aged subjects: relation of B-vitamins, folic acid, renal function and the methylene tetrahydrofolate reductase mutation. *Atherosclerosis* 1999;144:91-101.
63. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1998;55:1449-55.
64. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, y cols. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002;346:476-83.
65. Reutens S, Sachdev P. Homocysteine in neuropsychiatric disorders of the elderly. *Int J Geriatr Psychiatry* 2002;17:859-64.
66. Abou-Saleh MT, Coppen A. Serum and red blood cell folate in depression. *Acta Psychiatr Scand* 1989;80:78-82.
67. Bottiglieri T, Hyland K, Laundry M, Godfrey P, Carney MW, Toone BK, Reynolds EH. Folate deficiency, bipterin and monoamine metabolism in depression. *Psychol Med* 1992;22:871-6.
68. Fava M, Borus JS, Alpert JE, Nierenberg AA, Rosenbaum JF, Bottiglieri T. Folate, vitamin B12, and homocysteine in major depressive disorder. *Am J Psychiatry* 1997;154:426-8.
69. Tiemeier H, van Tuijl HR, Hofman A, Meijer J, Kiliaan AJ, Breteler MM. Vitamin B12, folate, and homocysteine in depression: the Rotterdam Study. *Am J Psychiatry* 2002;159:2099-101.
70. Lee S, Wing YK, Fong S. A controlled study of folate levels in Chinese inpatients with major depression in Hong Kong. *J Affect Disord* 1998;49:73-7.
71. Godfrey PS, Toone BK, Carney MW, Flynn TG, Bottiglieri T, Laundry M, y cols. Enhancement of recovery from psychiatric illness by methylfolate. *Lancet* 1990;336:392-5.
72. Coppen A, Bailey J. Enhancement of the antidepressant action of fluoxetine by folic acid: a randomised, placebo controlled trial. *J Affect Disord* 2000;60:121-30.
73. Alpert JE, Mischoulon D, Rubenstein GE, Bottonari K, Nierenberg AA, Fava M. Folinic acid (Leucovorin) as an adjunctive treatment for SSRI-refractory depression. *Ann Clin Psychiatry* 2002;14:33-8.
74. Masters L. Depresión. En: Dambro MR, Griffith JA, eds. Los 5 minutos clave en la consulta de Atención Primaria. Buenos Aires (Argentina): Waverly Hispánica, S.A.; 1995. p. 264-5.
75. Bottiglieri T, Reynolds EH, Laundry M. Folate in CSF and age. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;69:562.
76. Bottiglieri T, Laundry M, Martin R, Carney MWP, Nissenbaum H, Toone BK, Johnson AL, Reynolds EH. S-adenosylmethionine influences monoamine metabolism. *Lancet* 1984;2:224.
77. Kaufman S. Some metabolic relationships between bipterin and folate: implications for the "methyl trap hypothesis". *Neurochemical Research* 1991;16:1031-1036.

78. Botez MI. Folate deficiency and neurological disorders in adults. *Med Hypotheses* 1976;2:135-40.
79. Botez MI, Fontaine F, Botez T, Bachevalier J. Folate-responsive neurological and mental disorders: report of 16 cases. Neuropsychological correlates of computerized transaxial tomography and radionuclide cisternography in folic acid deficiencies. *Eur Neurol* 1977;16:230-46.
80. Botez MI, Peyronnard JM, Bachevalier J, Charron L. Polyneuropathy and folate deficiency. *Arch Neurol* 1978;35:581-4.
81. Weir DG, Scott JM. The biochemical basis of the neuropathy in cobalamin deficiency. *Baillieres Clin Haematol* 1995;8:479-97.
82. Botez MI, Lambert B. Folate deficiency and restless-legs syndrome in pregnancy. *N Engl J Med* 1977;297:670.
83. Heath CW Jr. Cytogenetic observations in vitamin B<sub>12</sub> and folate deficiency. *Blood* 1966;27:800-15.
84. Sutherland GR. Heritable fragile sites on human chromosomes I. Factors affecting expression in lymphocyte culture. *Am J Hum Genet* 1979;31:125-35.
85. Kim YI, Pogribny IP, Basnakian AG, Miller JW, Selhub J, James SJ, Mason JB. Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation with the p53 tumor suppressor gene. *Am J Clin Nutr* 1997;65:46-52.
86. Duthie SJ. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull* 1999;55:578-92.
87. Mason JB, Levesque T. Folate: effects on carcinogenesis and the potential for cancer chemoprevention. *Oncology* 1996;10:1727-36.
88. Butterworth CE Jr, Hatch KD, Macaluso M, Cole P, Sauberlich HE, Soong SJ, y cols. Folate deficiency and cervical dysplasia. *JAMA* 1992;267:528-33.
89. Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B, Wilkens LR, Bertram CC, Killeen J, y cols. Association of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and dietary folate with the risk of cervical dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:1275-80.
90. Potischman N, Brinton LA, Laiming VA, Reeves WC, Brenes MM, Herrero R, y cols. A case-control study of serum folate levels and invasive cervical cancer. *Cancer Res* 1991;51:4785-9.
91. Alberg AJ, Selhub J, Shah KV, Viscidi RP, Comstock GW, Helzlsouer KJ. The risk of cervical cancer in relation to serum concentrations of folate, vitamin B12, and homocysteine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:761-4.
92. Weinstein SJ, Ziegler RG, Frongillo EA Jr, Colman N, Sauberlich HE, Brinton LA, y cols. Low serum and red blood cell folate are moderately, but nonsignificantly associated with increased risk of invasive cervical cancer in U.S. women. *J Nutr* 2001;131:2040-8.
93. Lashner BA, Heidenreich PA, Su GL, Kane SV, Hanauer SB. The effect of folate supplementation on the incidence of dysplasia and cancer in chronic ulcerative colitis. A case control study. *Gastroenterology* 1989;97:255-9.
94. Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA y cols. A methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1996;56:4862-4.
95. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, y cols. Methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57:1098-02.
96. Eichholzer M, Luthy J, Moser U, Fowler B. Folate and the risk of colorectal, breast and cervix cancer: the epidemiological evidence. *Swiss Med Wkly* 2001;131:539-49.
97. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, y cols. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999;70:495-501.
98. Barkai G, Arbuzova S, Berkenstadt M, Heifetz S, Cuckle H. Frequency of Down's syndrome and neural-tube defects in the same family. *Lancet* 2003;361:1331-5.
99. Nelen WLDM, Blom HJ, Steegers EAP, den Heijer M, Eskes TKAB. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2000;74:1196-9.
100. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessing HK, y cols. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse perinatal outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 2000;71:962-8.
101. Mahomed K. Folate supplementation in pregnancy (Cochrane Review). En: *The Cochrane Library*, Issue 1 2003. Oxford: Update Software.
102. Scholl TO, Johnson WG. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2000;71(suppl):1295S-303S.
103. Bender A. Homocysteine in heart disease. Disponible en: URL: <http://www.biochem.ucl.ac.uk/~dab/C41/C41DAB3notes.pdf> (acceso 28/4/03).
104. Vitamin B12. En: *Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. Washington (EE.UU.); National Academies Press; 2000. p. 306-356. URL: <http://www.nap.edu/books/0309065542/html/index.html> (acceso 20/2/03).
105. Tudhope GR, Swan HT, Spray GH. Patient variation in pernicious anaemia, as shown in a clinical trial of cyanocobalamin, hydroxocobalamin and cyanocobalamin-zinc tannate. *Br J Haematol* 1967;13:216-28.
106. Adams JF, Ross SK, Mervyn RL, Boddy K, King P. Absorption of cyanocobalamin, coenzyme B12, methylcobalamin, and hydroxocobalamin at different dose levels. *Scand J Gastroenterol* 1971;6:249-52.
107. Berlin H, Berlin R, Brante G. Oral treatment of pernicious anemia with high doses of vitamin B12 without intrinsic factor. *Acta Med Scand* 1968;184:247-58.
108. Klee GG. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B<sub>12</sub> and folate. *Clin Chem* 2000;46(8 Pt 2):1277-83.
109. Adams JF, Tankel I II, MacEwan F. Estimation of the total body vitamin B12 in the live subject. *Clin Sci* 1970;39:107-13.
110. Reizenstein P, Ek G, Matthews CM. Vitamin B12 kinetics in man. Implications on total-body B12 determinations, human requirements, and normal and pathological cellular B12 uptake. *Phys Med Biol* 1966;11:295-306.
111. Stahlberg KG, Radner S, Norden A. Liver B12 in subjects with and without vitamin B12 deficiency. A quantitative and qualitative study. *Scand J Haematol* 1967;4:312-30.
112. Reizenstein P. Excretion of non-labeled vitamin B12 in man. *Acta Med Scand* 1959;165:313-20.
113. Adams JF. Correlation of serum and urine vitamin B12. *BMJ* 1970;1:138-9.
114. Hoffbrand AV, Jackson BF. Correction of the DNA synthesis defect in vitamin B12 deficiency by tetrahydrofolate: evidence in favour of the methyl-folate trap hypothesis as the cause of megaloblastic anaemia in vitamin B12 deficiency. *Br J Haematol* 1993;83:643-7.



115. Vitamin B<sub>12</sub>. En: Commission of the European Communities. Reports of the Scientific Committee for Food. Thirty-first series. Nutrient and energy intakes for the European Community. Luxemburgo: Office for Official Publications of the European Communities; 1993. p. 107-16.
116. Pennypacker LC, Allen RH, Kelly JP, Matthews LM, Grigsby J, Kaye K, et al. High prevalence of cobalamin deficiency in elderly outpatients. *J Am Geriatr Soc* 1992;40:1197-204.
117. Carmel R, Green R, Jacobsen DW, Qian GD. Neutrophil nuclear segmentation in mild cobalamin deficiency: Relation to metabolic tests of cobalamin status and observations on ethnic differences in neutrophil segmentation. *Am J Clin Pathol* 1996;196:57-63.
118. Heaton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Lindenbaum J. Neurologic aspects of cobalamin deficiency. *Medicine (Baltimore)* 1991;70:229-45.
119. Savage D, Gangaidzo I, Lindenbaum J. Vitamin B<sub>12</sub> deficiency is the primary cause of megaloblastic anemia in Zimbabwe. *Br J Haematol* 1994;86:844-50.
120. Martin DW Jr. Vitaminas hidrosolubles. En: Martin DW, Mayes PA, Rodwell VW, editores. *Bioquímica de Harper*. 8ª ed. México, DF: El Manual Moderno, S.A.; 1982. p. 99-115.
121. Vitamin B<sub>6</sub>. En: Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B<sub>6</sub>, Folate, Vitamin B<sub>12</sub>, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington (EE.UU.); National Academies Press; 2000. p. 150-95. URL: <http://www.nap.edu/books/0309065542/html/index.html> (acceso 20/2/03).
122. Hamm MW, Mchansho II, Henderson LM. Transport and metabolism of pyridoxamine and pyridoxamine phosphate in the small intestine of the rat. *J Nutr* 1979;109:1552-59.
123. Gregory JF III. Bioavailability of vitamin B<sub>6</sub>. *Eur J Clin Nutr* 1997;51:S43-S48.
124. Merrill AH Jr, Henderson JM, Wang W, McDonald BW, Millikan WJ. Metabolism of vitamin B-6 by human liver. *J Nutr* 1984;114:1664-74.
125. Lumeng L, Ryan MP, Li TK. Validation of the diagnostic value of plasma pyridoxal 5'-phosphate measurements in vitamin B<sub>6</sub> nutrition of the rat. *J Nutr* 1978;108:545-53.
126. Fonda ML, Trauss C, Guempel UM. The binding of pyridoxal 5'-phosphate to serum human albumin. *Arch Biochem Biophys* 1991;288:79-86.
127. Coburn SP, Lewis DL, Fink WJ, Mahuren JD, Schaltenbrand WE, Costill DL. Human vitamin B<sub>6</sub> pools estimated through muscle biopsies. *Am J Clin Nutr* 1988;48:291-4.
128. Lui A, Lumeng L, Aronoff GR, Li TK. Relationship between body store of vitamin B<sub>6</sub> and plasma pyridoxal-P clearance: metabolic balance studies in humans. *J Lab Clin Med* 1985;106:491-7.
129. Frye RE, Jabbour SA. Pyridoxine deficiency. Disponible en: URL: <http://www.emedicine.com/med/topic1977.htm> (acceso 30/4/03).
130. Mueller JF, Vilter RW. Pyridoxine deficiency in human beings induced by desoxypyridoxine. *J Clin Invest* 1950;29:1103-21.
131. Snyderman SE, Holt LE, Carretero R, Jacobs K. Pyridoxine deficiency in the human infant. *Am J Clin Nutr* 1953;1:200.
132. Bessey OA, Adam DJ, Hansen AE. Intake of vitamin B<sub>6</sub> and infantile convulsions: A first approximation of requirements of pyridoxine in infants. *Pediatrics* 1957;20:33-44.
133. Hawkins WW, Barsky J. An experiment on human vitamin B<sub>6</sub> deprivation. *Science* 1948;108:284-6.
134. Sharma SK, Bolster B, Dakshinamurti K. Seizure activity in pyridoxine-deficient adult rats. *Epilepsia* 1992;33:235-47.
135. Guilarte TR. Vitamin B<sub>6</sub> and cognitive development: Recent research findings from human and animal studies. *Nutr Rev* 1993;51:193-8.
136. Brattström L, Israelsson B, Norrving B, Bergqvist D, Thorne J, Hultberg B, Hamfelt A. Impaired homocysteine metabolism in early-onset cerebral and peripheral occlusive arterial disease. Effects of pyridoxine and folic acid treatment. *Atherosclerosis* 1990;81:51-60.
137. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998;157 [Suppl 2]:S40-S44.
138. Rodwell VW. Biosíntesis de aminoácidos. En: Martin DW, Mayes PA, Rodwell VW, editores. *Bioquímica de Harper*. 8ª ed. México, DF: El Manual Moderno, S.A.; 1982. p. 262-75.
139. Martínez-Chantar ML, García-Trevijano ER, Ujue M, Pérez-Mato I, Sánchez del Pino MM, Corrales FJ, Avila MA, Mato JM. Importance of a deficiency in S-adenosyl-L-methionine synthesis in the pathogenesis of liver injury. *Am J Clin Nutr* 2002;76(suppl):1177S-82S.
140. Ogawa H, Fujioka M. Purification and Properties of Glycine N-methyltransferase from Rat Liver. *J. Biol. Chem* 1982;257:3447-3452.
141. Yeo E-J, Wagner C. Purification and Properties of Pancreatic Glycine N-methyltransferase. *J Biol Chem* 1992;267:24669-24674.
142. Zamierowski MM, Wagner C. Identification of Folate Binding Proteins of Rat Liver. *J Biol Chem* 1977;252:933-938.
143. Wagner C, Briggs WT, Cook RJ. Inhibition of Glycine N-methyltransferase: Implications for Regulation of Methyl Group Metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;127:746-752.
144. Cook RJ, Horne DW, Wagner C. Effect of Dietary Methyl Group Deficiency on One-Carbon. *Metabolism J Nutr* 1989;119:612-617.
145. Balaghi M, Horne DW, Wagner C. Hepatic One-Carbon Metabolism in Early Folate Deficiency in Rats. *Biochem J* 1993;291:145-149.
146. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990;1:228-237.
147. Geller AM, LeGros HL, Wherry K, Kotb MY. Inhibition of methionine adenosyltransferase by the polyamines. *Arch Biochem Biophys* 1997;345:97-102.
148. Grimble RF, Grimble CK. Immunonutrition: role of sulfur amino acids, related amino acids and polyamines. *Nutrition* 1998;14:605-10.
149. Goulding CW, Postigo D, Matthews RG. Cobalamin-Dependent Methionine Synthase Is a Modular Protein with Distinct Regions for Binding Homocysteine, Methyltetrahydrofolate, Cobalamin, and Adenosylmethionine. *Biochemistry* 1997;36:8082-8091.
150. Chango A, Parrot-Roulaud F, Nicolas JP. Génétique moléculaire de la reméthylation de l'homocystéine. *Ann Biol Clin* 1999;57:37-42.
151. Kutzbach C, Stockstad ELR. Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta* 1971;250:459-477.

152. Finkelstein J.D. Methionine metabolism: the next 10 years. Disponible en: URL: <http://www.boehringer-ingenheim.es/workshop-methionina/inglesa/cap28.htm> (acceso 20/4/03).
153. Garibotto G, Sofía A, Saffiotti S, Russo R, Deferrari G, Rossi D, y cols. Interorgan exchange of amino thiols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284:E757-63.
154. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP. S-adenosylmethionine and methylation. *FASEB J* 1996;10:471-80.
155. Moephuli SR, Klein NW, Baldwin MT, Krider HM. Effects of methionine on the cytoplasmic distribution of actin and tubulin during neural tube closure in rat embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:543-8.
156. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999;99:247-57.
157. De la Peña Fernández A, Redondo Bellón P. Radicales libres y mecanismos antioxidantes. Generalidades y aplicaciones en la práctica clínica. *Revista Clínica Española* 1997;197:434-46.
158. Wardman P, Candeias LP. Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res* 1996;145:523-31.
159. Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000;149:43-50.
160. Lentz SR. Homocysteine and vascular dysfunction. *Life Sci* 1997;61:1205-1215.
161. Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem* 1998;44:1833-43.
162. Ueland PM. Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem* 1995;41:340-2.
163. Andersson A, Lindgren A, Arnadottir M, Prytz H, Hultberg B. Thiols as a measure of plasma redox status in healthy subjects and in patients with renal or liver failure. *Clin Chem* 1999;45:1084-6.
164. Ueland PM, Mansoor MA, Guttormsen AB, Müller F, Aukrust P, Refsum H, Svandal AM. Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocysteine and other amino thiols in plasma comprise the redox thiol status – A possible element of the extracellular antioxidant defense system. *H Nutr* 1996;126:1281S-84S.
165. Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:15036-15040.
166. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 2000;62:649-71.
167. Poot M, Teubert H, Rabinovitch PS, Kavanagh TJ. De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. *J Cell Physiol* 1995;163:555-60.
168. Cotgreave IA, Gerdes RG. Recent trends in glutathione biochemistry--glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem Biophys Res Commun* 1998;242:1-9.
169. Anderson ME, Meister A. Dynamic state of glutathione in blood plasma. *J Biol Chem* 1980;255:9530-3.
170. Winterbourn CC, Metodiewa D. The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch Biochem Biophys* 1994;314:284-90.
171. Mayes PA. Metabolismo de los carbohidratos. En: Martin DW, Mayes PA, Rodwell VW, editores. *Bioquímica de Harper*. 8ª ed. México, DF: El Manual Moderno, S.A. 1982. p. 175-85.
172. Deneke S, Fanburg B. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 1989;257:L163-73.
173. Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. The cell-damaging effects of low amounts of homocysteine and copper ions in human cell line cultures are caused by oxidative stress. *Toxicology* 1997;123:33-40.
174. Taoka S, Ohja S, Shan X, Kruger WD, Banerjee R. Evidence for heme-mediated redox regulation of human cystathionine  $\beta$ -synthase activity. *J Biol Chem* 1998;273:25179-84.
175. Chen Z, Chakraborty S, Banerjee R. Demonstration that mammalian methionine synthases are predominantly cobalamin-loaded. *J Biol Chem* 1995;270:19246-9.
176. Corrales F, Ochoa P, Rivas C, Martín-Lomas M, Mato JM, Pajares MA. Inhibition of glutathione synthesis in the liver to S-adenosyl-L-methionine synthetase reduction. *Hepatology* 1991;14:528-533.
177. Sánchez-Góngora E, Ruiz F, Mingorance J, An W, Corrales JM, Mato JM. Interaction of liver methionine adenosyltransferase with hydroxyl radical. *FASEB J* 1997;11:1013-19.
178. Ruiz F, Corrales FJ, Miqueo C, Mato JM. Nitric oxide inactivates rat hepatic methionine adenosyltransferase in vivo by S-nitrosylation. *Hepatology* 1998;28:1051-7.
179. Meister A. Metabolism and transport of glutathione and other glutamyl compounds. En: Larsson A, Orrenius S, Holmgren A, Mannervik B, editores. *Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects*. Nueva York (EE.UU.): Raven Press; 1983. p. 1-22.
180. Mosharov E, Cranford ME, Banerjee R. Quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* 2000;39:13005-11.
181. Ishibashi M, Akazawa S, Sakamaki H, Matsumoto K, Yamasaki H, Yamaguchi Y, y cols. Oxygen-induced embryopathy and the significance of glutathione-dependent antioxidant system in the rat embryo during early organogenesis. *Free Radic Biol Med* 1997;22:4557-54.
182. Sivan E, Lee YC, Wu YK, Reece EA. Free radical scavenging enzymes in fetal dysmorphogenesis among offspring of diabetic rats. *Teratology* 1997;56:343-9.
183. Ornoy A, Zaken V, Kohen R. Role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes-induced anomalies in rat embryos in vitro: reduction in antioxidant enzymes and low-molecular-weight antioxidants (LMWA) may be the causative factor for increased anomalies. *Teratology* 1999;60:376-86.
184. Chang TI, Horal M, Jain SK, Wang F, Patel R, Loeken MR. Oxidant regulation of gene expression and neural tube development: Insights gained from diabetic pregnancy on molecular causes of neural tube defects. *Diabetologia* 2003;46:538-45.

# 10 Papel del metabolismo del folato en la etiopatogenia de los defectos del tubo neural

## 10.1 Introducción

La presunción de que la aminopterina podía causar defectos del tubo neural (DTNs) marcó el inicio del vínculo entre los folatos y estas malformaciones. Así, en 1952 Thiersch informó de los presuntos efectos nocivos de la aminopterina (antagonista del folato utilizado como agente abortivo) sobre una serie de 12 pacientes. Tres de los fetos presentaron defectos congénitos graves, esto es, una hidrocefalia, una fisura palatina y un meningoencefalocele<sup>1</sup>. Otras experiencias con antifolatos también dieron lugar a fracasos similares<sup>2-4</sup>, por lo que esta modalidad abortiva se dejó de practicar.

Una década más tarde, Elizabeth Hibbard y Richard Smithells realizaron la prueba del FIGLU (prueba dinámica para la detección de la carencia de folatos, apartado 12.2.4.3) en etapas tardías del embarazo y en el puerperio precoz, hallando déficit de folatos en el 69% de 35 madres de niños con defectos del sistema nervioso central (SNC) frente al 17% de 35 controles apareados por edad y paridad ( $p < 0,01$ )<sup>5</sup>. Aunque no especificaron el tipo concreto de defecto, suponemos que una proporción importante debía pertenecer a DTNs debido a su alta prevalencia en el país donde se produjeron los nacimientos (Reino Unido) y a que son las malformaciones más frecuentes del SNC.

Pero no fue hasta 1976 que se publicó el primer trabajo que relacionó directamente los DTNs con el status de folatos. Smithells y cols.<sup>6</sup> hallaron niveles de folato eritrocitario y sérico inferiores con respecto a los controles en las madres de seis niños con DTNs (uno de ellos “sólo” era microcéfalo), aunque la diferencia fue significativa sólo para el eritrocitario. Obviamente, fue una serie de pocos casos, pero permitió a este grupo de investigadores, tras incorporar los resultados de los trabajos mencionados en los párrafos anteriores, iniciar la senda de la prevención primaria de los DTNs<sup>7-11</sup>. A pesar de ser pionero, el grupo de Smithells nunca pudo llevar a cabo un estudio aleatorizado ya que no se lo permitieron dos comités éticos, por consiguiente, todos los ensayos que realizó fueron cuasi-experimentales.

El papel de los folatos se ve avalado por la mayor frecuencia de DTNs en los hijos de madres de condición socioeconómica baja<sup>12</sup>, consumidoras de una dieta pobre y poco variada<sup>6,12</sup> y residentes en un área con alta prevalencia de estas anomalías, aunque la emigración a áreas de prevalencia inferior revierte el riesgo asociado a esta última circunstancia<sup>13</sup>.

Aun con todo, no sólo el factor nutricional favorece la aparición de estas anomalías. Como apuntó Brian Hibbard, si hay un problema metabólico de base, los requerimientos nutricionales habituales pueden verse exacerbados<sup>12</sup>, entonces, algunos DTNs serían el producto de una interacción anómala entre el genotipo (enzimas

que regulan el metabolismo del ácido fólico) y el ambiente (factor nutricional) con el resultado de un fenotipo anómalo o DTN. En los apartados que siguen trataremos las investigaciones que respaldan estas hipótesis.

## **10.2 Estudios sobre la utilidad de los folatos para la prevención primaria de los defectos del tubo neural**

### **10.2.1 La interpretación de los estudios según la Medicina Basada en la Evidencia**

Como la finalidad de los estudios sobre el uso de los folatos para prevenir los DTNs es averiguar su utilidad en la práctica clínica, presentaremos los distintos trabajos agrupados de acuerdo con la calidad creciente de las evidencias aportadas, esto es, observacionales (casos y controles, cohortes), cuasi-experimentales y experimentales.

#### **10.2.2 Estudios observacionales**

Disponemos hasta la fecha de ocho estudios observacionales sobre la utilidad de los suplementos con ácido fólico<sup>14-21</sup>. Todos ellos, a excepción del de Milunsky y cols.<sup>18</sup>, fueron retrospectivos. En el más antiguo, de Winship y cols.<sup>14</sup>, no sólo se estudió la exposición a especialidades con ácido fólico, sino que se investigaron todos los fármacos que habían tomado 764 mujeres que habían tenido un hijo con un defecto del SNC y un número equivalente de controles. La odds ratio (OR) de dar a luz un feto con estos defectos para las mujeres que habían ingerido ácido fólico durante el trimestre previo a la fecha de última regla era de 0,14 con respecto a las mujeres que no lo habían tomado, y el intervalo de confianza del 95% (IC 95%) de 0,003-1,11. Los demás estudios estudiaron el efecto del ácido fólico como componente de preparados polivitamínicos y no el de otros fármacos (tabla 10.1)<sup>15-21</sup>.

El problema de las investigaciones observacionales es que no se sabe si la protección contra los DTNs es conferida por los folatos o por otro factor que confluye en las mujeres que deciden tomarlos en la etapa periconcepcional, en otras palabras, es difícil discernir si los folatos son los responsables del beneficio observado o son un factor de confusión. Otro inconveniente reside en la dificultad de

**Tabla 10.1.- Estudios observacionales sobre el riesgo de defectos del tubo neural según el uso materno de ácido fólico/polivitamínicos periconcepcionales.**

<i>Estudio</i>	<i>Diseño</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Cronología y dosificación de suplementos/folatos dietéticos</i>
<i>Mulinare y cols. (1988)</i>	Casos y controles	Atlanta (Metropolitan Atlanta Congenital Defects Program)	Polivitamínico con 0-0,8 mg de ácido fólico desde tres meses antes de la concepción hasta el tercer mes de gestación
<i>Bower &amp; Stanley (1989)</i>	Casos y controles	Australia Occidental	Folato de la dieta y polivitamínicos desde un mes antes de la concepción y durante el primer trimestre
<i>Mills y cols. (1989)</i>	Casos y controles	California e Illinois	Polivitamínicos con 0-0,8 mg de ácido fólico y folato de la dieta desde 30 días antes a 45 días después de la fecha de última regla
<i>Milunsky y cols. (1989)</i>	Cohortes	Nueva Inglaterra	Polivitamínicos con 0-1 mg de ácido fólico y folatos de la dieta durante los tres primeros meses de embarazo
<i>Martínez-Frías &amp; Rodríguez-Pinilla (1992)</i>	Casos y controles	España (Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas)	Uso de 0,3 mg o más de ácido fólico con/sin otras vitaminas en cualquier momento durante el primer trimestre
<i>Werler y cols. (1993)</i>	Casos y controles	Boston, Filadelfia y Toronto	Polivitamínicos, la mayoría con 0,4 mg de ácido fólico, y folatos de la dieta desde un mes antes hasta un mes después de la última regla
<i>Shaw y cols. (1995)</i>	Casos y controles	California (California Birth Defects Monitoring Program)	Uso de polivitamínicos con cualquier dosis de ácido fólico y folatos de la dieta durante el trimestre previo a la concepción

desligar el efecto de los folatos del de otras vitaminas. Además, en los estudios retrospectivos o de casos y controles hay un sesgo de memoria, puesto que es más probable que las madres de los niños con DTNs recuerden mejor las características de su ingesta de folatos que los controles, o que el investigador sea más persuasivo sobre las madres de hijos enfermos que sobre las madres de los hijos sanos. Así, las desventajas del primer estudio observacional publicado de base poblacional, de Mulinare y cols.<sup>15</sup>, son varias: las participantes tenían que recordar exposiciones a polivitamínicos que habían tenido lugar, en el peor de los casos, 16 años antes; se preguntó a las madres sobre múltiples exposiciones en la etapa periconcepcional, sin incidir específicamente en ninguna de ellas; se recogía el consumo de compuestos multivitamínicos sin concretar su contenido en ácido fólico y a partir de cuatro tomas semanales; las entrevistas fueron telefónicas; y los casos eran madres de niños con cualquier DTN, independientemente de si era aislado, asociado a otros defectos o integrado dentro de un síndrome conocido. Como ventajas citamos que el entrevistador desconocía si la madre era un caso o un control, y que se ajustaron los valores de la OR para una serie de factores de confusión, sin embargo, apenas hubo diferencias con relación a la OR cruda. La OR de tener un hijo con DTN para las usuarias de polivitamínicos periconcepcionales fue de 0,4 (IC 95% 0,25-0,63), esto es, se objetivó un

efecto protector de los mencionados suplementos. Un hallazgo interesante de este estudio fue la ausencia de efecto protector de los polivitamínicos de inicio postconcepcional.

Bower y Stanley también dieron a conocer los resultados de un estudio de casos y controles de base poblacional<sup>16</sup>, cuyas participantes eran madres de 77 casos de DTNs aislados nacidos en Australia Occidental entre 1982 y 1984 y dos grupos de controles, uno con 77 madres de hijos con anomalías congénitas distintas de los DTNs y otro con 154 madres de hijos sanos. Los casos y los controles se aparearon de acuerdo con la fecha de última regla y se ajustaron las ORs para una serie de variables de confusión. Se valoró la ingesta de folato desde un mes antes de la concepción y durante el primer trimestre. Se estableció como referencia el cuartil de menor ingesta de folatos procedentes de suplementos y las ORs ajustadas de tener un hijo con DTN cuando el grupo de control eran las madres de hijos sanos fueron para el segundo, tercer y cuarto cuartiles respectivamente: 0,44 (IC 95% 0,17-1,13), 0,34 (IC 95% 0,13-0,90) y 0,16 (IC 95% 0,06-0,49). Las ORs para la ingesta total de folatos (dieta más polivitamínicos) fueron similares, aunque algo inferiores. Las ORs para el grupo control de madres cuyos hijos padecían otras anomalías distintas de los DTNs fueron ligeramente superiores, esto es, la disminución de riesgo fue menor, lo cual puede atribuirse a que algunas de las anomalías incluidas son folato-sensibles, circunstancia que enmascara el efecto protector del folato ingerido.

El estudio de Mills y cols.<sup>17</sup> también es de base poblacional (California e Illinois) y sus datos se obtuvieron mediante entrevistas telefónicas. Se efectuaron varios análisis estadísticos, el primero incluía todos los DTNs, el segundo excluía los DTNs sindrómicos, y un tercero sólo comprendía los DTNs aislados, sin embargo, estas maniobras no afectaron los resultados. Además, las entrevistas se completaron a los tres meses del diagnóstico en el 72% de los casos y a los cinco en el 98%. Para este trabajo se incluyeron los polivitamínicos, esto es, aquellos preparados que contenían las “Recommended Daily Allowances” (cantidades diarias de nutrientes específicos que son suficientes para satisfacer los requerimientos del 97,5% de los individuos sanos) (capítulo 9) de al menos cuatro vitaminas, y los cereales enriquecidos. También se pudo averiguar la marca de las especialidades farmacéuticas utilizadas en el 57% de las mujeres que habían tomado vitaminas. Los resultados más destacados se especifican en la tabla 10.2.

Como se puede observar, ningún resultado alcanzó la significación estadística, por consiguiente, este trabajo es el único de estas características que no apoya el uso de los folatos sintéticos para la prevención de los DTNs. Los autores del mismo esgrimieron los siguientes argumentos que, a su juicio, pueden ser los responsables de estos resultados:

- El trabajo de Mulinare<sup>15</sup> incluyó participantes que habían dado a luz a un niño con DTN entre 1968 y 1980, mientras que el de Mills<sup>17</sup> reclutó a mujeres cuyos hijos habían sido diagnosticados de DTN entre 1985 y 1987. Como la prevalencia de DTNs había descendido entre 1968 y 1985, es posible que el número de participantes del último estudio fuera insuficiente para poner de manifiesto una diferencia estadísticamente significativa.
- La prevalencia de DTNs es superior en la población de Atlanta (estudio de Mulinare y cols.<sup>15</sup>) que en la de California (estudio de Mills y cols.<sup>17</sup>) (1,26%

frente a 0,91‰ en el periodo 1983-84), lo cual puede modificar el impacto de la prevención con folatos que sería mayor en la población de Atlanta, cuya frecuencia de DTNs es superior<sup>13</sup>.

- Es posible que los DTNs folato-sensibles sean más frecuentes en Atlanta que en California e Illinois.
- Es posible que la susceptibilidad a la carencia de folatos de la población estadounidense sea inferior a la del Reino Unido, país que había aportado en el momento de la publicación de este artículo varios ensayos clínicos favorables a la prevención primaria con ácido fólico<sup>9,22</sup> en mujeres con antecedentes de hijo previo con DTN.

**Tabla 10.2.- Odds ratios ajustadas de las usuarias de polivitamínicos de tener un hijo con defecto del tubo neural según el estudio de Mills y cols.<sup>17</sup>.**

<b>Fuentes de ácido fólico</b>	<b>ORs (IC 95%)</b>
<i>Suplementos vitamínicos y cereales</i>	
Cantidad ≥ RDA frente a ningún suplemento	1,00 (0,83-1,20)
Cualquier cantidad frente a ningún suplemento	1,06 (0,93-1,21)
<i>Sólo suplementos vitamínicos</i>	
Cantidad ≥ RDA frente a ningún suplemento	0,91 (0,75-1,08)
Cualquier cantidad frente a ningún suplemento	0,97 (0,82-1,13)

ORs (odds ratio), RDA (recommended daily allowances), IC 95% (intervalo de confianza del 95%).

Wald también apunta como posible explicación de los resultados de Mills y cols.<sup>17</sup> la ingesta dietética de folato superior a la media entre mujeres californianas que pudo enmascarar el efecto de los suplementos con folatos<sup>23</sup>.

Milunsky y cols. exploraron la relación existente entre la ingesta de multivitamínicos en general y ácido fólico en particular con el riesgo de portar un hijo con un DTN en una cohorte de 23 491 mujeres estadounidenses (22 776 gestaciones informativas en el análisis final) a las que se cribó mediante alfafetoproteína en suero o se les realizó amniocentesis<sup>18</sup>. Este trabajo cuenta con varios inconvenientes, a saber: no es de base poblacional (ello explica la elevada prevalencia de DTNs en mujeres sin suplementos), las entrevistas son telefónicas, las semanas de gestación se adjudicaron según fecha de última regla y no según biometría ecográfica y se desconoce el contenido exacto en ácido fólico de los multivitamínicos que tomaron algunas de las participantes. Como aspectos positivos, destacamos que el 93% de las participantes ignoraban si eran casos o controles, y que las entrevistas se efectuaron en la primera mitad de la gestación. Los resultados crudos obtenidos al comparar las mujeres según los distintos patrones de ingesta de polivitamínicos se representan en la tabla 10.3.

**Tabla 10.3.- Prevalencia de defectos del tubo neural según la ingesta de polivitamínicos con/sin ácido fólico y su cronología en el estudio de Milunsky y cols.<sup>18</sup>.**

	Ninguno	1-6 SG#		A partir de las 7 SG¶	
		Ácido fólico +	Ácido fólico -	Ácido fólico +	Ácido fólico -
Nº de defectos del tubo neural	11	10	3	25	0
Nº total participantes	3157	10 713	926	7795	66
Prevalencia (%o)	3,5	0,9	3,2	3,2	
Estimación de la razón de prevalencia	1,00	<b>0,27</b>	0,93	0,92	
IC 95%		<b>0,12-0,59</b>	0,26-3,3	0,45-1,87	

\* En esta tabla se representa la respuesta a la pregunta: “¿Tomó algún polivitamínico en el transcurso de los tres primeros meses de embarazo?” y si la participante contestaba que sí se le preguntaba: “¿En qué semana de la gestación inició la ingesta del polivitamínico?”

SG: semanas de gestación.

# Entre las mujeres que tomaron polivitamínicos entre las semanas 1 y 6, se ignoraba el contenido en ácido fólico en 36 participantes.

¶ Entre las mujeres que tomaron polivitamínicos a partir de la séptima semana de gestación, el contenido en folato se desconocía en 22 participantes.

IC 95% (intervalo de confianza del 95%).

Los valores estadísticamente significativos se han destacado en negrita.

Como hemos apreciado en la tabla anterior la ingesta de polivitamínicos con ácido fólico en el transcurso de las seis primeras semanas de amenorrea se traduce en una disminución significativa del 73% de la prevalencia (razón de prevalencia 0,27) con respecto a las mujeres que nunca tomaron multivitamínicos durante la gestación. Por otra parte, ni el consumo de polivitamínicos con ácido fólico después de las seis semanas ni la ingesta de polivitamínicos sin ácido fólico en cualquier momento del embarazo brindan un efecto protector contra los DTNs. La razón de prevalencia especificada previamente (0,27) aumentó ligeramente tras el ajuste por paridad, antecedentes familiares de DTNs, edad, educación, tabaquismo e ingesta dietética de folatos de la madre (0,3 (IC 95% 0,15-0,63)). En este trabajo también se escrutó la ingesta dietética de folatos en el subgrupo de mujeres que no tomaron multivitamínicos con ácido fólico durante las seis primeras semanas de gestación y aunque la estimación puntual de la razón de prevalencia para las participantes que ingirieron más de 100 µg diarios de folatos con respecto a las que ingirieron menos fue de 0,42, no se alcanzó la significación estadística.

El ECEMC (Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas) llevó a cabo un estudio multicéntrico sobre la ingesta de 0,3 ó más mg de ácido fólico con/sin otras vitaminas durante el primer trimestre frente a ninguna exposición gestacional en casos o madres de DTNs (se excluyeron los casos con historia familiar de DTNs) y controles o madres de hijos con otras anomalías distintas a los DTNs<sup>19</sup>. El 17% de 317 gestantes portadoras de un feto con anomalía del tubo neural consumieron ácido fólico frente al 23% de las madres que tuvieron un hijo con otra anomalía. La OR estimada fue de 0,69 (IC 95% 0,51-0,94), o lo que es lo mismo, se halló una disminución significativa de riesgo del 31% para la ingesta de ácido fólico a partir de 0,3 mg en cualquier momento del primer trimestre. Este trabajo cuenta con



varias limitaciones, esto es, sólo dispone de un grupo control de madres de hijos con otras anomalías, de las que algunas pueden ser folato-sensibles, entonces, la OR se puede haber subestimado; tampoco se ha realizado un análisis estratificado según la cronología del consumo de los suplementos con ácido fólico, además se basa únicamente en la exposición a folatos tomados principalmente durante el periodo postconcepcional.

En la investigación de Werler y cols.<sup>20</sup> se escrutó la utilidad de los folatos procedentes tanto de suplementos como de la dieta. Al final se incluyeron 436 casos de madres de DTNs y se excluyeron las participantes que habían portado un feto con DTN previamente, o los DTNs vinculados a cromosomopatías o de herencia mendeliana. Los controles eran 2615 madres de niños con malformaciones mayores, a excepción de fisuras labiopalatinas (a causa de su probable folato-sensibilidad)<sup>24</sup>. En la tabla 10.4 se sintetizan los resultados principales, esto es, se documentó un riesgo un 40% inferior de tener un hijo con un DTN si se habían tomado suplementos periconcepcionales diarios con ácido fólico en comparación con las mujeres que no habían ingerido suplemento alguno. Al igual que en el estudio de Mulinare y cols.<sup>15</sup> no se halló beneficio de los suplementos iniciados después de la concepción (inicio en el segundo mes lunar en la tabla 10.4). La dosis de ácido fólico más común fue la de 0,4 mg, para la cual el valor de la OR fue de 0,3 (IC 95% 0,1-0,6). Como algunas participantes conocían los beneficios preventivos del ácido fólico, y este conocimiento podía falsear sus respuestas, se repitió el análisis estadístico incluyendo sólo a las mujeres que ignoraban su efecto preventivo, entonces, la disminución de riesgo documentada fue del 60% (OR=0,4, IC 95% 0,2-0,6). En la tabla 10.5 se representan los valores de las ORs de portar un feto con DTN para los distintos quintiles de ingesta de folatos entre las madres que no ingirieron fármacos con ácido fólico y se objetivó una OR puntual inferior a uno para los tres quintiles superiores con relación al quintil inferior, sin embargo, sólo el segundo quintil alcanzó un beneficio estadísticamente significativo. Además, se halló una tendencia estadísticamente significativa entre el incremento de la ingesta y el riesgo decreciente de ser madre de un niño con un DTN ( $p=0,002$ ). Entre los inconvenientes de este último trabajo destacamos: la obtención de la información mediante entrevistas telefónicas, la inclusión de controles con otras anomalías, la posibilidad de sesgo de memoria (entre la entrevista y el nacimiento transcurrió una media de cuatro meses, y en bastantes casos se alcanzaron los 20 meses) y que no es un estudio de base poblacional. Por otra parte, los hallazgos más sobresalientes de esta investigación se concretan en la utilidad de los suplementos diarios con 0,4 mg de ácido fólico exclusivamente en el periodo periconcepcional y la comprobación de la existencia de un gradiente inversamente proporcional entre la ingesta de folatos naturales de la dieta y el riesgo de tener un hijo con un DTN, todo ello en una muestra de mujeres canadienses y estadounidenses, entre las que los DTNs son menos prevalentes que entre las residentes en las Islas Británicas<sup>13</sup>.

**Tabla 10.4.- Uso de suplementos en casos (madres de defectos del tubo neural) y controles (madres de niños con otras anomalías distintas a los defectos del tubo neural, salvo fisuras labiopalatinas) en el estudio de Werler y cols.<sup>20</sup> con sus correspondientes odds ratios.**

<i>Uso</i>		<i>Casos N° (%)</i>	<i>Controles N° (%)</i>	<i>OR cruda (IC 95%)</i>	<i>OR multivariada (IC 95%)</i>
<i>Periconcepcional</i>	<i>Ácido fólico diario</i>	34 (8)	339 (13)	<b>0,5 (0,3-0,7)</b>	<b>0,6 (0,4-0,8)</b>
	<i>Ácido fólico &lt; diario</i>	41 (9)	234 (9)	0,9 (0,6-1,3)	0,9 (0,6-1,3)
	<i>Polivitamínicos con contenido desconocido en ácido fólico</i>	3 (1)	41 (2)	-----	-----
	<i>Polivitamínicos sin ácido fólico</i>	1 (<1)	6 (<1)	-----	-----
<i>Inicio en el segundo mes lunar</i>		107 (25)	735 (28)	<b>0,7 (0,6-0,9)</b>	0,8 (0,6-1,0)
<i>Cronología desconocida</i>		0 (0)	7 (<1)	-----	-----
<i>Ausencia de suplementos</i>		250 (57)	1253 (48)	Referencia	Referencia
<b>TOTALES</b>		<b>436 (100)</b>	<b>2615 (100)</b>		

OR (odds ratio), IC 95% (intervalo de confianza del 95%).

Los valores estadísticamente significativos se han destacado en negrita.

**Tabla 10.5.- Odds ratios de tener un hijo con defecto del tubo neural para las ingestas dietéticas medias de folatos entre las madres de 250 casos y 1253 controles que no tomaron suplementos con ácido fólico pertenecientes al estudio de Werler y cols.<sup>20</sup>.**

<i>Quintiles, mg</i>	<i>Casos/controles</i>	<i>OR multivariada (IC 95%)</i>
<i>0,392-2,195</i>	46/236	0,6 (0,4-1,1)
<i>0,311-0,391</i>	38/237	<b>0,6 (0,3-0,9)</b>
<i>0,253-0,310</i>	46/258	0,7 (0,4-1,1)
<i>0,197-0,252</i>	62/260	1,0 (0,7-1,5)
<i>0,031-0,196</i>	58/262	Referencia

OR (odds ratio), IC 95% (intervalo de confianza del 95%).

Los valores estadísticamente significativos se han destacado en negrita.

Shaw y cols., del California Birth Defects Monitoring Program, investigaron si cualquier ingesta periconcepcional de folatos procedentes de suplementos o de la dieta protegía de tener un hijo con un DTN. En su estudio de casos y controles incluyeron 549 madres de casos y 540 controles (el 88% de las candidatas iniciales participaron en el estudio)<sup>21</sup> que fueron entrevistadas personalmente. Las mujeres que ingirieron suplementos farmacológicos con ácido fólico durante los tres meses previos a la concepción tuvieron un riesgo inferior de tener una gestación afectada por un DTN (OR=0,65, IC 95% 0,45-0,94). El consumo de folatos de la dieta, independientemente de la cantidad ingerida diariamente, también resultó ser protector contra los DTNs (OR=0,60, IC 95% 0,46-0,79). Estas ORs tuvieron valores superiores para las hispanas, las mujeres con mayor nivel de instrucción y para las que tomaron más de 227 µg de folato diario. Los autores también detectaron una relación inversamente proporcional entre ser portadora de un hijo con DTN y la ingesta diaria de folatos tanto procedentes de la dieta como de suplementos vitamínicos. Este estudio, al igual que otros detallados previamente, puede presentar un sesgo de memoria.

En este apartado, creemos oportuno mencionar un estudio de Hernández-Díaz y cols.<sup>25</sup>, mucho más reciente que los anteriores, sobre el riesgo inherente al consumo de antifolatos durante el embarazo y la importantísima reducción del mismo al consumir folatos periconcepcionales. Las características y resultados más sobresalientes de este estudio se detallan en el apartado 7.2.5.19.7.

El último estudio publicado hasta la fecha es de cohortes (aunque algunos lo califican como de intervención en comunidades) y se realizó en China<sup>26</sup> según un proyecto aprobado por los Centers for Disease Control and Prevention y la Universidad Médica de Beijing. El estudio fue de base poblacional y se realizó en la provincia de Hebei (Norte de China) con prevalencias de DTNs en torno al 5-6‰ de los nacimientos y en dos provincias del Sur de China (Zhejiang y Jiangsu) con una prevalencia aproximada del 1‰ de los nacimientos. Se registraron las mujeres que se preparaban para el matrimonio entre octubre de 1993 y septiembre de 1995 y que estaban embarazadas en algún momento entre el 1 de octubre de 1993 y el 31 de diciembre de 1996. La cohorte incluyó aquellas mujeres cuyos fetos se pudieron examinar con el objeto de averiguar si eran o no portadores de un DTN. Como en aquel país es costumbre que las mujeres que van a casarse se sometan a una exploración premarital, se aprovechó esta visita para proponerles el inicio de la ingesta diaria de comprimidos con 0,4 mg de ácido fólico hasta el final del primer trimestre de embarazo. Como cada envase contenía 31 comprimidos con ácido fólico, al final de cada mes los trabajadores sanitarios rurales anotaban el número de pastillas que no se habían tomado y se registraban las fechas de última regla. Según la cronología de toma de los suplementos, las participantes se clasificaron en los siguientes grupos:

- Uso periconcepcional: inicio antes de la fecha de última regla y continuación hasta el final del primer trimestre.
- Uso tardío: inicio durante el primer trimestre pero después de la fecha de última regla.
- Abandono precoz: inicio y conclusión del tratamiento antes de la fecha de última regla.
- No usuarias: mujeres que rehúsan tomar el ácido fólico o que al captarse están ya en su segundo trimestre de embarazo.
- Inclasificables: no hay datos suficientes para adscribir a la participante a uno u otro grupo.
- Se identificó un subgrupo de mujeres que tomaron más del 80% de los comprimidos asignados con el fin de escrutar el efecto óptimo de los suplementos con ácido fólico.

Los DTNs fueron diagnosticados por tres pediatras que desconocían si la mujer había tomado o no ácido fólico y se contabilizaron en gestaciones a partir de 20 semanas. Se consideraron DTNs la anencefalia, la espina bífida, la iniencefalia, la craneorraquisquisis, y el encefalocele, independientemente de su asociación a otras anomalías. Se captaron 285 536 participantes entre octubre de 1993 y septiembre de 1995 y tras excluir las que no estaban embarazadas, las perdidas y las gestaciones no informativas se dispuso de 247 831 mujeres (31 960 pertenecientes a la provincia del Norte y 215 871 pertenecientes a la del Sur). Las mujeres que tomaron ácido fólico eran dos años más jóvenes que las que no lo tomaron y eran primigestas con mayor

frecuencia, mientras que para el resto de variables escrutadas (nivel de instrucción, etnia, índice de Quetelet y ocupación) no se hallaron diferencias significativas. El 70% de las mujeres de la provincia del Norte y el 53% de las mujeres de las provincias del Sur tomaron suplementos periconcepcionales, pero la provincia del Norte siguió registrando prevalencias de DTNs superiores al Sur, aunque se pudo objetivar tanto en el Norte como en el Sur una reducción de riesgo de DTNs según la cronología real de los suplementos se acercaba a la cronología recomendada. Los resultados se detallan en la tabla 10.6.

**Tabla 10.6.- Prevalencias y riesgos de defectos del tubo neural según el uso de suplementos farmacológicos con ácido fólico del estudio realizado por Berry y cols.<sup>26</sup> en dos regiones chinas con prevalencia alta (Región del Norte) y baja (Región del Sur) de estas anomalías.**

Uso de suplementos	Región del Norte (n=31 960)				Región del Sur (n=215 871)			
	Nº gestantes	Prevalencia DTNs (%o) (Nº)*	Razón de riesgo (IC 95%)	Reducción de riesgo (%) (IC 95%)	Nº gestantes	Prevalencia DTNs (%o) (Nº)*	Razón de riesgo (IC 95%)	Reducción de riesgo (%) (IC 95%)
<i>Ninguno</i>	13 369	6,5 (87)	1,0	0	104 320	0,8 (86)	1,0	0
<i>Cualquiera</i>	18 591	1,3 (25)	<b>0,21</b> <b>(0,13-0,32)</b>	79 (68-87)	111 551	0,7 (77)	0,84 (0,61-1,14)	16 (-14-39)
<i>Ninguno; registro antes de fecha de última regla</i>	3318	4,8 (16)	1,0	0	28 265	1,0 (28)	1,0	0
<i>Uso periconcepcional</i>	13 012	1,0 (13)	<b>0,21</b> <b>(0,10-0,43)</b>	79 (57-90)	58 638	0,6 (34)	<b>0,59</b> <b>(0,36-0,97)</b>	41 (3-64)
<i>≤80% cumplimiento</i>	4898	1,4 (7)	<b>0,30</b> <b>(0,12-0,70)</b>	70 (30-88)	11 643	0,5 (6)	0,52 (0,20-1,19)	48 (-19-80)
<i>&gt;80% cumplimiento</i>	8114	0,7 (6)	<b>0,15</b> <b>(0,06-0,38)</b>	85 (62-94)	46 995	0,6 (28)	0,60 (0,36-1,02)	40 (-2-64)

\* Prevalencia en gestaciones de 20 ó más semanas de gestación.

Los valores estadísticamente significativos se han destacado en negrita.

Entonces, el consumo periconcepcional de 0,4 mg de ácido fólico disminuye la frecuencia de DTNs tanto en las regiones chinas de baja como de alta prevalencia, aunque la reducción de riesgo es superior en el grupo de participantes más cumplidoras y en las áreas de alta incidencia. Este estudio cuenta con varias ventajas, es decir, es de base poblacional, las pérdidas son mínimas, es una investigación prospectiva y los diagnósticos se establecieron sobre fotografías tomadas al nacimiento y revisión de los historiales clínicos por varios facultativos. Se estratificaron los resultados según la edad de las participantes y su paridad (variables cuyas frecuencias eran distintas entre las consumidoras y no consumidoras de ácido fólico) sin cambiar los resultados ya expuestos. Otros hallazgos interesantes se centran en la homogeneidad étnica y de acceso al diagnóstico prenatal de las mujeres de las dos regiones escrutadas, ya que respaldan la existencia de otros factores no genéticos determinantes de las distintas prevalencias de DTNs en las diferentes regiones chinas. Además, en las mujeres que tomaron el 80% o más de los comprimidos de ácido fólico periconcepcional, las diferencias entre prevalencias de DTNs en las dos regiones consideradas son mínimas (0,7 %o en el Norte frente a 0,6%o en el Sur), hecho que también favorece la hipótesis de la existencia de diferencias dietéticas y no genéticas entre ambas regiones.

### 10.2.3 Estudios experimentales y cuasi-experimentales

La tabla 10.7<sup>9,22,27-30</sup> sintetiza las investigaciones experimentales y cuasi-experimentales más citadas con sus características y resultados más relevantes. El diseño cuasi-experimental obedeció al objetivo de reclutar el máximo número de participantes en el menor tiempo posible, esto es, la asignación al tratamiento no se basó en la autoexclusión o preferencia de las gestantes en pertenecer a uno u otro grupo, sino que las mismas ya estaban embarazadas al entrar en los dos estudios de estas características<sup>9,30</sup>.

Estos trabajos, a excepción del de Czeizel y Dudás, que se centró en la prevención de las primeras ocurrencias<sup>29,31</sup>, se realizaron con mujeres que tenían antecedentes de haber concebido uno o más hijos con DTN, esto es, se estudió si el ácido fólico era útil para la profilaxis de las recurrencias.

Los estudios de Laurence<sup>22</sup>, Kirke<sup>28</sup> y Vergel<sup>30</sup> no nos aportan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos expuestos y no expuestos al ácido fólico, a pesar de que el riesgo relativo (RR) puntual está muy por debajo de uno. Ello parece deberse al menor número de participantes con las que cuentan estos estudios y no a la dosis de ácido fólico administrada. Así, las cantidades de folato sintético administradas varían entre 0,36 y 5 mg en los estudios con resultados no significativos y entre 0,36 y 4 mg en los trabajos con resultados significativos, circunstancia que avalla nuestra hipótesis.

La investigación de Laurence y cols.<sup>22</sup> es la única en la que no sólo se considera el uso de suplementos sino que también se tiene en cuenta la dieta, a pesar de que, a nuestro entender, no se especifican suficientemente los criterios que ha seguido para la adscripción de cada participante a tres categorías ordinales (dietas buenas, moderadas y pobres) según el aporte de folatos en el intervalo intergenésico. Las seis recurrencias que se documentan pertenecen al grupo de dietas pobres en folatos, sin embargo, sólo dos fueron adscritas al grupo del ácido fólico pero no siguieron el tratamiento y las cuatro restantes tomaron placebo. Por otra parte, la asignación aleatoria propia de los estudios experimentales tiende a repartir de forma homogénea en los distintos grupos a las mujeres con aportes dietéticos distintos.

**Tabla 10.7.- Ensayos clínicos sobre el riesgo de defectos del tubo neural según la toma de suplementos periconcepcionales con ácido fólico/polivitamínicos.**

Estudio	Diseño	Ubicación	Antecedente de hijo con DTN	Dosificación diaria de los suplementos	Cronología de los suplementos	Resultados <sup>a</sup>	Reducción de riesgo (RR (IC 95%)) <sup>b</sup> y valor de p <sup>c</sup>
Laurence y cols. (1981)	Experimental	Gales	(+)	Dos grupos: - <b>4 mg</b> de ácido fólico - Placebo	Desde el abandono del método anticonceptivo hasta las 6-9 semanas de amenorrea	2/60 recurrencias en el grupo con ácido fólico frente a 4/51 en grupo con placebo	58% (0,42 (0,08-2,22)) 0,411
MRC (1991)	Experimental	17 centros de Gran Bretaña y 16 de otros países	(+)	Cuatro grupos: - Placebo (sulfato ferroso y fosfato dicálcico). - <b>4 mg</b> de ácido fólico - Polivitamínico (vitaminas A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , C y nicotinamida) - Polivitamínico y <b>4 mg</b> de ácido fólico	Desde la randomización hasta las 12 semanas de amenorrea	6/593 DTNs en los dos grupos con ácido fólico frente a 21/602 en los dos grupos restantes	<b>71%</b> <b>(0,29 (0,11-0,71))</b> <b>0,004</b>
Kirke y cols. (1992)	Experimental	Irlanda	(+)	Tres grupos: - <b>0,36 mg</b> de ácido fólico - Polivitamínico sin ácido fólico (Pregnavite Forte sin ácido fólico) <sup>d</sup> - Polivitamínico con <b>0,36 mg</b> de ácido fólico (Pregnavite Forte F) <sup>d</sup>	Desde dos meses antes de la concepción hasta el tercer mes de gestación	0/169 en los grupos con ácido fólico frente a 1/88 DTN en el grupo con polivitamínico sin ácido fólico	83% (0,17 (0,00-4,24)) 0,342
Czeizel & Dudás (1994)	Experimental	Hungría	(-)	Dos grupos: - Polivitamínico (vitaminas A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , C, E, nicotinamida, biotina, <b>0,8 mg</b> de ácido fólico, calcio, fósforo, magnesio, hierro, cobre, manganeso y zinc) - Placebo (cobre, manganeso, zinc y vitamina C)	Desde un mes antes de la concepción y hasta las 8 semanas de amenorrea	0/2471 DTNs en el grupo con polivitamínico frente a 6/2391 en el grupo con placebo	<b>93%</b> <b>(0,07 (0,00-1,32))</b> <b>0,014</b>
Smithells y cols. (1983)	Cuasi-experimental	Gran Bretaña	(+)	Dos grupos: - Polivitamínico con <b>0,36 mg</b> de ácido fólico (Pregnavite Forte F) <sup>d</sup> - Sin tratamiento	Desde 28 días antes de la concepción hasta el segundo mes de gestación	2/294 en grupo con polivitamínico frente a 11/204 en grupo sin tratamiento	<b>88%</b> <b>(0,12 (0,02-0,56))</b> <b>0,002</b>
Vergel y cols. (1990)	Cuasi-experimental	Cuba	(+)	Dos grupos: - <b>5 mg</b> de ácido fólico - Sin tratamiento	Desde un mes antes de la FUR hasta las 10 semanas de gestación	0/100 en el grupo con ácido fólico frente a 4/118 en grupo sin tratamiento	87% (0,13 (0,00-2,40)) 0,127

<sup>a</sup> Los resultados incluyen únicamente las gestaciones informativas y la adscripción a los distintos grupos es según intención de tratar. <sup>b</sup> El riesgo relativo (RR) e intervalo de confianza del 95% (IC 95%) se han calculado según el método de Katz. <sup>c</sup> Los valores de p se han obtenido por medio del test exacto de Fisher. <sup>d</sup> Pregnavite Forte contiene vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C, D, nicotinamida, sulfato ferroso y fosfato cálcico. DTN (defecto del tubo neural), FUR (fecha de última regla). Las reducciones de riesgo estadísticamente significativas se han destacado en negrita.

## **10.2.4 Conclusiones sobre el efecto preventivo del ácido fólico**

De acuerdo con las investigaciones presentadas previamente, pensamos que el efecto beneficioso del ácido fólico para la prevención primaria de los DTNs se puede resumir en los siguientes puntos:

- Las dosis de ácido fólico que se han mostrado efectivas en las diferentes investigaciones expuestas oscilan, en general, entre los 0,3 mg y los 4 mg diarios, sin embargo, las dosis altas de folatos se excretan en una alta proporción por vía urinaria y sin metabolizar (sección 9.2.2). Entonces, es posible que la dosis mínima efectiva esté en torno a los 0,4 mg.
- El ácido fólico ha mostrado su efectividad en la prevención de dos terceras partes de DTNs, tanto de las recurrencias como de las primeras ocurrencias, lo cual es relevante si tenemos en cuenta que el 95% de los afectados por DTNs son hijos de mujeres sin antecedentes familiares<sup>23</sup>.
- No se ha esclarecido el mecanismo de acción de los suplementos con ácido fólico, ya que muchas de las gestantes portadoras de un hijo con un DTN tienen concentraciones de folatos normales (ver más adelante).

A pesar de que la prevención con ácido fólico ha sido objeto de una investigación intensa y de calidad, opinamos que su recomendación como medida de salud pública a nivel mundial precisa de nuevos estudios que validen su eficacia como principio activo aislado en otras poblaciones con cifras de prevalencia distintas y establezcan la mínima dosis efectiva.

## **10.3 Otras repercusiones de los suplementos con ácido fólico**

### **10.3.1 Abortos espontáneos y embarazos múltiples**

Al analizar los datos del estudio de Czeizel y cols.<sup>29,31</sup> se halló una mayor frecuencia de abortos espontáneos<sup>32</sup> y de embarazos gemelares<sup>29,33</sup> entre las mujeres que habían tomado ácido fólico. Estos resultados, sin embargo, se obtuvieron de un ensayo que fue diseñado para conocer el efecto preventivo de un polivitamínico con 0,8 mg de ácido fólico contra los defectos congénitos y no para averiguar si este fármaco producía o no más abortos. Además, no se procedió ni al estudio anatomopatológico ni cromosómico de los abortos, por lo que estos resultados sólo pueden ser calificados como preliminares, a la espera de otros trabajos de diseño más robusto que apoyen o refuten la hipótesis de que el ácido fólico causa teratanasia (disminución de las proporciones de defectos congénitos por medio de la acción abortiva selectiva sobre

los concebidos afectados<sup>34</sup>).

Windham y cols.<sup>35</sup> efectuaron un estudio prospectivo entre 1990 y 1991 que incluyó 5144 gestaciones, de las que el 9,7% concluyeron en abortos espontáneos. El 10,3% de las mujeres que utilizaron vitaminas durante los periodos pre y/o postconcepcional abortaron frente al 9,0% de las que no las usaron; estos datos se traducen en un RR de aborto para las usuarias de vitaminas de 1,14 (IC 95% 0,96-1,35). Los autores de este estudio concluyeron que el escaso incremento de RR puntual tanto podía deberse a la existencia de factores de confusión (otro factor distinto del consumo de vitaminas es el responsable de que las mujeres las tomen y de que aborten más) como a una hipotética prolongación de la gestación mediada por el uso de los suplementos vitamínicos. De nuevo, se publicaban los resultados de un estudio cuyo fin no era el escrutinio del aborto espontáneo entre las consumidoras de polivitamínicos.

En un metaanálisis de la colaboración Cochrane sobre suplementos vitamínicos para la prevención de DTNs<sup>36</sup> se seleccionaron por su calidad los estudios del Medical Research Council (MRC)<sup>27</sup>, de Kirke<sup>28</sup> y de Czeizel<sup>29</sup>. El RR conjunto de aborto espontáneo para las consumidoras de ácido fólico en los tres estudios mencionados fue de 1,12 (IC 95% 0,98-1,29), esto es, no significativo aunque superior a uno, al igual que los demás estudios mencionados en este apartado.

Un estudio prospectivo excelente sobre los abortos espontáneos procede de la cohorte china mencionada previamente en este capítulo<sup>37</sup>. Éste examinó el riesgo de aborto entre mujeres de la ciudad de Jiaying (sur de China) con embarazos confirmados según su ingesta de 0,4 mg de ácido fólico periconcepcionales. Se excluyeron las que abortaron voluntariamente y las embarazadas que se captaron después de su fecha de última regla, ya que podían haber sufrido un aborto diferido en el momento de su entrada en el estudio, aumentando así la proporción de abortos para las no consumidoras de folatos. Los resultados principales se representan en la tabla 10.8. De la tabla anterior se infiere que incluso en caso de consumo periconcepcional la razón de riesgo puntual es muy próxima a uno y, a pesar del alto número de participantes los resultados no alcanzan la significación estadística en ninguna de las circunstancias consideradas. Además, las edades gestacionales en el momento del diagnóstico del embarazo y del aborto fueron similares entre las mujeres que tomaron y no tomaron ácido fólico, hecho que refuerza la validez del estudio.

El estudio basado en la cohorte china<sup>37</sup> es el que nos aporta evidencias de mayor calidad ya que utiliza un número elevado de participantes; se calculan ratios de riesgo ajustadas; los hábitos tóxicos, que pueden incrementar el riesgo de abortos, son muy poco frecuentes entre las mujeres chinas; la información sobre la cronología y el cumplimiento de la profilaxis con ácido fólico se obtuvo prospectivamente (no hay sesgo de memoria); y dispone de información suficiente sobre todas las gestaciones de las mujeres de un área administrativa china que tuvieron lugar durante un periodo de dos años. Como inconvenientes, los autores reconocen que tienen un error  $\beta$  del 48%, si el error  $\alpha$  es del 5%, para detectar un incremento del 16% (recordamos que la ratio de riesgo del estudio de Czeizel y cols. era de 1,16)<sup>32</sup> sobre la proporción de abortos espontáneos entre mujeres no expuestas a ácido fólico.

**Tabla 10.8.- Proporciones de abortos con sus razones de riesgo crudas y ajustadas entre**



**primigestas de la ciudad de Jiaxing según el uso de ácido fólico durante la gestación (datos del estudio de Berry y cols.<sup>26</sup>).**

Uso de ácido fólico durante la gestación	Gestantes (n=23 806)	Gestantes que abortaron espontáneamente (n=2155)	Abortos espontáneos por cada 100 gestaciones clínicas (IC 95%)	Razón de riesgo (IC 95%)		
				Cruda	Ajustada por educación	Ajustada por ocupación
Ninguno	1871	174	9,3 (8,0-10,7)	-	-	-
Cualquier uso	21 935	1981	9,0 (8,7-9,4)	0,97 (0,84-1,12)	0,97 (0,84-1,12)	0,98 (0,83-1,15)
Periconcepcional*	13 494	1295	9,6 (9,1-10,1)	1,03 (0,89-1,20)	1,03 (0,89-1,20)	1,05 (0,89-1,24)
Cualquier uso salvo periconcepcional**	8311	671	8,1 (7,5-8,7)	0,87 (0,74-1,02)	0,87 (0,74-1,02)	0,87 (0,73-1,04)

n (número de participantes), IC 95% (intervalo de confianza del 95%).

\* Periconcepcional: inicio de la profilaxis con ácido fólico antes de la fecha de última regla y continuación hasta la finalización del primer trimestre o hasta el momento en que se produjo el aborto.

\*\* Cualquier uso salvo periconcepcional: cualquier otro consumo de ácido fólico antes o durante el primer trimestre de la gestación.

Con respecto al aborto espontáneo podemos concluir que:

- Aparentemente, ninguno de los estudios mencionados se diseñaron para escrutar los abortos causados por el ácido fólico.
- Tanto los estudios incluidos en el metaanálisis de la colaboración Cochrane<sup>36</sup> como el estudio de Windham y cols.<sup>35</sup> no desligan el efecto del ácido fólico del resto de vitaminas acompañantes, por lo tanto, no nos parece riguroso atribuir un hipotético riesgo de aborto espontáneo al ácido fólico.
- Es contradictorio que se relacione la hiperhomocisteinemia y la deficiencia de folatos con los abortos espontáneos<sup>38-40</sup> mientras que se defiende una posible teratanasia vinculada a la aplicación de la prevención con ácido fólico.

En definitiva, a falta de nuevas evidencias, los hallazgos más recientes y de mayor calidad no apoyan la teratanasia inducida por el ácido fólico.

Con relación a las gestaciones múltiples, Mathews y cols. aportaron los datos procedentes del Prospective Study of Nutrition, Smoking and Pregnancy Outcome del Reino Unido. Estos datos generaron un RR de 1,08 (IC 95% 0,37-3,15) de gestaciones múltiples entre las mujeres que tomaron ácido fólico<sup>41</sup>. En el metaanálisis de la colaboración Cochrane<sup>36</sup> se calculó un RR conjunto de gestación múltiple para los tres ensayos clínicos previamente mencionados<sup>27-9</sup> de 1,40 (IC 95% 0,93-2,11), es decir, que a pesar de que la estimación puntual es superior a uno, el intervalo de confianza es muy amplio y las diferencias no son significativas.

De nuevo, el estudio disponible de mayor calidad procede de la cohorte china<sup>42</sup>. En él se incluyeron 242 015 mujeres con gestaciones informativas durante el periodo del estudio y cuyos hijos no estaban afectados por un DTN. De estas participantes, sólo el 0,62% tuvieron gestaciones múltiples, el 99,5% de las cuales fueron dobles. Los resultados se muestran en la tabla 10.9.

**Tabla 10.9.- Proporciones de gestaciones múltiples con sus razones de proporciones crudas y ajustadas para embarazos múltiples según el consumo de suplementos con ácido fólico (datos del estudio de Berry y cols.<sup>26</sup>).**

Uso de ácido fólico	Gestaciones múltiples (n=1496)	Porcentaje de gestaciones múltiples (IC 95%)	Razón de proporciones (IC 95%)			
			Cruda	Ajustada por FUR	Ajustada por ocupación	Ajustada por educación
No (n=114 997)	748	0,65 (0,60-0,70)	1,00	1,00	1,00	1,00
Cualquier uso (n=127 018)	748	0,59 (0,55-0,63)	0,91 (0,82-1,00)	0,90 (0,82-1,00)	<b>0,89</b> <b>(0,81-0,99)</b>	0,98 (0,80-1,09)

n (número de participantes), IC 95% (intervalo de confianza del 95%), FUR (fecha de última regla). Los valores estadísticamente significativos se han destacado en negrita.

A la vista de los resultados de la tabla antedicha, no se sostiene un incremento de los embarazos múltiples en este estudio, en todo caso un descenso que se hace significativo sólo si se ajusta la razón de proporciones por la ocupación. De nuevo, las ventajas de este estudio se basan en su alto número de participantes, la uniformidad que caracteriza a la población china con respecto al nivel socioeconómico, al acceso a los recursos sanitarios, a los hábitos tóxicos, a la etnia, o a la paridad. Además, este estudio tiene una potencia del 99,9%, si el error  $\alpha$  es del 5%, para detectar un incremento del 40% de gestaciones múltiples entre las consumidoras de folatos frente a las no consumidoras (el RR puntual de gestación múltiple en el metaanálisis de la colaboración Cochrane mencionado más arriba fue de 1,40)<sup>36</sup>. Como limitaciones destacamos la falta de ingesta de folatos en el segundo y tercer trimestre de la gestación, factor que podría haber favorecido la viabilidad fetal, y la baja prevalencia de gemelos documentada en este trabajo. Ello podría restringir la extensión de estos resultados a otras poblaciones<sup>43</sup>.

### 10.3.2 Enmascaramiento y precipitación de la clínica neurológica del déficit de cobalamina

El tratamiento de la anemia perniciosa con ácido fólico aislado mejora las manifestaciones hematológicas, por consiguiente, puede retrasar el diagnóstico y también precipitar la clínica neurológica de la hipovitaminosis B<sub>12</sub>. Si se detecta esta circunstancia a tiempo, la administración de cobalamina es curativa, pero si se mantiene el tratamiento sólo con ácido fólico, estos cambios pueden ser irreversibles. Por suerte, la anemia perniciosa es muy rara en mujeres en edad fértil (capítulo 9) y en la práctica clínica actual lo más probable es que si hay anemia macrocítica, ésta se estudie mediante concentraciones de cobalamina y folato séricos a la vez<sup>23</sup>.

En general, se piensa que las dosis inferiores a 1 mg de ácido fólico son seguras y se pueden administrar sin supervisión médica, mientras que las dosis de 4 mg precisan cierto control con el fin de que un eventual déficit de cobalamina no pase desapercibido<sup>23,44</sup>. Sin embargo, esta cuestión sigue siendo motivo de controversia,

puesto que la presunta neurotoxicidad del ácido fólico en ausencia de vitamina B<sub>12</sub> se basa en investigaciones antiguas, y además el deterioro neurológico por déficit de B<sub>12</sub> puede ser muy rápido independientemente de si se administra o no ácido fólico<sup>45</sup>. Una revisión excelente de la bibliografía sobre este particular<sup>46</sup> nos ha permitido concretar lo siguiente:

- Antes de la síntesis del ácido fólico (en torno a 1950) se prescribían extractos hepáticos intramusculares (contenían ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub>), pero al objetivarse que las manifestaciones hematológicas podían desaparecer por medio del ácido fólico sintético, se inició su administración aislada, la cual era más ventajosa por ser oral. Sin embargo, se apreció que dosis de 5-500 mg diarios de ácido fólico no mantenían la respuesta hematológica inicial y que no siempre se obtenía una respuesta completa<sup>47-8</sup>.
- La precipitación de la clínica neurológica tuvo lugar en pacientes a los que se les administraron entre 10 y 1000 mg de ácido fólico diarios<sup>49</sup>.

Además, en los Estados Unidos antes de la implantación de la fortificación de los cereales con folatos, un 20% de individuos consumían 0,4 ó más mg de ácido fólico diarios en forma de suplementos y la mayoría de gestantes tomaban 0,8 o más mg de esta vitamina, es decir, la exposición a cantidades no desdeñables de folato era muy frecuente y, sin embargo, no se informó de casos de neurotoxicidad mediadas por los folatos<sup>50</sup>.

De lo anterior, podemos deducir que no es probable ni que con las dosis farmacológicas utilizadas en los ensayos clínicos expuestos en este capítulo ni con las dosis de fortificación iniciadas en los EE.UU. (140 µg/100 g de cereales)<sup>46</sup> e incluso superiores se alcancen niveles tóxicos para la población general.

### **10.3.3 Efectos sobre el umbral convulsivo e interferencia con fármacos antiepilépticos**

La concentración de los fármacos antiepilépticos es inversamente proporcional a la de los folatos séricos<sup>51</sup>, sin embargo sólo las megadosis de ácido fólico administradas por vía endovenosa tienen un efecto epileptógeno<sup>52</sup>. Nuestra opinión es que se pueden prescribir las dosis habituales de ácido fólico para la prevención de primeras ocurrencias (hasta 1 mg diario), a falta de estudios de calidad disponibles que escruten la seguridad de dosis más altas y la efectividad de los suplementos con ácido fólico para la prevención de DTNs en mujeres epilépticas o bajo tratamiento con medicación anticomicial (sección 7.2.5.19.7).

## **10.4 Metabolismo del folato en las madres de hijos con defectos del tubo neural**

## 10.4.1 Estudios en sangre

En la tabla 10.10 se resumen las principales características de 21 de los estudios más difundidos sobre las concentraciones en sangre de diferentes magnitudes relacionadas con el metabolismo del ácido fólico en madres de afectados por DTNs<sup>6,16,53-71</sup>. Si bien el número de controles ha sido numeroso en algunas investigaciones, el número de madres de DTNs ha sido muy inferior, esto es, ha oscilado entre seis y 89.

En cuanto al folato sérico, de 19 estudios que lo han cuantificado, sólo en diez de ellos los valores de sus medias o medianas son superiores en los controles que en los casos, y en dos de ellos la diferencia es estadísticamente significativa y del orden de 1 ng/mL.

Con respecto al folato eritrocitario, son 14 los trabajos que lo han valorado, sólo en ocho éste ha sido superior en los controles, y las diferencias han sido significativas en cuatro estudios. La amplia variedad de valores de folato eritrocitario hace que las diferencias absolutas entre casos y controles sea mayor que con el folato sérico (entre 69 y 90 ng/mL para los trabajos con diferencias estadísticamente significativas).

Dieciséis trabajos han escrutado la cobalamina, en trece de ellos los valores para los casos han sido inferiores a los controles, y además en tres de ellos las diferencias han sido significativas y su amplitud ha variado entre 34 y 129 pg/mL.

Con relación a la homocisteína total (tHcy) disponemos de los resultados de ocho trabajos, pero sólo en cinco de ellos es superior en los casos y únicamente en cuatro la diferencia es estadísticamente significativa (oscila entre 0,6 y 1,7  $\mu\text{mol/L}$ ).

Wald realizó un metaanálisis de los estudios sobre niveles de folatos publicados entre 1976 y 1992, y calculó una OR de tener un hijo con un DTN del 8% inferior en el decil superior de folato sérico frente al inferior<sup>23,67</sup>. Para explicar el porqué de los niveles tan similares de folatos séricos en casos y controles junto con el efecto beneficioso de los folatos periconcepcionales ideó la hipótesis del “efecto de la ventana estrecha” (narrow window effect). Según ésta, el riesgo de portar un

**Tabla 10.10.- Estudios sobre niveles de folatos, cobalamina y homocisteína total en sangre de madres de fetos con defectos del tubo neural.**

Publicación	Obtención muestra	N° de participantes		Concentraciones (media/desviación estándar) de			
				Folato (ng/mL)		Cobalamina (pg/mL)	tHcy (µmol/L)
				Sérico	Eritrocitario		
<i>Emery y cols. (1969)</i>	Postparto	Casos	19	4,9/2,5	-	-	-
		Controles	37	4,6/1,9	-	-	-
<i>Smithells y cols. (1976)<sup>a</sup></i>	1° trimestre	Casos	5 (s) y 6 (eritrocitos)	4,9/1,7	<b>141/25</b>	-	-
		Controles	953 (s) y 959 (eritrocitos)	6,3/3,5	<b>228/58</b>	-	-
<i>Hall (1977)</i>	Gestación	Casos	11	6,3/2,8	-	-	-
		Controles	>1000	6,6/2,9	-	-	-
<i>Schorah y cols. (1980)</i>	1° trimestre	Casos	6	5,2 (mediana)	137 (mediana)	<b>288</b> (mediana) (s)	-
		Controles	48	6,3 (mediana)	228 (mediana)	<b>417</b> (mediana) (s)	-
<i>Laurence y cols. (1981)</i>	Gestación	Casos	4	-	238/106	-	-
		Controles	47	-	281/119	-	-
<i>Molloy y cols. (1985)</i>	Gestación	Casos	32 (28 B <sub>12</sub> )	3,4 (mediana)	-	297 (mediana) (s)	-
		Controles	384 (363 B <sub>12</sub> )	3,4 (mediana)	-	277 (mediana) (s)	-
<i>Yates y cols. (1987)</i>	Postparto	Casos	20	2,8/0,7	<b>178/64</b>	300/130 (s)	-
		Controles	20	3,3/1,4	<b>268/110</b>	320/160 (s)	-
<i>Bower y Stanley (1989)</i>	Postparto	Casos	61	5,6/3,7	301/478	-	-
		Controles	140	5,7/3,6	308/133	-	-
<i>Steegers-Theunissen y cols. (1991)<sup>b</sup></i>	Postparto	Casos	16	6,4/3,1	271/109	365/164 (s)	6,7/3,5 (s)
		Controles	15	5,8/1,7	226/63	328/136 (s)	6,9/2,4 (s)
<i>Economides y cols. (1992)</i>	2° trimestre	Casos	8	9,8 (mediana)	435 (mediana)	205 (mediana) (s)	-
		Controles	24	7,4 (mediana)	400 (mediana)	230 (mediana) (s)	-
<i>Mills y cols. (1992)</i>	1° trimestre	Casos	89	4,1/2,4	-	483/161 (s)	-
		Controles	178	4,3/2,5	-	520/192 (s)	-
<i>Kirke y cols. (1993)</i>	Gestación	Casos	81	<b>3,5</b> (mediana) (p)	<b>269</b> (mediana)	<b>243</b> (mediana) (p)	-
		Controles	247	<b>4,6</b> (mediana) (p)	<b>338</b> (mediana)	<b>296</b> (mediana) (p)	-

Publicación	Obtención muestra	Nº de participantes		Concentraciones (media/desviación estándar) de			
				Folato (ng/mL)		Cobalamina (pg/mL)	tHcy (µmol/L)
				Sérico	Eritrocitario		
<i>Wild y cols. (1993)</i>	Postparto	Casos	29	6,2 (mediana)	247 (mediana)	449 (mediana) (s)	-
		Controles	29	5,5 (mediana)	223 (mediana)	489 (mediana) (s)	-
<i>Stegers-Theunissen y cols. (1994)<sup>c</sup></i>	Postparto	Casos	41	6,4/2,3	257/89	357/133 (s)	<b>11,2/4,0 (p)</b>
		Controles	50	6,4/1,8	237/23	384/143 (s)	<b>9,8/2,6 (p)</b>
<i>Adams y cols. (1995)<sup>d</sup></i>	2º trimestre	Casos	32	10,3 (mediana)	-	297 (mediana) (s)	5,0 (mediana) (s)
		Controles	132	10,3 (mediana)	-	319 (mediana) (s)	5,0 (mediana) (s)
<i>Mills y cols. (1995)<sup>e</sup></i>	1º trimestre	Casos	81	<b>3,5/3,1 (p)</b>	-	<b>263/103 (p)</b>	<b>8,6/2,8 (¿p?)</b>
		Controles	247	<b>4,5/4,3 (4,0/3,6) (p)</b>	-	<b>297/111 (p)</b>	<b>(8,0/2,5) (¿p?)</b>
<i>Wald y cols. (1996)</i>	1º trimestre	Casos	14-18	4,3 (mediana)	156 (mediana)	230 (mediana) (s)	-
		Controles	26-75	5,7 (mediana)	162 (mediana)	240 (mediana) (s)	-
<i>van der Put y cols. (1997)</i>	Postparto	Casos	57-63	12,5 (mediana) (p)	540 (mediana)	245 (mediana) (p)	<b>12,5 (mediana) (p)</b>
		Controles	72-95	14,0 (mediana) (p)	520 (mediana)	255 (mediana) (p)	<b>10,1 (mediana) (p)</b>
<i>Lucock y cols. (1998)</i>	Postparto	Casos	20	9,6 (mediana)	<b>324 (mediana)</b>	419/144 (s)	<b>8,2 (mediana) (p)</b>
		Controles	27	8,9 (mediana)	<b>409 (mediana)</b>	501/201 (s)	<b>6,5 (mediana) (p)</b>
<i>Ubbink y cols. (1999)<sup>f</sup></i>	Postparto	Casos	54	11,2/4,7 (p)	564/186	273/172 (p)	7,2/1,8 (p)
		Controles	54	10,3/4,2 (p)	534/212	307/163 (p)	7,3/1,6 (p)
<i>Afman y cols. (2001)<sup>g</sup></i>	Postparto	Casos	46	-	-	293 (mediana) (p)	12,4 (mediana) (p)
		Controles	73	-	-	293 (mediana) (p)	12,2 (mediana) (p)

tHcy (homocisteína total). Los valores estadísticamente significativos se han destacado en negrita y las casillas correspondientes se han sombreado en gris. S (suero), p (plasma).

<sup>a</sup> Uno de los 6 nacidos con malformaciones era microcéfalo sin defecto del tubo neural.

<sup>b</sup> 5/16 casos alcanzaron valores pico de tHcy a las 6 horas de la sobrecarga de metionina superiores a la media+2 desviaciones estándar con relación al grupo control. No hallaron diferencias en las concentraciones de piridoxal fosfato en sangre total entre casos y controles.

<sup>c</sup> 9/41 casos alcanzaron valores pico de tHcy a las 6 horas de la sobrecarga de metionina superiores a la media+2 desviaciones estándar con relación al grupo control. Las actividades de cistationina β-sintetasa en los fibroblastos cutáneos de estas 9 mujeres fueron normales. No hallaron diferencias en las concentraciones de piridoxal fosfato en sangre total entre casos y controles.

<sup>d</sup> Las concentraciones de ácido metilmalónico sérico fueron significativamente superiores en los casos (130 nM) que en los controles (105 nM).

<sup>e</sup> Se escogieron 76 controles adicionales para escrutar las actividades enzimáticas B<sub>12</sub>-dependientes (homocisteína y ácido metilmalónico) en casos y controles con niveles comparables de B<sub>12</sub> (valores entre paréntesis). No se hallaron diferencias significativas con relación al ácido metilmalónico.

<sup>f</sup> Se aparearon casos y controles por edad y peso. También se escrutaron el piridoxal fosfato en plasma, y se realizó el test de sobrecarga oral de metionina sin hallarse diferencias entre casos y controles.

<sup>g</sup> Se cuantificaron los niveles de holo-transcobalamina II (holo-TC II) y la ratio holo-TC II/TC II total; los valores del cuartil más bajo de estas dos variables se correspondían con unas odds ratio de tener un hijo con DTN de 2,9 (no significativo) y 5,0 (significativo), respectivamente.

hijo con DTN es el resultado de la conjunción entre la ingesta de folatos (o el folato sérico) y la predisposición genética. Como los márgenes de las concentraciones de folato sérico para la población son estrechos, las diferencias entre casos y controles nunca serán muy amplias y serán aún más exiguas si se compara un control con baja predisposición y un caso con alta predisposición, ya que el primero puede tener las concentraciones de folato sérico relativamente bajas y el segundo relativamente altas. La virtud de los suplementos de folato sintético reside en que llevan la folatemia a unas concentraciones suprafisiológicas, de forma que vencen cualquier predisposición genética (hipofunción enzimática) que pudiera haber. Así, una ingesta dietética de 0,2 mg de folatos se traduce en concentraciones de 6 ng/mL, la ingesta de 0,6 mg diarios (0,2 mg de la dieta y 0,4 mg de folatos sintéticos) ocasiona concentraciones de 22 ng/mL y la ingesta de 4,2 mg (0,2 mg de la dieta y 4 mg de suplementos) corresponde a unas concentraciones de 50 ng/mL.

La mayoría de estudios coinciden en atribuir la génesis de los DTNs a un error materno en la remetilación de la homocisteína (Hcy). En esta línea, los grupos de Schorah y Mills observaron niveles de cobalamina significativamente inferiores en casos que en controles, hecho que apunta a una anomalía de la metionina sintetasa (MTR; EC 2.1.1.13), enzima que tiene como cofactor a la cobalamina<sup>55,66</sup>. Kirke y cols. hallaron por medio de una regresión múltiple que sólo en los casos la cobalamina y el folato plasmáticos se correlacionaban de forma independiente con los folatos eritrocitarios ( $r$  múltiple=0,68;  $p < 0,001$ ), es decir, las concentraciones de folato y de B<sub>12</sub> plasmáticos son factores de riesgo independientes de los DTNs, lo cual también sugiere la participación directa o indirecta de la MTR en su etiología<sup>62</sup>. Steegers-Theunissen y cols.<sup>64</sup> objetivaron un mayor porcentaje de casos con la prueba de sobrecarga de metionina alterada (estudia de la transulfuración) (capítulo 12) frente a los controles, pero la actividad de la cistationina  $\beta$ -sintetasa (CBS; EC 4.2.1.22) en fibroblastos cutáneos de estas participantes fue normal, por lo tanto, pensaron que sólo una alteración de la remetilación podía explicar estos resultados. Mills y cols.<sup>66</sup> compararon casos y controles con niveles similares de B<sub>12</sub> para poder escrutar las actividades enzimáticas B<sub>12</sub> dependientes y objetivaron diferencias no significativas para el ácido metilmalónico y concentraciones significativamente superiores de tHcy entre los casos sólo para la mitad inferior de la distribución de valores de B<sub>12</sub>, entonces, los casos con niveles de cobalamina normales-bajos tienen más problemas para metabolizar la Hcy que los controles. Por consiguiente, se apuntó de nuevo a la MTR como responsable de estos resultados. Por último, Afman y cols. establecieron una relación inversamente proporcional entre la fracción de cobalamina activa (holo-transcobalamina II, capítulo 12) y el riesgo de tener un hijo con un DTN, observación que está en consonancia con una alteración de la remetilación, probablemente mediada por una falta de afinidad de la transcobalamina II por la cobalamina, puesto que en casos y controles las concentraciones de B<sub>12</sub> fueron similares<sup>71</sup>.

Consideración aparte nos merecen las investigaciones del grupo de Lucock. Este grupo de científicos ha estudiado la patogenia de los DTNs por medio de la cuantificación de diferentes coenzimas de los folatos en eritrocitos y en sangre total por medio de HPLC (high performance liquid chromatography) en fase reversa según un método puesto a punto por ellos mismos y que permite el escrutinio de 34 coenzimas del folato por el momento<sup>72-3</sup>. Un inconveniente importante de estas determinaciones reside en la labilidad de los coenzimas cuantificados, esto es, su interconversión ex

vivo, lo cual obliga a la centrifugación inmediata de la muestra con el fin de separar el plasma y obtener después el hemolisado. Otra desventaja importante es la laboriosidad de estas técnicas, factor que, suponemos, ha limitado el número de pacientes estudiadas y, por lo tanto, ha disminuido el número de diferencias estadísticamente significativas. Según el grupo de Lucock y, en condiciones normales, los folatos intraeritrocitarios más abundantes son metil y formil-tetrahidrofolatos<sup>69,73</sup> (tabla 10.11). Por otra parte, la mayoría de los estudios miden

**Tabla 10.11.- Distribución de las especies de folatos dentro del eritrocito (en orden decreciente de abundancia) (tomado de M. Lucock y Z. Yates<sup>73</sup>).**

Especies de folatos	Proporción de folatos eritrocitarios totales (%)
N <sup>5</sup> metil-tetrahidrofolato	60,4
Formil-tetrahidrofolato*	26,3
Tetrahidrofolato	6,1
N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> metenil-tetrahidrofolato	4,6
N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> metilén-tetrahidrofolato	2,7

Valores obtenidos a partir de una muestra de 25 individuos.

\* Predominan los penta y los hexaglutamatos.

los folatos mediante ensayos microbiológicos o radioinmunoensayos, y se cree que estos dos métodos cuantifican los mismos folatos, aunque sus fundamentos son distintos. En realidad, aparte de los metilfolatos no se sabe demasiado bien lo que se mide cuando se habla de folatos eritrocitarios, esto es, no se conoce si se valoran ciertos coenzimas de forma preferente. De hecho, se admite una cierta interferencia entre la distribución de los coenzimas intraeritrocitarios y la medición de folatos. Si no fuera así, no ocurriría que en presencia del alelo C677T (ver más adelante) en homocigosis (TT), circunstancia que limita el depósito intracelular de metilfolatos, los niveles fueran más altos medidos por radioinmunoensayo y más bajos medidos por ensayos microbiológicos que en ausencia de esta mutación o en heterocigosis para la misma<sup>74-7</sup>. La presencia del genotipo TT en homocigosis incrementa significativamente la fracción eritrocitaria de formilfolatos con respecto a los genotipos CT y CC<sup>78-9</sup>. Si bien los radioinmunoensayos suelen responder bien a los derivados activos de los folatos, es decir, al tetrahidrofolato (THF) y al metil-THF<sup>80</sup>, la cuantificación de los formilfolatos por HPLC es la que más se correlaciona con la determinación de folato total de los inmunoensayos, posiblemente porque las condiciones analíticas y preanalíticas menos rigurosas de la práctica clínica diaria favorecen la degradación de otros derivados menos estables de los folatos (los formilfolatos son formas de almacenamiento intracelular)<sup>69,73</sup>. Por consiguiente, el interés demostrado por la tHcy como marcador funcional del status de folatos responde a la falta de especificidad de las determinaciones de folatos eritrocitarios<sup>81</sup>. Por último, el THF monoglutamato eritrocitario muestra una buena correlación inversa con la tHcy<sup>69</sup>. La tabla 10.12, tomada de Lucock y cols.<sup>69</sup>, ilustra de forma fehaciente nuestras aseveraciones sobre la discordancia entre los métodos de cuantificación de las reservas de folatos. Entonces, los pares de determinaciones que mejor se correlacionan son:

- Folato eritrocitario medido por RIA y N<sup>5</sup>-formil-THFs totales (relación directa).
- Folato eritrocitario medido por HPLC y metil-THFs totales (relación di-



recta).

- tHcy en plasma y THF monoglutamato eritrocitario (relación inversa).

**Tabla 10.12.- Niveles de folatos eritrocitarios y de homocisteína total en madres de afectados por defectos del tubo neural y sus controles procedentes del estudio de Lucock y cols.<sup>69</sup>.**

Magnitud, método de cuantificación y unidad de medida		Casos (n=20) (media/mediana)	Controles (n=27) (media/mediana)	p
<i>Folato eritrocitario (ng/mL)</i>	<i>RIA</i>	<b>343/324</b>	<b>440/409</b>	<b>0,022</b>
	<i>HPLC</i>	548/453	499/437	0,99
<i>N<sup>5</sup>formiltetrahydrofolatos totales (HPLC) (ng/mL)</i>		138/136	169/134	0,46
<i>Metiltetrahydrofolatos totales (HPLC) (ng/mL)</i>		295/244	241/201	0,71
<i>Tetrahydrofolato monoglutamato (HPLC) (ng/mL)</i>		4,2/4,0	6,6/5,0	0,052
<i>tHcy (HPLC) (μmol/L)</i>		<b>8,4/8,2</b>	<b>7,2/6,5</b>	<b>0,024</b>

n (número de participantes), RIA (radioinmunoensayo), HPLC (high performance liquid chromatography), tHcy (homocisteína total). Los valores estadísticamente significativos se han destacado en negrita.

Los hallazgos de Lucock con respecto a la etiopatogenia de los DTNs se pueden sintetizar en los puntos siguientes:

- El estudio del metabolismo leucocitario de los folatos en casos y controles ha mostrado que el metil-THF (de mono a hexaglutamatos) es utilizado por la MTR en los controles pero no en los casos, en los que se acumula el metil-THF hexaglutamato tras la incubación. Este coenzima constituye el sustrato prioritario de la MTR, por lo tanto, se piensa que hay un defecto de esta enzima que “atrapa” las moléculas de metil-THF hexaglutamato<sup>80</sup>.
- En los controles, las concentraciones de tHcy en suero son inversamente proporcionales a las concentraciones eritrocitarias de THF monoglutamato. En las madres de los DTNs no existe esta correlación, es decir, la tHcy permanece elevada independientemente de los niveles de THF monoglutamato. Ello podría indicar que el sistema MTR/B<sub>12</sub>/MTR reductasa funciona anormalmente y no repone el THF monoglutamato a partir del metil-THF monoglutamato. El THF monoglutamato es útil para producir otros coenzimas de los folatos<sup>69</sup> (capítulo 9).
- La serina hidroximetil transferasa (SHMT; EC 2.1.2.1) se ve inhibida por el N<sup>5</sup>-formil-THF pentaglutamato, coenzima que se acumula si hay depleción de folatos o si la MTR es hipofuncionante. Por lo tanto, en situación de déficit de folatos, la disminución de la acción de la SHMT redundaría en un aumento de la síntesis de purinas a partir del THF monoglutamato, en detrimento de la síntesis del metil-THF monoglutamato<sup>82</sup>. En las madres de los DTNs esta secuencia parece estar alterada, lo cual es compatible con una regulación anormal de la síntesis de purinas (en los controles existe una correlación significativa negativa entre la ratio N<sup>5</sup>-formil-THF pentaglutama-

to/formil-THF total y THF monoglutamato/N<sup>5</sup>-metil-THF monoglutamato, mientras que en los casos no se objetiva)<sup>69</sup>.

- d) Hay una correlación significativa aunque moderada ( $r > 0,4$ ) entre el formil-THF monoglutamato y el THF monoglutamato en las madres de los DTNs y no en los controles, fenómeno que indica una desviación hacia la síntesis de purinas, aunque también puede significar una deficiencia de folatos<sup>69</sup>.
- e) Se compararon casos y controles con respecto a la adición de distintos sustratos exógenos al lisado de sangre total mantenido a 25°C durante 60 minutos. El metenil-THF monoglutamato y el metil-THF monoglutamato exógenos aumentaron el formil-THF y el metilén-THF respectivamente en controles, mientras que en los casos las respuestas fueron inferiores. Estos datos apuntan a una alteración del transporte de carbonos hacia la síntesis de purinas<sup>79</sup>.
- f) Las madres de los DTNs tienen concentraciones eritrocitarias más altas de metenil-THF, de metil-THF y más bajas de N<sup>5</sup>-formil-THF y de THF monoglutamato que sus correspondientes controles. La elevación del metenil-THF constituye el cambio más constante observado en las madres de DTNs portadoras de distintos polimorfismos de genes codificantes de enzimas de la remetilación supuestamente relacionados con estas anomalías. Asimismo, la presencia de estos polimorfismos en controles permite predecir el perfil de coenzimas eritrocitarias de los folatos; ello no ocurre en las madres de DTNs, lo que hace pensar en la existencia de otras mutaciones aún no identificadas que contribuyen a la disemбриogénesis del tubo neural<sup>83</sup>.

En resumen, los hallazgos más recientes apuntan hacia una remetilación alterada. Lucock y cols. sospechan de una síntesis anormal de purinas, y de la existencia de otros polimorfismos de riesgo (aparte de los que revisaremos más adelante en este mismo capítulo) pendientes de dilucidar. Sin embargo, las vías metabólicas del folato son complejas, máxime si pretendemos incorporar de forma armónica los diferentes estados de oxidación del folato y las distintas longitudes de las cadenas de  $\gamma$ -glutamatos. Lamentablemente, aún no entendemos todos los mecanismos que intervienen en la regulación de las distintas reacciones. Además, la labilidad de los coenzimas de los folatos retrasa el progreso de las investigaciones<sup>79</sup>.

Aunque los estudios sobre los DTNs folato-dependientes no nos han brindado resultados enteramente satisfactorios con respecto a la etiopatogenia, al menos han permitido establecer un gradiente de riesgo de tener un hijo con DTN según concentraciones decrecientes de folatos sérico y eritrocitario en gestantes<sup>84</sup>. Transcribimos en la tabla 10.13 las ORs correspondientes al folato eritrocitario por ser más discriminativas. Vemos que el riesgo, aunque muy bajo, sigue estando presente al alcanzar los 570 ng/mL, lo cual apunta hacia un factor genético que actúa sinérgicamente con el status de folatos materno.

De todo lo expuesto anteriormente podemos inferir que los resultados representados en la tabla 10.10 no sólo no tienen aplicación en clínica, sino que tampoco han sido definitivos a la hora de orientarnos sobre la patogenia de los DTNs.

**Tabla 10.13.- Riesgo de tener un hijo con un defecto del tubo neural en función de las concentraciones de folato intraeritrocitario según el estudio de Daly y cols.<sup>84</sup>.**

Folato intraeritrocitario (ng/mL)	Nº (% casos)	Nº (% controles)	Riesgo de DTN por 1000 nacimientos	IC 95%
0-149	11 (13,1)	10 (3,8)	6,6	3,3-11,7
150-199	13 (15,5)	24 (9,0)	3,2	1,7-5,5
200-299	29 (34,5)	75 (28,2)	2,3	1,6-3,3
300-399	20 (23,8)	77 (29,0)	1,6	1-2,4
400-+	11 (13,1)	80 (30,0)	0,8	0,4-1,5
Total	84 (100)	266 (100)	1,9	1,5-2,3

DTN (defecto del tubo neural), IC 95% (intervalo de confianza del 95%).

## 10.4.2 Absorción de folatos

Como el folato sérico está fuertemente correlacionado con su aporte exógeno, la tendencia objetivada hacia su descenso en las madres de los DTNs (tabla 10.10) se atribuye tanto a dietas pobres como a una malabsorción de folatos. En la actualidad, aún se desconocen muchos de los aspectos que modulan la biodisponibilidad de los folatos, pero se piensa que la absorción se ve influida por<sup>85-7</sup>:

- ◆ Las formas de preparación de los alimentos que contienen folatos.
- ◆ Diferencias en la unión a la mucosa de las distintas especies de folatos.
- ◆ Inhibición de la conjugasa del folato (EC 3.4.19.9) o del transporte de las moléculas de folato por sustancias presentes en los alimentos o por el pH del medio.
- ◆ Captación tisular selectiva en función de la repleción de las reservas.

Aunque son varias las investigaciones que han tratado la absorción entre las progenitoras de los DTNs, los diferentes diseños de los estudios, la diversidad de métodos de escrutinio de la absorción y el bajo número de participantes han dificultado la obtención de conclusiones sólidas. Así, Bower y cols. evaluaron la absorción de una comida con 4,5 mg de folato en forma de levadura (poliglutamatos), por medio del incremento del folato sérico en el transcurso de las tres primeras horas post-ingesta. Se establecieron dos grupos de controles, uno formado por madres de hijos sanos reclutadas entre el personal del laboratorio donde se realizó el estudio y otro constituido por amigas de los casos. Los casos tuvieron folatos séricos y eritrocitarios basales, e incrementos de folato sérico postingesta similares al grupo de controles que eran amigas e inferiores al grupo de controles integrado por el personal del laboratorio. Concluyeron que la hidrólisis intestinal de los poliglutamatos no está disminuida en las madres de los DTNs si se las compara con madres controles con similares niveles de folato basales, aunque hay diferencias significativas entre curvas post-ingesta<sup>88</sup>. Dos objeciones restan validez a los resultados de este trabajo, primero la ausencia de un protocolo de saturación con folatos sintéticos previo, puesto que la folatemia sérica fue superior en un grupo de controles que en los casos; y en segundo lugar, que la levadura no es un vehículo adecuado puesto que contiene un inhibidor de la conjugasa del folato. Neuhouser y cols. estudiaron la absorción de 400 µg de folatos no conjugados (suplementos) y 400 µg de folatos conjugados (950 mL de un

preparado con zumo de naranja) en diez madres de DTNs y en ocho madres de hijos sanos. Se midió la respuesta a las dosis de folatos por medio de la cuantificación del área bajo la curva del folato sérico a la primera, segunda y tercera hora postingesta del folato. Si bien los controles tuvieron una mayor respuesta a ambas formas de folato con relación a los casos, la diferencia entre ambos grupos sólo fue estadísticamente significativa para los folatos no conjugados<sup>89</sup>. Los puntos débiles de este estudio son la ausencia de un protocolo de saturación, puesto que los folatos sérico y eritrocitario eran superiores en los controles; y el uso de un volumen importante de zumo de naranja, puesto que los cambios de pH de este alimento hacen variar la biodisponibilidad del folato<sup>90</sup>. Davis y cols. escrutaron diez madres de DTNs y diez controles, tras un protocolo de saturación de folatos, por medio de la excreción de 400 µg de ácido fólico marcado con deuterio en los tres días siguientes. No se hallaron diferencias significativas entre los porcentajes de dosis orales excretadas en casos y controles, aunque éstos fueron ligeramente inferiores en los casos<sup>91</sup>. El último estudio que hemos hallado sobre el particular, es de Boddie y cols.<sup>92</sup> y, al igual que el anterior, cuenta con la ventaja el uso de isótopos estables, método que también permite el escrutinio de la biodisponibilidad de dos coenzimas del folato administradas a la vez, esto es, el pteroilpentaglutamato (marcado con deuterio) y el pteroilmonoglutamato (marcado con <sup>13</sup>C). Las participantes (11 casos y 11 controles) se sometieron a un protocolo de saturación tisular previo y se midió la excreción urinaria del folato en el transcurso de 48 horas. Durante las 24 primeras horas, se detectó una menor eliminación de ambas formas de folatos en los casos, pero estas diferencias desaparecieron al segundo día y al promediar las eliminaciones de los dos días. Sin embargo, la excreción de los pentaglutamatos tendía a ser inferior en los casos que en los controles tras 48 horas (33±13% en los casos frente al 45±26% de los controles; p=0,21). De lo expuesto en este apartado podemos aventurar lo siguiente:

1. La ausencia de diferencias entre los niveles de folatos y la respuesta a la ingesta de pteroilpoliglutamatos entre las madres de los DTNs y sus amigas apunta a la interacción entre una respuesta más deprimida a la ingesta de folatos alimentarios o una dieta más pobre en folatos y un factor genético predisponente a la concepción de un hijo con DTN<sup>88</sup>.
2. Hasta el momento no contamos con evidencias de una disfunción de la conjugasa del folato en las madres de los DTNs<sup>89,92</sup>.
3. La exploración de un mayor número de participantes con métodos isotópicos contribuirá sin duda al esclarecimiento de la patogenia de estas anomalías, ya que es posible que las diferencias halladas entre casos y controles con respecto a la excreción de pentaglutamatos (tendencia a ser menor en los casos) se conviertan en significativas<sup>91-2</sup>.

# 10.5 Base genética de los defectos del tubo neural

## 10.5.1 Fundamentos

Se piensa que las anomalías del tubo neural tienen una base genética como consecuencia de las siguientes circunstancias:

- Los DTNs tienden a agregarse en las familias, aunque no existe un patrón claro de herencia (sección 7.2.5.11).
- La incidencia es variable en los distintos grupos étnicos, esto es, en una sociedad multirracial como la residente en EE.UU., hay más afectados entre hispanos, seguidos de blancos no hispanos, indios, afroamericanos y asiáticos<sup>93-5</sup> (sección 7.2.5.1).
- Aparecen DTNs en modelos animales murinos mutantes<sup>96-8</sup>.

## 10.5.2 Genes candidatos

Al considerar los DTNs como un grupo de anomalías de origen multifactorial (esto es, derivadas de la interacción genético-ambiental), la investigación se ha dirigido hacia la localización de genes de susceptibilidad o predisponentes a la disembriogénesis del tubo neural. La investigación actual se dirige hacia múltiples grupos de ellos que se estudian tanto en humanos como en modelos animales (ver más adelante). Nos centraremos en los que codifican enzimas que participan en el metabolismo del folato.

### 10.5.2.1 Gen de la metilén-tetrahidrofolato reductasa

La N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metilén-THF reductasa (MTHFR; EC 1.7.99.5) cataliza la conversión de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metilén-THF (metilén-THF) a N<sup>5</sup>-metil-THF, cosustrato de la remetilación de Hcy a metionina (capítulo 9).

Goyette y cols. aislaron el ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) de la MTHFR a partir de la secuencia de aminoácidos obtenida de la enzima hepática porcina<sup>99</sup>. El ADNc porcino orientó la búsqueda del correspondiente humano en una genoteca hepática. Se predijo la secuencia de aminoácidos de la MTHFR a partir del ADNc humano. Esta enzima es una proteína homodimérica de 656 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 150 kD. Las proteínas MTHFR humana y murina muestran una homología del 90%<sup>100</sup>. El gen que la codifica se localiza en el cromosoma 1p36.3<sup>99</sup> y tiene una longitud de 1980 pares de bases (pb). Se compone de 11 exones con una longitud que oscila entre 102 y 432 pb, e intrones entre 250 y 1,5 kb,

con la excepción de un intrón con 4,2 kb. Se han identificado tres ácidos ribonucleicos mensajeros de 2,8, 7,2 y 9,8 kb<sup>101</sup>. Los dos primeros están presentes en la mayoría de los tejidos, mientras que el de mayor peso molecular se halla en cerebro, músculo, placenta y estómago<sup>101</sup>.

Como el gen de la MTHFR es polimórfico, tiene varios alelos con frecuencias poblacionales superiores al 1%, que no suelen modificar de forma sustancial el mensaje hereditario<sup>102</sup>. Dos polimorfismos frecuentes son el C677T y el A1298C, y a ambos se les ha relacionado con los DTNs.

### 10.5.2.1.1 Polimorfismo C677T

El alelo C677T es el resultado de una mutación puntual con la consiguiente sustitución de citosina por timina, que crea una diana de restricción reconocida por la endonucleasa HinfI<sup>103</sup> (capítulo 12). El mencionado cambio de nucleótidos ocasiona la sustitución del aminoácido alanina por valina en la posición 222 (A222V)<sup>103</sup>. El producto del alelo C677T es la variante termolábil de la MTHFR, identificada por Kang y cols. en un grupo de individuos sin clínica neurológica (a diferencia de los déficits homocigotos severos de MTHFR, sección 9.2.7.2), pero con cardiopatía isquémica<sup>104</sup>. La actividad cuantificada en extractos linfocitarios a 37°C es del 50-60% de la actividad enzimática normal, de ahí su denominación de termolábil<sup>104</sup>.

Jacques y cols. hallaron niveles más elevados de tHcy basal en homocigotos (TT) que tenían niveles de folato plasmático inferiores a 7,07 ng/mL que en el resto de genotipos, aunque estas diferencias desaparecieron si el folato plasmático superaba la concentración mencionada<sup>105</sup>. La disminución de la formación de metil-THF, secundaria a la hipoactividad enzimática, modifica la distribución de los coenzimas eritrocitarios del folato tal y como se ha comentado previamente (sección 10.4.1).

La prevalencia del alelo C677T es alta en Italia<sup>106</sup> y entre hispanos<sup>107-9</sup>, mientras que es muy inferior entre negros estadounidenses<sup>109-10</sup> y en algunas áreas del África subsahariana<sup>70</sup>. En Europa, la frecuencia de homocigotos para este polimorfismo oscila entre un 8% para Alemania y un 18% para Italia. Al contrario, las Islas Británicas presentan una frecuencia intermedia entre el 11 y el 13%, a pesar de sus altas prevalencias de DTNs documentadas antaño<sup>111</sup>. La alta prevalencia de portadores de este polimorfismo sugiere que esta mutación es ancestral<sup>112</sup> y que confiere una cierta protección contra las dietas escasas en folatos (priorización de la síntesis de purinas y pirimidinas frente a la remetilación)<sup>113</sup> y contra el cáncer de colon<sup>114-5</sup> aun a costa de aumentar el riesgo de DTNs y de otros defectos congénitos.

van der Put y cols. objetivaron unas ORs en la población danesa para la homocigosis (TT) de 3,7 (IC 95% 1,5-9,1) para las madres, 2,2 (IC 95% 0,8-6,3) para los padres y 2,9 (IC 95% 1,0-7,9) para los pacientes frente a los controles<sup>74</sup>. Sin embargo, los mismos autores aportaron unas OR inferiores para madres, padres y pacientes en otro estudio que se publicó años más tarde<sup>116</sup>. Por otra parte, Kirke y cols. estudiaron este polimorfismo en la población irlandesa y la OR del genotipo TT para los afectados de espina bífida fue de 2,6 (IC 95% 1,4-2,8)<sup>117</sup>. Botto y Yang informaron en su metaanálisis de ORs significativas para el genotipo TT frente al wild-type (CC) para afectados estadounidenses y para madres irlandesas<sup>111</sup>. Las ORs agrupadas se-

gún el mencionado metaanálisis se especifican en la tabla 10.14.

**Tabla 10.14.- Odds ratios para los afectados por defectos del tubo neural y sus progenitores según la presencia del alelo C677T (modificado de L. D. Botto y Q. Yang<sup>111</sup>).**

Grupo	TT frente a CC		Fracción atribuible (%)
	OR	IC 95%	
<i>Afectados</i>	<b>1,75</b>	<b>1,41-2,18</b>	7,4%
<i>Madres</i>	<b>2,04</b>	<b>1,49-2,81</b>	8,1%
<i>Padres</i>	1,18	0,65-2,12	1,4%

IC 95% (intervalo de confianza del 95%).

Los valores estadísticamente significativos se han destacado en negrita.

Por último, parece que existe sinergia entre la presencia de este alelo en homocigosis y la depleción de folatos, ocasionando esta última circunstancia un aumento importante de la OR de ser madre de un DTN o de padecerlo. Como ejemplo exponemos los resultados del estudio de Christensen y cols. en la tabla 10.15<sup>118</sup>.

**Tabla 10.15.- Odds ratios de ser portador de un defecto del tubo neural o de ser madre de un hijo con esta anomalía para el cuartil inferior de folato eritrocitario combinado o no con la homocigosis para el alelo C677T (TT) (tomado de B. Christensen y cols.<sup>118</sup>).**

	Afectado por DTN	Madre de DTN
<i>Cuartil inferior de folato eritrocitario frente al superior</i>	2,56 (IC 95% 1,28-5,13)	3,05 (IC 95% 1,54-6,03)
<i>Cuartil inferior de folato eritrocitario + TT</i>	13,43 (IC 95% 2,49-72,33)	3,28 (IC 95% 0,84-12,85)

IC 95% (intervalo de confianza del 95%).

### 10.5.2.1.2 Polimorfismo A1298C

En 1998 se comunicó la existencia del polimorfismo A1298C, que resulta en la sustitución de un residuo de glutamato por otro de alanina (E429A)<sup>116,119</sup>. Este polimorfismo suprime una diana de restricción para la endonucleasa MboII<sup>116</sup>. Los individuos homocigotos para este alelo tienen una actividad enzimática de aproximadamente el 60% de los controles en extractos linfocitarios, mientras que su prevalencia parece ser del 10% en las poblaciones holandesa<sup>116</sup> y canadiense<sup>119</sup>.

A diferencia del polimorfismo C677T, la presencia de la mutación A1298C en homo o heterocigosis ni se asocia con unos niveles superiores de tHcy ni con niveles inferiores de folatos en sangre<sup>116</sup>. Al contrario, la heterocigosidad combinada para ambos alelos (C677T y A1298C) se asocia con una actividad enzimática del 50%-60% de los controles, aumento de los niveles de tHcy y disminución de los niveles de folatos, al igual que la presencia del alelo mutante C677T en homocigosis<sup>116</sup>. Sin embargo, estas repercusiones sobre el status de folatos tienden a desaparecer con la fortificación de los alimentos en EE.UU., lo que posiblemente se traduzca en la minimización de la influencia ambiental sobre el genotipo<sup>109</sup>.

Hay controversia sobre si utilizar la denominación alélica A1298C o A1289C, puesto que la primera respeta la numeración de los nucleótidos vigente al identificar la mutación C677T, y la segunda utiliza la ubicación nucleotídica real. En esta misma línea, el alelo C677T está en la posición 665 del la región codificante (exón 7)<sup>120-1</sup>.

La distribución de la heterocigosidad combinada C677T/A1298C en EE.UU. entre los distintos grupos étnicos sigue un patrón similar a la del alelo C677T aislado<sup>109</sup>.

En el estudio de van der Put y cols. se apreció la combinación C677T/A1298C en el 28% de los DTNs en comparación con el 20% de controles, lo que resultó en una OR de 2,04 (IC 95% 0,9-4,7)<sup>116</sup>. Aunque se dispone de pocos estudios sobre la mutación A1298C aislada no parece probable que ésta constituya un riesgo importante de espina bífida<sup>116,122</sup>.

### **10.5.2.2 Gen de la metionina sintetasa**

La MTR o N<sup>5</sup>-metil-THF-Hcy-S-metiltransferasa es una enzima citosólica que cataliza la remetilación de la Hcy a metionina (capítulo 9). Los grupos de Leclerc<sup>123</sup> y Chen<sup>124</sup> identificaron el polimorfismo A2756G del gen codificante de esta enzima, que determina la sustitución de un residuo de aspartato por otro de glicina, en el locus 1q43. Se ha estudiado este polimorfismo en un grupo de 56 pacientes con espina bífida y 62 madres de pacientes (casos) frente a 97 niños sanos y 90 madres (controles). Ninguno de los casos y sólo el 10% de los controles fueron homocigotos para esta mutación, por lo tanto, la OR fue inferior a uno<sup>118</sup>.



### 10.5.2.3 Gen de la metionina sintetasa reductasa

En el complejo monovalente MTR-cobalamina (MTR-Co(I)), la cobalamina está en condiciones de aceptar el metilo que va a ser transferido a la Hcy para su conversión en metionina. A veces, la cobalamina monovalente se oxida a Co(II), lo cual inactiva el complejo que constituye con la MTR. La restitución de la Co(I) activa a partir de la Co(II) corre a cargo de la enzima MTR reductasa (MTRR; EC 2.1.1.135) (capítulo 9)<sup>125-6</sup>. Leclerc y cols. localizaron su gen codificador en el locus 5p15.3-p15.2<sup>127</sup> e identificaron el polimorfismo A66G, o sustitución de adenina por guanina que, a su vez, determina el cambio del residuo 22 de isoleucina por metionina (I22M). Wilson y cols. escrutaron la asociación de este polimorfismo con la espina bífida<sup>128</sup>. Según este grupo de investigadores, la prevalencia de este alelo en la población canadiense es del 51% e incrementa el riesgo de DTN si coexiste con la mutación C677T o si hay déficit de cobalamina. El escrutinio de 56 pacientes con espina bífida y 58 madres de pacientes frente a 87 niños y madres controles resultó en una OR de padecer espina bífida de 2,5 (IC 95% 0,6-9,7) y de ser madre de un hijo afectado de 4,8 (IC 95% 1,5-15,8) sólo si los niveles de cobalamina eran bajos. En presencia de homocigosis combinada para los alelos C677T y A66G la OR para los enfermos de espina bífida fue de 4,1 (IC 95% 1,0-16,4) y de 2,9 (IC 95% 0,6-14,8) para las madres.

Doolin y cols., de la Universidad de Pennsylvania (Filadelfia), diseñaron un estudio cuyo objetivo principal era esclarecer la relación de los polimorfismos A2756G de la MTR y el A66G de la MTRR con el riesgo de espina bífida y determinar si dicha influencia se ejercía a causa del genotipo materno o del filial. El método elegido fue el “transmission disequilibrium test” de dos pasos, es decir, utilizaron los genotipos de dos tipos de tríos: niño con espina bífida-padres, madre del niño enfermo-abuelos maternos del niño enfermo. La OR de tener un hijo con espina bífida era de 2,2 (IC 95% 0,9-5,1) si la madre era portadora de un alelo A2756G y de 6,6 (IC 95% 0,9-49,7) si lo era de dos. Para el polimorfismo A66G las cifras fueron 2,1 (IC 95% 1,1-4,0) para un alelo y 3,2 (IC 95% 0,9-10,9) para los dos. Al contrario, los valores de las ORs no fueron significativos para los afectados de espina bífida. Estos resultados indican que el mayor riesgo reside en el genotipo materno<sup>129</sup>.

### 10.5.2.4 Gen de la metilén-tetrahidrofolato deshidrogenasa/metilén-tetrahidrofolato ciclohidrolasa/formil-tetrahidrofolato sintetasa

Las enzimas N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metilén-THF deshidrogenasa (EC 1.5.1.5), N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metenil-THF ciclohidrolasa (EC 3.5.4.9) y la N<sup>10</sup>-formil-THF sintetasa (EC 6.3.4.3) catalizan tres reacciones secuenciales que interconvierten entre sí a tres derivados oxidados del THF que, a su vez, son los sustratos para la síntesis de metionina, timidilato y purinas (figura 9.7). En las células eucariotas dicha catálisis es asumida por una proteína trifuncional, es decir, un homodímero de aproximadamente 100 kD<sup>130</sup>. El ser portadora del polimorfismo R653Q (sustitución del aminoácido arginina por

glutamina en la posición 653) en homocigosis parece estar asociado con un mayor riesgo de tener un hijo con DTN en la población irlandesa (OR=1,52, IC 95% 1,16-1,99), según un estudio de Brody y cols.<sup>131</sup>.

### 10.5.2.5 Gen de la cistationina $\beta$ -sintetasa

La CBS es una enzima piridoxal-dependiente que cataliza la transformación de la cistationina en cisteína (capítulo 9). La causa más frecuente de homocistinuria en pacientes de origen celta reside en la transición G-A en el gen de la CBS que ocasiona la sustitución de glicina por serina en el residuo 307 de la proteína (G307S)<sup>132</sup>. Por otra parte, la mutación T833C en el exón 8 que causa la sustitución de isoleucina por treonina en el codón 278 (I278T) se puede asociar a una inserción de 68 pb en el mismo exón (Ins 68 pb/I278T)<sup>133</sup> y constituye una variación muy frecuente<sup>134</sup>. Esta última da lugar a una forma muy leve de homocistinuria que responde a la vitamina B<sub>6</sub><sup>133</sup>. Disponemos de un estudio en población irlandesa que escrutó el alelo G307S en 83 casos de DTNs y 79 madres de afectados sin hallar frecuencias del mismo superiores a las esperadas para la población normal. Tampoco las proporciones de portadores de Ins 68 pb/I278T entre 130 casos (madres y afectados por DTNs) y 442 controles difirieron significativamente (18,1% frente a 18,8%)<sup>135</sup>.

### 10.5.2.6 Gen de la serina hidroximetiltransferasa

La SHMT (figura 9.9) cataliza la interconversión entre serina-THF y glicina-N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metilén-THF. Se conocen dos isoformas, la citosólica (SHMT1) y la mitocondrial (SHMT2). Los genes que codifican ambos isoenzimas se ubican en los loci 17p11.2 y 12q13 respectivamente<sup>136</sup>.

Se han escrutado la mutación C1240T de la SHMT1 y la delección de cuatro pb de la SHMT2 (delTCTT 1721-1724) en la población holandesa sin poderse establecer asociación alguna entre estos polimorfismos y el riesgo de padecer un DTN o de tener un hijo con esta enfermedad<sup>137</sup>.

### 10.5.2.7 Conclusiones

Papapetrou y cols. señalaron que la discordancia hallada en la literatura sobre el vínculo entre la mutación C677T y los DTNs (el más investigado) se puede deber a la estratificación poblacional, es decir, que los casos y los controles se hayan seleccionado de poblaciones con diferentes frecuencias alélicas basales<sup>138</sup>. En esta misma línea se pronuncian Botto y Yang que reconocen que bastantes estudios sobre polimorfismos han reclutado a sus participantes por conveniencia y no lo han hecho sobre una base poblacional<sup>111</sup>. La alternativa a la confusión creada reside en investigar más y mejor, esto es, diseñar mejor las investigaciones y en utilizar estudios de casos y controles incidentes de base poblacional o el “transmission disequilibrium test”<sup>139</sup>.

Esta última prueba se basa en la posibilidad desigual de transmisión de diferentes alelos marcadores de los padres a su hijo enfermo. Tiene gran capacidad para identificar los genes con efectos leves-moderados sobre la incidencia de una enfermedad concreta y cuenta con las ventajas de que controla la estratificación poblacional ya que utiliza tríos constituidos por los padres y el hijo enfermo. Hemos localizado tres investigaciones que utilizan esta prueba:

1. La investigación de Doolin y cols. que se ha expuesto en la sección 10.5.2.3<sup>129</sup>.
2. El trabajo de Morrison y cols.<sup>140</sup> que usó también esta prueba para escrutar la asociación de cinco genes candidatos en poblaciones danesa y británica, a saber:
  - MTHFR: C677T.
  - MTR: C5049A y A2756G.
  - CBS: Ins 68 pb/I278T y T2199C.
  - T (gen notocordal que tiene una función clave en el desarrollo axial posterior): TIVS7C y A530G.
  - BRCA1 (la ablación del gen o mutación null homocigota en modelos murinos suele resultar en DTNs): A4956G y A1186G.

Sus resultados no permitieron establecer ninguna asociación para los alelos mencionados correspondientes a la MTHFR, MTR, CBS o BRCA1. Al contrario, se halló una prevalencia significativamente superior del alelo TIVS7C entre los afectados de espina bífida/encefalocele (OR=2,39, IC 95% 1,02-5,61), aunque no entre sus madres.

3. El estudio de Shields y cols.<sup>141</sup> se realizó partir de 271 casos de DTNs y de 218 familias irlandesas. Sus resultados concluyen que la OR del genotipo TT para los DTNs es de 1,61 (IC 95% 1,06-2,45) y para sus madres es de 0,95 (IC 95% 0,60-1,50). En definitiva el incremento de riesgo es sólo marginal y probablemente irrelevante en ausencia de un ambiente desfavorable. Quizás esto último explique el porqué en zonas con alta prevalencia del genotipo TT (p.ej. Italia)<sup>106</sup> haya una frecuencia baja de DTNs (capítulo 7).

En definitiva, los métodos más novedosos de escrutinio de asociación entre marcadores poblacionales y DTNs nos aportan resultados más conservadores, si cabe, que los basados en estudios de casos y controles.

## **10.6 La experimentación animal aplicada a los defectos del tubo neural**

Los modelos animales han permitido tanto el estudio in situ de la embriogénesis del tubo neural como el escrutinio de los genes implicados en su desarrollo y en el metabolismo del folato.

Los distintos puntos de cierre del tubo neural (capítulo 4) posiblemente obedezcan a un control de genes sencillos expresados específicamente en la etapa embrionaria (modelo monogénico) influido según el caso por distintos factores ambientales, lo que nos permite seguir con la etiología multifactorial de estas anomalías.

Nos interesa que el modelo animal de DTNs escogido sea lo más próximo posible a los humanos, esto es, que no sea sindrómico, que su base genética posea cierta complejidad, que su penetrancia sea incompleta y que responda a suplementos nutricionales<sup>142</sup>.

El animal más frecuentemente utilizado es el ratón a causa de ventajas de índole económica y de rendimiento reproductivo<sup>143</sup>, así como por la similitud entre el genoma y la neurulación de los ratones y de los humanos<sup>144-6</sup>. Los modelos murinos existentes son abundantes y su número crece día a día. Se caracterizan por tener mutaciones espontáneas o inducidas (ratones transgénicos que han incorporado de forma estable un gen externo y ratones knockout que portan dos alelos inactivados de un gen recesivo concreto). Por consiguiente, es posible que la homología entre los genes humanos y murinos facilite el establecimiento de una correspondencia genética entre estos modelos animales y las familias con DTNs recurrentes<sup>144-6</sup>.

Como la experimentación animal en el campo de los DTNs es un tema extenso y fuera del objeto de esta tesis, nos permitimos recomendar dos revisiones de Copp y cols.<sup>144</sup> y de Juriloff y Harris<sup>142</sup>. Aun con todo, nos detendremos en algunos aspectos que han sido fuente de hipótesis patogénicas de la folato-sensibilidad de los DTNs.

## **10.6.1 Indicios sobre la embriotoxicidad de la homocisteína**

El grupo de Rosenquist aportó en 1996 indicios a favor de la teratogenicidad directa de la Hcy, en ausencia de depleción de folatos<sup>147</sup>. Trataron embriones de ave con D,L-Hcy o con tiolactona de L-Hcy. El 27% de los embriones tratados con 50  $\mu$ L de la dosis teratogénica (D,L-Hcy 200mM o tiolactona de L-Hcy 100 mM) desarrollaron DTNs. Esta dosis incrementó la concentración de tHcy sérica a 150  $\mu$ mol/L, mientras que la ulterior administración de suplementos con folatos mantuvo los niveles de tHcy a 45  $\mu$ mol/L y evitó los efectos teratogénicos. En este mismo trabajo la Hcy produjo también cardiopatías septales y celosomías. Como la hiperhomocisteinemia no originó necrosis celular, sino un aumento de células con disposición anárquica, los autores concluyeron que los defectos causados por la Hcy no se debían a necrosis sino a otro mecanismo más sutil. Más tarde, este mismo grupo de investigadores propuso la inhibición competitiva del receptor del N-metil-D-aspartato (NMDA) por parte de la Hcy, como responsable de los hallazgos antedichos. Este receptor es un regulador clave de la migración neuronal, la adhesión intercelular, el paso de calcio hacia el interior de la célula, la apoptosis y, además, se comporta como un factor de crecimiento durante el desarrollo neuronal. Los resultados de la administración de agonistas del receptor del NMDA (principalmente la glicina) a embriones de ave postratamiento con dosis tóxicas de Hcy resultó en una prevención del 50% de las anomalías<sup>148</sup>.

Sin desmerecer los resultados de estos experimentos, los incrementos de tHcy plasmática documentados previamente (tabla 10.10) no se corresponden, ni mucho menos, con los valores séricos causados por las dosis teratogénicas. Además, la mayoría de DTNs folato-sensibles no se asocian ni a cardiopatías ni a celosomías de modo habitual. Por otra parte, la prevención sólo parcial de las lesiones con glicina indica que tiene que haber otro mecanismo distinto a la inhibición del receptor del NMDA.

## **10.6.2 Rol de los genes del metabolismo del folato y la homocisteína en los modelos animales**

Los ratones homocigotos CBS-null son morfológicamente normales al nacer<sup>149</sup> y no se dispone de datos sobre homocigotos MTHFR-null, MTR-null, MTRR-null o dihidrofolato reductasa-null.

Los ligandos proteicos de los folatos (FR $\alpha$ , FR $\beta$ , FR $\gamma$  y FR' $\gamma$  en humanos y Folbp1, Folbp2 en ratones) (sección 9.2.2) se han estudiado en ambas especies, sin embargo sólo se ha podido vincular a los ratones homocigotos Folbp1-null con los DTNs (fallecen al décimo día de la gestación con tubos neurales abiertos)<sup>150-1</sup>.

Se han identificado DTNs folato-sensibles en tres modelos mutantes murinos: crooked tail (Cd)<sup>152</sup>, splotch (Sp o Pax3)<sup>153</sup> y homoproteína 1 cartilaginosa (Cart1)<sup>154</sup>. Aunque el metabolismo del ácido fólico en los ratones Cd y Sp no se ha dilucidado, se sabe que en los mutantes Pax3 hay un déficit de folatos disponibles para la síntesis de pirimidinas<sup>153</sup>.

La elevación de los pliegues neurales durante la neurulación primaria se ve favorecida por la metionina<sup>155</sup>, la metilación de novo del ADN (el gen Dnmt3 es responsable de la metilación de novo del ADN y su ausencia (null) causa exencefalia)<sup>156</sup> y de las proteínas contráctiles celulares (dan morfología columnar a las células neuroepiteliales)<sup>157</sup>. Estos hallazgos han favorecido la investigación de los DTNs desde la perspectiva de la metilación proteica y de los ácidos nucleicos<sup>158-9</sup>.

## **10.6.3 Repercusión de la experimentación animal en el conocimiento de los defectos humanos del tubo neural**

Hasta la fecha, se han escrutado pocas correspondencias entre los loci implicados en los DTNs animales y en los humanos. Hemos visto en este capítulo que la mutación BRCA 1, asociada a los DTNs murinos, no aparece como factor de riesgo de DTNs en humanos<sup>140</sup>. Sin embargo y, a pesar de las similitudes genómicas entre humanos y animales, tampoco hay que esperar que todos los genes que controlan la neurulación murina tengan un equivalente humano. Para explorar esta posibilidad de forma exhaustiva habrá que aislar y clonar los genes murinos y después ver si hay

secuencias humanas homólogas, y si éstas existen, establecer qué mutaciones pueden aumentar el riesgo individual de padecer un DTN o de concebir un hijo con esta enfermedad<sup>144</sup>.

## 10.7 Bibliografía

1. Thiersch JB. Therapeutic abortions with a folic acid antagonist 4-amino-pteroylglutamic acid administered by the oral route. *Am J Obstet Gynecol* 1952;63:1298-1304.
2. Goetsch C. An evaluation of aminopterin as an abortifacient. *Am J Obstet Gynecol* 1962;83:1474.
3. Warkany J, Beaudry PH, Hornstein S. Attempted abortion with aminopterin (4-aminopteroylglutamic acid). Malformations of the child. *Am J Dis Child* 1959;97:274.
4. Milunsky A, Graef JW, Gaynor MF Jr. Methotrexate-induced congenital malformations. *J Pediatr* 1968;72:790-5.
5. Hibbard ED, Smithells RW. Folic acid metabolism and human embriopathy [carta]. *Lancet* 1965;1:1254.
6. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 1976;51:944-50.
7. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ, Seller MJ, Nevin NC, Harris R, Read AP, Fielding DW. Possible prevention of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Lancet* 1980;1:339-40.
8. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ, Seller MJ, Nevin NC, Harris R, y cols. Apparent prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Arch Dis Child* 1981;56:911-8.
9. Smithells RW, Nevin NC, Seller MJ, Sheppard S, Harris R, Read AP, y cols. Further experience of vitamin supplementation for prevention of neural tube defect recurrences. *Lancet* 1983;1:1027-31.
10. Smithells RW, Sheppard S, Wild J, Schorah CJ. Prevention of neural tube defect recurrences in Yorkshire: final report. *Lancet* 1989;2:498-9.
11. Nevin NC, Seller MJ. Prevention of neural tube defects recurrences. *Lancet* 1990;1:178-9.
12. Hibbard BM. The role of folic acid in pregnancy with particular reference to anaemia, abruption and abortion. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1964;71:529-42.
13. Little L, Elwood JM. Epidemiology of neural tube defects. En: Kiley M, editor. *Reproductive and Perinatal Epidemiology*. Boston: CREC Press; 1991. p. 251-336.
14. Winship KA, Cahal DA, Weber JCP, Griffin JP. Maternal drug histories and central nervous system anomalies. *Arch Dis Child* 1984;59:1052-60.
15. Mulinare J, Cordero JF, Erickson JD, Berry RJ. Periconceptional use of multivitamins and the occurrence of neural tube defects. *JAMA* 1988;260:3141-5.
16. Bower C, Stanley FJ. Dietary folate as a risk factor for neural-tube defects: evidence from a case-control study in Western Australia. *Med J Aust* 1989;150:613-9.
17. Mills JL, Rhoads GG, Simpson JL, Cunningham GC, Conley MR, Lassman MR, y cols. The absence of a relation between the periconceptional use of vitamins and neural tube defects. National Institute of Child Health and Human Development Neural Tube Defects Study Group. *N Engl J Med* 1989;321:430-5.
18. Milunsky A, Jick H, Jick SS, Bruell CL, MacLaughlin DS, Rothman KJ, Willett W. Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *JAMA* 1989;262:2847-52.
19. Martínez-Frías ML, Rodríguez-Pinilla E. Folic acid supplementation and neural tube defects. *Lancet* 1992;340:620.
20. Werler MM, Shapiro S, Mitchell AA. Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. *JAMA* 1993;269:1257-61.
21. Shaw GM, Schaffer D, Velie EM, Morland K, Harris JA. Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiology* 1995;6:219-26.
22. Laurence KM, James N, Miller MH, Tennant GB, Campbell H. Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural tube defects. *Br J Med (Clin Res Ed.)* 1981;282:1509-11.
23. Wald NJ. Folic acid and neural tube defects: the current evidence and implications for prevention. *Ciba Found Symp* 1994;181:192-211.
24. Tolarova M. Periconceptional supplementation with vitamins and folic acid to prevent recurrence of cleft lip. *Lancet* 1982;2:217.
25. Hernández-Díaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Neural tube defects in relation to use of folic acid antagonists during pregnancy. *Am J Epidemiol* 2001;153:961-8.
26. Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, y cols. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. *N Engl J Med* 1999;341:1485-90.
27. MRC Vitamin Study Group. Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991;338:131-7.
28. Kirke PN, Daly LE, Elwood JH. The Irish Vitamin Study Group. A randomised trial of low dose folic acid to prevent neural tube defects. *Arch Dis Child* 1992;67:1442-6.
29. Czeizel AE, Dudás I, Metneki J. Pregnancy outcomes in randomised controlled trial of periconceptional multivitamin supplementation. Final report. *Arch Gynecol Obstet* 1994;255:131-9.
30. Vergel RG, Sanchez LR, Heredero BL, Rodríguez PL, Martínez AJ. Primary prevention of neural tube defects with folic acid supplementation: Cuban experience. *Prenat Diagn* 1990;10:149-52.
31. Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992;327:1832-5.
32. Hook EB, Czeizel EB. Can terathanasia explain the protective effect of folic-acid supplementation on birth defects? *Lancet* 1997;350:513-5.
33. Czeizel AE, Metneki J, Dudás I. The higher rate of multiple births after periconceptional multivitamin supplementation:

- an analysis of causes. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* 1994;43:175-84.
34. Warkany J. Terathanasia. *Teratology* 1978;17:187-92.
  35. Windham GC, Shaw GM, Todoroff K, Swan SH. Miscarriage and use of multi-vitamins or folic acid. *Am J Med Genet* 2000;90:261-2.
  36. Lumley J, Watson L, Watson M, Bower C. Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects (Cochrane Review). En: *The Cochrane Library*, Volumen 4, 2002. Oxford: Update Software.
  37. Gindler J, Li Z, Berry J, Zheng J, Correa A, Sun X, y cols. Folic acid supplements during pregnancy and risk of miscarriage. *Lancet* 2001;358:796-800.
  38. Ray JG, Laskin CA. Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: a systematic review. *Placenta* 1999;20:519-29.
  39. Nelen WLDM, Blom HJ, Steegers EAP, den Heijer M, Eskes TKAB. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2000;74:1196-9.
  40. George L, Mills JL, Johansson AL, Nordmark A, Olander B, Granath F, Cnattingius S. Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. *JAMA* 2002;288:1867-73.
  41. Mathews F, Murphy M, Wald NJ, Hackshaw A. Twinning and folic acid use. *Lancet* 1999;353:291-2.
  42. Li Z, Gindler J, Wang H, Berry RJ, Li S, Correa A, y cols. Folic acid supplements during early pregnancy and likelihood of multiple births: a population based cohort study. *Lancet* 2003;361:380-4.
  43. Lumley J, Watson L, Watson M, Bower C. Modelling the potential impact of population-wide periconceptional folate/multivitamin supplementation on multiple births. *Br J Obstet Gynaecol* 2001;108:937-42.
  44. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *MMWR* 1992;41 (RR-14):1233-8.
  45. Dickinson CJ. No reliable evidence that folate is harmful in B12 deficiency [carta]. *BMJ* 1995;311:949.
  46. Rothenberg SP. Increasing the dietary intake of folate: pros and cons. *Semin Hematol* 1999;36:65-74.
  47. Hansen Pruss OC. Relapse of patients with pernicious anemia receiving folic acid. *Am J Med Sci* 1947;214:465-8.
  48. Ross JF, Belding H, Paegel BL. The development and progression of subacute combined degeneration of the spinal cord in patients with pernicious anemia treated with syntethic pteroylglutamic (folic) acid. *Blood* 1948;3:86-90.
  49. Yetley EA, Rader JI. The challenge of regulating health claims and food fortification. *J Nutr* 1996;126:675S-72S.
  50. Oakley GP. Let's increase folic acid fortification and include vitamin B12. *Clin Nutr* 1997;65:1889-90.
  51. Hiilesmaa VK, Teramo K, Granstrom ML, Bardy AH. Serum folate concentrations during pregnancy in women with epilepsy: relation to antiepileptic drug concentrations, number of seizures, and fetal outcome. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;287:577-9.
  52. Ch'ien LT, Krumdieck CL, Scott CW Jr, Butterworth CE Jr. Harmful effect of megadoses of vitamins: electroencephalogram abnormalities and seizures induced by intravenous folate in drug-treated epileptics. *Am J Clin Nutr* 1975;28:51-8.
  53. Emery AE, Timson J, Watson-Williams EJ. Pathogenesis of spina bifida. *Lancet* 1969;2:909-10.
  54. Hall MH. Foliates and the fetus [carta]. *Lancet* 1977;1:648-9.
  55. Schorah CJ, Smithells RW, Scott J. Vitamin B12 and anencephaly. *Lancet* 1980;i:880.
  56. Laurence KM, James N, Miller MH, Tennant GB, Campbell H. Increased risk of recurrence of pregnancies complicated by fetal neural tube defects in mothers receiving poor diets, and possible benefit of dietary counselling. *Br Med J* 1980;281:1592-4.
  57. Molloy AM, Kirke P, Hillary I, Weir DG, Scott JM. Maternal serum folate and vitamin B<sub>12</sub> concentrations in pregnancies associated with neural tube defects. *Arch Dis Child* 1985;60:660-5.
  58. Yates JR, Ferguson-Smith MA, Shenkin A, Guzmán-Rodríguez R, White M, Clark BJ. Is disordered folate metabolism the basis for the genetic predisposition to neural tube defects? *Clin Genet* 1987;31:279-87.
  59. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJ, Eskes TK. Neural tube defects and derangement of homocysteine metabolism. *N Engl J Med* 1991;324:199-200.
  60. Economides DL, Ferguson J, Mackenzie IZ, Darley J, Ware II, Holmes-Siedle M. Folate and vitamin B12 concentrations in maternal and fetal blood, and amniotic fluid in second trimester pregnancies complicated by neural tube defects. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99:23-5.
  61. Mills JL, Tuomilehto J, Yu KF, Colman N, Blaner WS, Koskela P, Rundle WE, Forman M, Toivanen L, Rhoads GG. Maternal vitamin levels during pregnancies producing infants with neural tube defects. *J Pediatr* 1992;120:863-71.
  62. Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DG, Scott JM. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Q J Med* 1993;86:703-8.
  63. Wild J, Schorah CJ, Sheldon TA, Smithells RW. Investigation of factors influencing folate status in women who have had a neural tube defect-affected infant. *Br J Obstet Gynaecol* 1993;100:546-9.
  64. Steegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Trijbels FJM, Finkesltein JD, Blom HJ, Thomas CMG, y cols. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects?. *Metabolism* 1994;43:1475-80.
  65. Adams MJ Jr, Khoury MJ, Scanlon KS, Stevenson RE, Knight GJ, Haddow JE, y cols. Elevated midtrimester serum methylmalonic acid levels as a risk factor for neural tube defects. *Teratology* 1995;51:311-7.
  66. Mills JL, Mc Partlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, Scott JM. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 1995;345:149-51.
  67. Wald NJ, Hackshaw AK, Stone R, Sourial NA. Blood folic acid and vitamin B<sub>12</sub> in relation to neural tube defects. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:319-24.
  68. van der Put NM, Thomas CM, Eskes TK, Trijbels FJ, Steegers-Theunissen RP, Mariman EC y cols. Altered folate and vitamin B12 metabolism in families with spina bifida offspring. *QJM*. 1997;90:505-10.
  69. Luccock MD, Daskalakis I, Lumb CH, Schorah CJ, Levene MI. Impaired regeneration of monoglutamyl tetrahydrofolate leads to cellular folate depletion in mothers affected by a spina bifida pregnancy. *Mol Genet Metabol* 1998;65:18-30.
  70. Ubbink JB, Christianson A, Bester MJ, Van Allen MI, Venter PA, Delport R, y cols. 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* 1999;48:269-74.
  71. Afman LA, Van Der Put NM, Thomas CM, Trijbels JM, Blom HJ. Reduced vitamin B12 binding by transcobalamin II increases the risk of neural tube defects. *QJM* 2001;94:159-66.
  72. Lucock MD, Green M, Priestnall M, Daskalakis I, Levene MI, Hartley R. Optimisation of chromatographic conditions for the determination of folates in foods and biological tissues for nutritional and clinical work. *Food Chem* 1995;53:329-38.

73. Lucock M, Yates Z. Measurement of red blood cell methylfolate [carta]. *Lancet* 2002;360:1021-2.
74. van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van den Heuvel LP, y cols. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995;346:1070-1071.
75. Molloy AM, Daly S, Mills JL, Kirke PN, Whitehead AS, Ramsbottom D, y cols. Thermolabile variant of 5-10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: Implications for folate intake recommendations. *Lancet* 1997;349:1591-3.
76. Molloy AM, Mills JL, Kirke PN, Ramsbottom D, McPartlin JM, Burke H, y cols. Low blood folates in NTD pregnancies are only partly explained by thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase: Low folate status alone may be the critical factor. *Am J Med Genet* 1998;78:155-9.
77. Molloy AM, Mills JL, Kirke PN, Whitehead AS, Weir DG, Scott JM. Whole-blood folate values in subjects with different methylenetetrahydrofolate reductase genotypes: differences between the radioassay and microbiological assays [carta]. *Clin Chem* 1998;44:186-8.
78. Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13217-20.
79. Lucock M, Daskalakis I, Briggs D, Yates Z, Levene M. Altered folate metabolism and disposition in mothers affected by a spina bifida pregnancy: Influence of 677 c→t methylenetetrahydrofolate reductase and 2756a→g methionine synthase genotypes. *Mol Genet Metabol* 2000;70:27-44.
80. Lucock MD, Wild J, Lumb CH, Oliver M, Kendall R, Daskalakis I, y cols. Risk of neural tube defect-affected pregnancy is associated with a block in maternal one-carbon metabolism at the level of N-5-methyltetrahydrofolate:homocysteine methyltransferase. *Biochem Mol Med* 1997;61:28-40.
81. Lucock M, Daskalakis I. New perspectives on folate status: a differential role for the vitamin in cardiovascular disease, birth defects and other conditions. *Br J Biomed Sci* 2000;57:254-60.
82. Herbig K, Chiang EP, Lee LR, Hills J, Shane B, Stover PJ. Cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase mediates competition between folate-dependent deoxyribonucleotide and S-adenosylmethionine biosyntheses. *J Biol Chem* 2002;41:38381-9.
83. Lucock M, Daskalakis I, Hinkins M, Yates Z. An examination of polymorphic genes and folate metabolism in mothers affected by a spina bifida pregnancy. *Mol Genet Metabol* 2001;73:322-32.
84. Daly LE, Kirke PN, Molloy A, Weir DG, Scott JM. Folate levels and neural tube defects. *JAMA* 1995;274:1698-702.
85. Molloy AM. Is impaired folate absorption a factor in neural tube defects? [editorial]. *Am J Clin Nutr* 2000;72:3-4.
86. Gregory JF III. Case study: Folate bioavailability. *J Nutr* 2001;131:1376S-82S.
87. McKillop DJ, Pentieva K, Daly D, McPartlin JM, Hughes J, Strain JJ, y cols. The effect of different cooking methods on folate retention in various foods that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. *Br J Nutr* 2002;88:681-8.
88. Bower C, Stanley FJ, Croft M, de Klerk N, Davis RE, Nicol DJ. Absorption of pteroylpolyglutamates in mothers of infants with neural tube defects. *Br J Nutr* 1993;69:827-34.
89. Neuhouser ML, Beresford SA, Hickok DE, Monsen ER. Absorption of dietary and supplemental folate in women with prior pregnancies with neural tube defects and controls. *J Am Coll Nutr* 1998;17:625-30.
90. Tamura T, Shin YS, Buehring KU, Stoksted ELR. The availability of folate in man: effect of orange juice supplementation on intestinal conjugase. *Br J Haematol* 1976;32:123-33.
91. Davis BA, Bailey LB, Gregory JF III, Toth JP, Dean J, Stevenson RE. Folic acid absorption in women with a history of pregnancy with neural tube defects. *Am J Clin Nutr* 1995;62:782-4.
92. Boddie AM, Dedlow ER, Nackashi JA, Opalko FJ, Kauwell GP, Gregory JF 3rd, Bailey LB. Folate absorption in women with a history of neural tube defect-affected pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2000;72:154-8.
93. Spina bifida incidence at birth--United States, 1983-1990. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1992;41:497-500.
94. Shaw GM, Jensvold NG, Wasserman CR, Lammer EJ. Epidemiologic characteristics of phenotypically distinct neural tube defects among 0.7 million California births, 1983-1987. *Teratology* 1994;49:143-9.
95. Hendricks KA, Simpson JS, Larsen RD. Neural tube defects along the Texas-Mexico border, 1993-1995. *Am J Epidemiol* 1999;149:1119-27.
96. Strong LC, Hollander WF. Hereditary loop-tail in the house mouse accompanied by imperforate vagina and with lethal craniorachischisis when homozygous. *J Hered* 1949;40:329-334.
97. Essien FB, Haviland MB, Naidoff AE. Expression of a new mutation (Axd) causing axial defects in mice correlates with maternal phenotype and age. *Teratology* 1990;42:183-194.
98. Macdonald KB, Juriloff DM, and Harris MJ. Developmental study of neural tube closure in a mouse stock with a high incidence of exencephaly. *Teratology* 1989;39:195-213.
99. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification [errata aparece en *Nat Genet* 1994;7:551]. *Nat Genet* 1994;7:195-200.
100. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, y cols. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene [errata aparece en *Mamm Genome* 1999;10:204]. *Mamm Genome* 1998;9:652-6.
101. Gaughan DJ, Barboux S, Kluijtmans LA, Whitehead AS. The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene* 2000;257:279-89.
102. DNA in the laboratory. En: Mange EJ, Mange AP, eds. *Basic human genetics*. 2<sup>a</sup> ed. Massachusetts, MA: Sinauer Associates, Inc.; 1999. p. 143-64.
103. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, y cols. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-113.
104. Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991;48:536-45.
105. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93:7-9.
106. De Franchis R, Buoninconti A, Mandato C, Pepe A, Sperandeo MP, Delgado R, y cols. The C677T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene is a moderate risk factor for spina bifida in Italy. *J Med Genet* 1988;35:1009-13.



107. Camacho Vanegas O, Giusti B, Restrepo Fernandez CM, Abbate R, Pepe G. Frequency of factor V (FV) Leiden and C677T methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations in Colombians [carta]. *Thromb Haemost* 1998;79:883-4.
108. Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, Wasserman CR, Lammer EJ. Maternal vitamin use, genetic variation of infant methylenetetrahydrofolate reductase, and risk for spina bifida. *Am J Epidemiol* 1998;148:30-7.
109. Esfahani ST, Cogger EA, Caudill MA. Heterogeneity in the prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in women of different ethnic groups. *J Am Diet Assoc* 2003;103:200-7.
110. McAndrew PE, Brandt JT, Pearl DK, Prior TW. The incidence of the gene for thermolabile methylene tetrahydrofolate reductase in African Americans. *Thromb Res* 1996;83:195-8.
111. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000;151:862-77.
112. Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, Opere-Sem O, Zivelin A, Geffen E, Seligsohn U. The frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, Japanese, and Africans. *Am J Hum Genet* 2002;70:758-62.
113. Blom HJ. Mutated 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and moderate hyperhomocysteinaemia. *Eur J Pediatr* 1998;157 (suppl2):S131-4.
114. Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA y cols. A methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1996;56:4862-4.
115. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, y cols. Methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57:1098-02.
116. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, y cols. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998;62:1044-51.
117. Kirke PN, Mills JL, Whitehead AS, Molloy A, Scott JM. Methylenetetrahydrofolate reductase mutation and neural tube defects. *Lancet* 1996;348:1037-8.
118. Christensen B, Arbour L, Tran P, Leclerc D, Sabbaghian N, Platt R, y cols. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Med Genet* 1999;84:151-7.
119. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64:169-72.
120. Donnelly JG. The 1298(A-C) mutation of methylenetetrahydrofolate reductase should be designated to the 1289 position of the gene [carta]. *Am J Hum Genet* 2000;66:744.
121. van der Put NJM, Blom HJ. Reply to Donnelly [Carta]. *Am J Hum Genet* 2000;66:744-745.
122. Trembath D, Sherbondy AL, Vandyke DC, Shaw GM, Todoroff K, Lammer EJ, y cols. Analysis of select folate pathway genes, PAX3, and human T in a Midwestern neural tube defect population. *Teratology* 1999;59:331-41.
123. Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, Eydoux P, y cols. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet* 1996;5:1867-74.
124. Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane B. Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. *J Biol Chem* 1997;272:3628-34.
125. Goulding CW, Postigo D, Matthews RG. Cobalamin-Dependent Methionine Synthase Is a Modular Protein with Distinct Regions for Binding Homocysteine, Methyltetrahydrofolate, Cobalamin, and Adenosylmethionine. *Biochemistry* 1997;36:8082-8091.
126. Chango A, Parrot-Roulaud F, Nicolas JP. Génétique moléculaire de la reméthylation de l'homocystéine. *Ann Biol Clin* 1999;57:37-42.
127. Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D, y cols. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3059-64.
128. Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, y cols. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab* 1999;67:317-23.
129. Doolin MT, Barbaux S, McDonnell M, Hoess K, Whitehead AS, Mitchell LE. Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida. *Am J Hum Genet* 2002;71:1222-6.
130. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1; MTHFD1. Baltimore, Maryland (EE.UU.): Johns Hopkins University;2003. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=172460> (acceso 13/5/03).
131. Brody LC, Conley M, Cox C, Kirke PN, McKeever MP, Mills JL, y cols. A polymorphism, R653Q, in the trifunctional enzyme methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase/formyltetrahydrofolate synthetase is a maternal genetic risk factor for neural tube defects: report of the birth defects research group. *Am J Hum Genet* 2002;71:1207-15.
132. Gu Z, Ramesh V, Kozich V, Korson MS, Kraus JP, Shih VE. Identification of a molecular genetic defect in homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1991;49:406.
133. Shih VE, Fringer JM, Mandell R, Kraus JP, Berry GT, Heidenreich RA, y cols. A missense mutation (I278T) in the cystathionine beta-synthase gene prevalent in pyridoxine-responsive homocystinuria and associated with mild clinical phenotype. *Am J Hum Genet* 1995;57:34-9.
134. Sebastio G, Sperandio MP, Panico M, de Franchis R, Kraus JP, Andria G. The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations. *Am J Hum Genet* 1995;56:1324-33.
135. Ramsbottom D, Scott JM, Molloy A, Weir DG, Kirke PN, Mills JL, y cols. Are common mutations of cystathionine  $\beta$ -synthase involved in the aetiology of neural tube defects? *Clin Genet* 1997;51:39-42.
136. Garrow TA, Brenner AA, Whitehead VM, Chen XN, Duncan RG, Korenberg JR, Shane B. Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferases and chromosomal localization. *J Biol Chem* 1993;268:11910-6.
137. Heil SG, van der Put NMJ, Waas ET, den Heijer M, Trijbels FJM, Blom HJ. Is mutated serine hydroxymethyltransferase

- (SHMT) involved in the etiology of neural tube defects? *Mol Genet Metabol* 2001;73:164-72.
138. Papapetrou C, Lynch SA, Burn J, Edwards YH. Methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects [carta]. *Lancet* 1996;348:58.
  139. Khoury MJ, Yang Q. The future of genetic studies of complex human diseases: an epidemiologic perspective. *Epidemiology* 1998;9:350-4.
  140. Morrison K, Papapetrou C, Hol FA, Mariman ECM, Lynch SA, Burn J, Edwards YH. Susceptibility to spina bifida; an association study of five candidate genes. *Ann Hum Genet* 1998;62:379-96.
  141. Shields DS, Kirke PN, Mills JL, Ramsbottom D, Molloy AM, Burke H, y cols. The "thermolabile" 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* 1999;64:1045-55.
  142. Juriloff DM, Harris MJ. Mouse models for neural tube defects. *Hum Mol Genet* 2000;9:993-1000.
  143. Khotwani A, Mehta VL, Prabhu S, Bapna JS. Methods for teratogenicity testing – Existing and future models. *Indian Journal of Pharmacology* 1995;27:204-13.
  144. Copp AJ, Brook FA, Estibeiro P, Shum ASW, Cockroft DL. The embryonic development of mammalian neural tube defects. *Prog Neurobiol* 1990;35:363-403.
  145. Van Allen MI, Kalousek DK, Chernoff GF, Juriloff D, Harris M, McGillivray BC, y cols. Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans. *Am J Med Genet* 1993;47:723-43.
  146. Van Allen MI. Multisite neural tube closure in humans. *Birth Defects: Original Article Series* 1996;30:203-25.
  147. Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: Effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:15227-32.
  148. Rosenquist TH, Schneider AM, Monogham DT. N-methyl-D-aspartate receptor agonists modulate homocysteine-induced developmental abnormalities. *FASEB J* 1999;13:1523-31.
  149. Watanabe M, Osada J, Aratani Y, Kluckman K, Reddick R, Malinow MR, Maeda N. Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1585-9.
  150. Heil SG, van der Put NM, Trijbels FJ, Gabreels FJ, Blom HJ. Molecular genetic analysis of human folate receptors in neural tube defects. *Eur J Hum Genet* 1999;7:393-6.
  151. Piedrahita JA, Oetama B, Bennett GD, van Waes J, Kamen BA, Richardson J, Lacey SW, Anderson RG, Finnell RH. Mice lacking the folic acid-binding protein Folbp1 are defective in early embryonic development. *Nature Genet* 1999;23:228-32.
  152. Carter M, Ulrich S, Oofuji Y, Williams DA, Ross ME. Crooked tail (Cd) models human folate-responsive neural tube defects. *Hu Mol Genet* 1999;8:2199-204.
  153. Fleming A, Copp AJ. Embryonic folate metabolism and mouse neural tube defects. *Science* 1998;280:2107-9.
  154. Zhao Q, Behringer RR, de Crombrughe B. Prenatal folic acid treatment suppresses acrania and meroanencephaly in mice mutant for the *Cart1* homeobox gene. *Nature Genet* 1996;13:275-83.
  155. Coelho CND, Klein NW. Methionine and neural tube closure in cultured rat embryos: morphological and biochemical analyses. *Teratology* 1990;42:437-51.
  156. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases *Dnmt3a* and *Dnmt3b* are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999;99:247-57.
  157. Moephuli SR, Klein NW, Baldwin MT, Krider HM. Effects of methionine on the cytoplasmic distribution of actin and tubulin during neural tube closure in rat embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:543-8.
  158. Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-Adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem* 2000;275:29318-23.
  159. Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, y cols. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:5606-11.



# 11 Prevención primaria de los defectos del tubo neural en las pacientes atendidas en un hospital mallorquín de referencia

## 11.1 Introducción

La aspiración de cualquier profesional de la salud cuya labor tenga que ver con la Dismorfología es disponer de medidas de prevención primaria efectivas; en este sentido, la prevención con ácido fólico de los defectos del tubo neural (DTNs) ha constituido un hito. No todas las prescripciones médicas están basadas en estudios de tanta calidad como los que han evaluado la eficacia de esta medida, por lo tanto, la ingesta periconcepcional de folatos para la prevención de los DTNs constituye una recomendación de grado A<sup>1</sup>. La Dirección General de Salud Pública del Ministerio de Sanidad y Consumo aconseja que la mujer que planifica un embarazo ingiera 0,4 mg diarios de ácido fólico desde al menos un mes antes de la gestación y durante los tres meses siguientes; para las mujeres que hayan tenido un hijo anterior con DTN, la dosis es de 4 mg/día<sup>2</sup>.

Adicionalmente, el papel del ácido fólico en la síntesis de los ácidos nucleicos y en las reacciones de metilación del organismo<sup>3</sup> explica su protagonismo durante toda la gestación, no restringiéndose exclusivamente al ámbito de los DTNs, aunque la evidencia disponible sobre otros beneficios en salud maternoinfantil es de calidad muy inferior (capítulo 9). Así, hay estudios observacionales que asocian el uso de folatos con la prevención primaria de las fisuras labiopalatinas (destaca el labio leporino)<sup>4-7</sup>, la reducción de extremidades<sup>8</sup>, las malformaciones nefrourológicas (obstructivas fundamentalmente)<sup>7,9,10</sup> y las cardiopatías congénitas (principalmente defectos del bulbo arterioso y septales)<sup>8,10,11</sup>. La toma de folatos en la segunda mitad de la gestación mejora significativamente los parámetros hematológicos maternos<sup>12</sup>, sin embargo su influencia sobre el peso al nacimiento, la prematuridad u otras causas de morbimortalidad perinatal no está bien definida.

La consulta preconcepcional, promocionada por miembros de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (S.E.G.O.) desde hace ya una década, constituye uno de los instrumentos dirigidos al fomento de la ingesta periconcepcional de folatos, así como a la aplicación de las actuaciones preventivas pertinentes con el fin de mejorar los resultados reproductivos. Este acto asistencial se puede iniciar tanto en Atención Primaria como en Especializada<sup>13</sup>.

Dadas la elevada frecuencia de los DTNs en Mallorca, con relación a otros registros (capítulos 7 y 8), y la efectividad de la prevención primaria de estas anomalías, se propusieron dos estudios, separados por un intervalo de cuatro años, cuyos objetivos son evaluar la profilaxis con ácido fólico entre las parturientas atendidas en el Hospital Son Dureta desde las perspectivas de frecuencia, inicio, duración y ade-

cuación, así como determinar las variables que influyen sobre su realización. Hemos explorado los datos de cada estudio individualmente y luego hemos procedido a compararlos entre sí, con el fin de evaluar la tendencia de la profilaxis con folatos en este último cuatrienio.

## 11.2 Material y métodos

Ambos estudios se han realizado de forma análoga, esto es, son descriptivos, transversales y los datos se han obtenido mediante la consulta de historias clínicas y entrevistas realizadas durante el parto o el puerperio precoz. La población diana se compuso de mujeres cuyos partos se produjeron durante el segundo trimestre de 1998 (primer estudio) y durante el bimestre abril-mayo de 2002 (segundo estudio). En estos dos intervalos se recogieron datos de más de 1000 mujeres, puesto que nuestro servicio es el primero en número de nacimientos de Mallorca (48% en el quinquenio 1995-99)<sup>14</sup>.

El cálculo del tamaño muestral se enfocó a obtener una estimación lo más precisa posible de la proporción de parturientas que habían tomado folatos antes de la concepción. En el momento de iniciar el primer estudio disponíamos de datos del Reino Unido que documentaban porcentajes muy altos de profilaxis periconcepcionales, esto es, alrededor del 30%<sup>15-6</sup>, sin embargo, nuestra experiencia asistencial nos hacía sospechar que en nuestro medio esta proporción era muy inferior. Por consiguiente, iniciamos un estudio piloto en el que entrevistamos a 15 púerperas, cuyos datos no se incluyeron en el trabajo final, y objetivamos que sólo una de ellas (7%) tomó ácido fólico periconcepcional. El tamaño muestral calculado fue de 622, teniendo en cuenta una precisión de la estimación del 2% y un nivel de confianza del 95%. Al plantearnos la investigación efectuada en 2002, nuestra impresión era de que se había producido un incremento de la proporción de profilaxis correctas, entonces, iniciamos la recogida de datos y evaluamos las 20 primeras entrevistas incluidas en el trabajo, obteniendo un 10% de profilaxis periconcepcionales. Calculamos la precisión de la estimación que obtendríamos si incluíamos a las parturientas atendidas en nuestro centro durante dos meses consecutivos (aproximadamente 480) y el resultado, para un nivel de confianza del 95%, fue una precisión del 2,7%, cifra que nos pareció adecuada.

Una única investigadora recogió todos los datos. Las variables comunes valoradas en ambas investigaciones fueron: edad materna; semanas de gestación en las que se efectuó la primera consulta prenatal; sector sanitario de la atención prenatal (público/privado); antecedentes familiares de DTNs; factores de riesgo de DTNs (drogodependencias, epilepsia, fármacos antifolato, diabetes mellitus pregestacional); anticonceptivos en el lapso de seis meses previos a la fecha de última regla; uso de folatos (sí/no); semanas de gestación de inicio y finalización; marca; posología; origen de la prescripción (ginecólogo, médico de familia, otro especialista, comadrona, medios de comunicación o amigos); finalidad de los suplementos percibida por la paciente; y cumplimiento. Además, las entrevistas efectuadas en 1998 catalogaron la ingesta de folatos de la dieta mediante el número de días a la semana que se ingerían alimentos ricos en esta vitamina (consumo diario de al menos una ración de cereales

para el desayuno, una ración de coliflor, coles de Bruselas o espinacas y/o de dos o más raciones de lechuga). En 2002 se excluyó la variable anterior y se introdujeron siete nuevas variables: paridad, nacionalidad/etnia, convivencia con la pareja, ocupación de ambos progenitores, antecedentes familiares de otras anomalías distintas de los DTNs, planificación del embarazo, y realización de la consulta preconcepcional. Las variables edad materna, paridad y semanas de gestación de inicio de los controles prenatales se recogieron de la historia clínica y las restantes se recabaron mediante entrevista con la participante, la cual se sirvió de la cartilla de embarazo para recordar con mayor precisión los datos que se le solicitaban.

En 1998 se recogió el uso de especialidades farmacéuticas cuyo único principio activo era el ácido fólico o el folínico, por lo tanto, no se incluyó una especialidad que contiene 100 mg de fumarato ferroso y 0,15 mg de ácido fólico. En 2002, se contabilizó el uso de especialidades con folatos, independientemente de que contuvieran vitamina B<sub>12</sub>, a partir de 0,4 mg, puesto que ésta es la dosis recomendada por el Ministerio de Sanidad y Consumo para la profilaxis de primeras ocurrencias de DTNs<sup>2</sup>. Hemos definido como prevenciones óptimas o adecuadas a las iniciadas con antelación superior o igual a un mes antes de la fecha de la última regla<sup>2</sup> y concluidas después de las ocho semanas de gestación, etapa de la embriogénesis en la que finalizan los periodos vulnerables para la mayoría de órganos<sup>17</sup>.

La condición socioeconómica de las participantes se valoró de acuerdo a la profesión de mayor cualificación entre los miembros de la pareja. Como la consulta preconcepcional no está protocolizada en nuestro entorno, se recogió como tal al acto médico que tuvo lugar a instancias de la paciente con el fin de averiguar “si estaba preparada” para iniciar una gestación.

Para el análisis estadístico hemos usado los programas SPSS 8.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE.UU.), Excel 7.0 (Microsoft, Redmond, Washington, EE.UU.) y Confidence Interval Analysis 2.0.0 (BMJ Books, Bristol, Reino Unido). El análisis bivariante se ha realizado mediante las pruebas de  $\chi^2$ , exacta de Fisher y U de Mann-Whitney; y el multivariante mediante regresión logística según el procedimiento “backward:conditional”. El nivel de significación elegido es del 5% ( $p < 0,05$ ) para dos colas.

## 11.3 Resultados

Las características de la población obstétrica atendida en nuestro servicio en ambos lapsos de recogida de datos se detallan en la tabla 11.1. Como se puede apreciar, la evolución de nuestras pacientes se concreta en un aumento de la edad materna, con una mayor proporción de gestantes en el tramo de edad de 30-35 años, y un incremento de pacientes extracomunitarias.

**Tabla 11.1.- Características de la población obstétrica atendida en el Hospital Son Durta en los dos periodos del estudio.**

		1998	2002	p
<i>Partos totales#</i>		651	422	
<i>Edad materna (años)*</i>		29 (15-45)	29 (14-44)	<b>0,026</b>
<i>Nacionalidades /etnias<sup>†</sup></i>	<i>Europa Occidental</i>	600 (92%)	322 (76%)	<b>&lt;0,001</b>
	<i>Europa Oriental/Asia/África</i>	11 (2%)	43 (10%)	
	<i>Iberoamérica</i>	16 (2%)	40 (10%)	
	<i>Etnia gitana</i>	24 (4%)	17 (4%)	

# Partos de fetos con peso superior a 500 g.

\* Mediana (rango).

<sup>†</sup>Número absoluto (porcentaje del total).

### 11.3.1 Estudio del año 1998

Si bien la población de estudio era de 651 mujeres, se pudo recabar información completa acerca del uso de folatos en 639 mujeres y parcial en otras diez, sólo en dos casos no se pudo obtener ningún dato al respecto.

La profilaxis con folatos fue seguida por 381 de 649 entrevistadas (59%, intervalo de confianza del 95% (IC 95%) 55-63) del total de participantes. La mediana de semanas de amenorrea al inicio de los suplementos fue de diez, mientras que la amplitud estuvo entre cero (preconcepcional) y 36 semanas. Las profilaxis se prolongaron hasta el término en 23% (IC 95% 19-27) de 376 mujeres, siendo la moda del número de semanas de gestación al finalizar el tratamiento de 40 y la mediana de 21. Si consideramos el inicio de la prevención con relación a la primera visita de control de embarazo, hemos objetivado que 11% de 377 mujeres la iniciaron antes de la primera visita; el 43% comenzaron el mismo día de la visita; mientras que el 46% restante empezaron más tarde. Sólo el 3% (IC 95% 2-4) de 646 mujeres consumieron suplementos periconcepcionales.

Aparentemente, la mayor edad materna no interviene sobre el inicio de los suplementos, esto es, el 2% de 368 mujeres menores de 30 años y el 3% de 278 mayores de 29 años empezaron a tomar suplementos antes de la concepción (p=0,415).

Las profilaxis se clasificaron según su inicio y se repartieron de acuerdo con el sector sanitario donde se llevó a cabo el control prenatal (tabla 11.2). En el sector privado, con respecto al público, se objetiva un mayor porcentaje de prevenciones de inicio periconcepcional (10% frente a 2%) (p=0,021), y de prevenciones totales (86% frente a 56%) (p<0,001).

**Tabla 11.2.- Idoneidad de las profilaxis según el sector sanitario donde se efectuó el control prenatal\* (estudio de 1998).**

Sector sanitario	Profilaxis con folatos		Ausencia de profilaxis	Subtotales
	Inicio periconcepcional	Inicio postconcepcional		
<i>Público</i>	11 (2%)	313 (54%)	255 (44%)	579 (100%)
<i>Privado</i>	6 (10%)	47 (76%)	9 (14%)	62 (100%)
<i>Totales</i>	17 (3%)	360 (56%)	264 (41%)	641 (100%)

\* No se han incluido cinco gestaciones no controladas.

Con relación a los factores de riesgo de DTNs, son muy pocas las mujeres entrevistadas que los presentan, por lo tanto, especificar caso por caso no nos permitirá sacar ninguna conclusión y resulta simplemente anecdótico. Únicamente citamos los antecedentes familiares de DTNs, circunstancia que se contabilizó en dos ocasiones, en las que el afectado era un hijo previo. Ambas participantes tomaron folatos, aunque sólo una lo hizo periconcepcionalmente y la otra a partir de las nueve semanas de gestación.

El 60% de las usuarias de anticonceptivos orales tomaron folatos en contraposición al 54% de no usuarias ( $p=0,153$ ). El inicio periconcepcional tuvo lugar en el 2% de las usuarias y en el 3% de las no usuarias ( $p=0,564$ ).

En la tabla 11.3 se sintetiza el efecto de las variables independientes edad, sector sanitario y uso de anticoncepción oral sobre la variable dependiente inicio periconcepcional de los suplementos (periconcepcionales frente a inicio postconcepcional más ausencia de profilaxis) y los valores de las odds ratios (ORs) de acuerdo con el análisis bivariante.

**Tabla 11.3.- Efecto de una serie de variables sobre el inicio periconcepcional de los suplementos (estudio de 1998).**

Variable		OR (IC 95%)	p
<i>Edad materna</i>	<30	0,8 (0,3-2,2)	0,734
	≥30	1,0	
<i>Sector sanitario</i>	Público	<b>0,3 (0,1-0,9)</b>	<0,001
	Privado	1,0	
<i>Usuarias de anti-conceptivos orales</i>	Sí	0,7 (0,3-2,1)	0,564
	No	1,0	

OR (odds ratio), IC 95% (intervalo de confianza del 95%).

Los valores estadísticamente significativos se han destacado en negrita.

Los principios activos que se recomendaron fueron: ácido fólico en el 79%, y ácido folínico en el 19% de las prescripciones. Las posologías recomendadas fueron diversas, según se puede apreciar en la tabla 11.4, predominando la dosificación recomendada por el fabricante. Asimismo, la mayoría de mujeres que tomaron preparados con folínico (exceptuando el folinato cálcico 1080 µg) no solían recordar haber efectuado el tratamiento con interrupciones bimestrales, tal y como lo recomendaba el fabricante, y en una proporción siempre superior al 24% para cada uno de estos preparados recordaron haberlo tomado sin los mencionados descansos.



**Tabla 11.4.- Posologías de folatos según las distintas marcas utilizadas (estudio de 1998).**

Marca	Posología recomendada					Totales
	Desconocida	½ dosis <sup>a</sup> diaria	1 dosis <sup>a</sup> diaria	2 dosis <sup>a</sup> diarias	3 dosis <sup>a</sup> diarias	
<i>Ácido fólico, co-mps. de 5 mg</i>	4 (1%)	2 (1%)	237 (78%)	55 (18%)	4 (1%)	302 (100%)
<i>Folinato cálcico, viales de 1080 µg</i>	0(0%)	0(0%)	1 (100%)	0(0%)	0(0%)	1 (100%)
<i>Folinato cálcico, comps. de 15 mg<sup>b</sup></i>	0(0%)	1 (14%)	5 (71%)	1 (14%)	0(0%)	7 (100%)
<i>Folinato cálcico, comps. de 8,1 mg<sup>b</sup></i>	0(0%)	0(0%)	20 (100%)	0(0%)	0(0%)	20 (100%)
<i>Ácido levofolínico, comps. de 5 mg<sup>b</sup></i>	0(0%)	3 (7%)	39 (87%)	3 (7%)	0(0%)	45 (100%)

<sup>a</sup> El vocablo dosis se refiere a la dosis diaria recomendada por el fabricante.

<sup>b</sup> Profilaxis ininterrumpidas con ácido folínico: una de cuatro mujeres con folinato cálcico 15 mg, cuatro de diez con folinato cálcico 8,1 mg y 13 de 30 con ácido levofolínico.

El origen de la profilaxis con folatos fue diverso: ginecólogo (71% de 378), comadrona (23%), amigos (2%), médico de familia (2%), mientras que los especialistas no ginecólogos y los medios de comunicación raramente originaron estas profilaxis. El 5% de las prescripciones de los ginecólogos y el 1% de las recomendaciones de las comadronas fueron periconcepcionales ( $p=0,203$ ).

Las razones para la ingesta de suplementos percibidas por las pacientes fueron las que siguen: 40% prevención de DTNs, 30% ignoraron el motivo de la prescripción, 26% profilaxis de malformaciones que no supieron concretar y el 3% otros motivos (retraso de crecimiento intrauterino, anemia, profilaxis de la prematuridad, etc.). La recomendación de suplementos no es suficiente, dado que hemos objetivado que algunas profilaxis iniciadas antes de la concepción o durante el primer trimestre eran suspendidas por las pacientes antes de la culminación de la organogénesis (12 semanas de amenorrea). Así, el 13% de las 112 gestantes que desconocían la razón para la toma de suplementos abandonaron el tratamiento; el 10% de las 99 que no supieron concretar el tipo de malformación prevenida; y el 8% de las 152 que recordaron que los folatos eran útiles para prevenir la espina bífida. Como se puede apreciar, las proporciones de abandonos son inversamente proporcionales a la información asimilada acerca del motivo de la prescripción. No obstante, la diferencia entre estos porcentajes no alcanzó la significación estadística ( $p=0,463$ ).

No se registraron olvidos en las tomas del tratamiento en el 75% de las pacientes, sin embargo, las restantes lo incumplieron en una proporción variable, destacando la omisión de una toma cada diez días.

Por último, se preguntó a las encuestadas sobre el consumo de alimentos ricos en folatos en su dieta habitual. El 70% de las mujeres manifestaron tomar vegetales de hoja verde durante tres o más días a la semana, mientras que en el resto la frecuencia de la ingesta fue inferior. Todas las participantes negaron la ingesta habitual de cereales, que habitualmente contienen 100 µg de ácido fólico por ración.

### 11.3.2 Estudio del año 2002

Durante el bimestre mencionado del año 2002, se registraron en nuestro centro 422 partos y como el porcentaje de participación fue del 100%, este segundo trabajo se basa en un número análogo de entrevistas.

Trescientas veinticuatro del total de las participantes tomaron folatos en algún momento de su gestación (77%, IC 95% 72-81). La mediana de semanas de amenorrea al inicio de la profilaxis fue de siete, y su amplitud entre cero (periconcepcional) y 29 semanas. Los folatos se abandonaron a una mediana de 18 semanas de gestación, con una moda de 12 y una amplitud entre cinco y 42. El 13% (IC 95% 10-16) del total de las mujeres iniciaron los folatos antes de la concepción y sólo el 8% (IC 95% 6-11) tomaron ácido fólico hasta el término. El 31% (IC 95% 27-36) de todas las participantes comenzaron la profilaxis después de la concepción, pero antes de las ocho semanas de amenorrea. En el 47% (IC 95% 42-52) de las encuestadas, los folatos se prescribieron durante la primera visita de control del embarazo.

Parece que la edad materna influye sobre la ingesta de suplementos, de modo que el 8% (18 de 216) de las menores de 30 años y el 17% (35 de 206) de las mayores de 29 la iniciaron antes de la concepción ( $p=0,007$ ).

Si tenemos en cuenta la nacionalidad o la etnia de las entrevistadas, observamos que el 87% de las europeas occidentales, el 65% de las gitanas, el 50% de las iberoamericanas y el 30% de las europeas orientales, asiáticas o africanas han consumido especialidades farmacéuticas con folatos en algún momento del embarazo ( $p<0,001$ ). Aun con todo, las profilaxis de inicio periconcepcional fueron patrimonio casi exclusivo de las ciudadanas occidentales. Así, el inicio pregestacional tuvo lugar en el 16% de las europeas occidentales y sólo en el 1% del resto de participantes ( $p=0,004$ ).

Nueve de las puérperas entrevistadas eran británicas: cinco de ellas iniciaron la prevención antes de la concepción, dos a las cuatro semanas de amenorrea y una a las siete. Todas, menos una, conocían la finalidad de los suplementos y en cuatro casos la recomendación no provenía del entorno sanitario (medios de comunicación, amigos). Si comparamos la proporción de suplementos periconcepcionales de este subgrupo con el resto de europeas occidentales, donde sólo el 15% habían iniciado precozmente la profilaxis, obtenemos un valor de  $p$  significativo ( $p=0,007$ ).

Aparentemente, la paridad no introduce diferencias en el consumo periconcepcional de folatos, entonces, el 12% de 159 primigestas lo tomaron periconcepcionalmente frente al 13% de 263 multigestas ( $p=0,769$ ). Sin embargo, el consumo de ácido fólico fue significativamente más frecuente en las primigestas (83%) que en el resto (73%) ( $p=0,018$ ).

Si diferenciamos entre atención prenatal pública y privada, observamos que seis de 37 participantes (16%) atendidas privadamente y 47 de 383 (12%) controladas en los servicios sanitarios públicos iniciaron la profilaxis antes de la concepción, no obstante, la diferencia entre ambas proporciones no fue significativa ( $p=0,444$ ). Al contrario, si consideramos todas las prevenciones, la mediana de semanas de ges-

tación al inicio es de cuatro (amplitud 0-16) en el sector privado y de siete (amplitud 0-29) en el público, y el valor de p sí es significativo ( $p=0,005$ ).

La convivencia de la participante con su pareja no modificó la proporción de prevenciones iniciadas antes de la concepción, puesto que el 14% de las 414 mujeres que convivían con su pareja y el 13% de las que no convivían iniciaron la profilaxis adecuadamente ( $p=1,0$ ).

De acuerdo con los resultados de la tabla 11.5, la mayor cualificación profesional es directamente proporcional al número de prevenciones totales y periconcepcionales ( $p<0,001$ ).

La existencia de antecedentes familiares de malformaciones influyó positivamente sobre la prevención. El 21% de 43 participantes con antecedentes y el 12% de 379 sin ellos tomaron suplementos periconcepcionales, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0,080$ ). Además, el 91% de las mujeres con antecedentes y el 75% sin ellos usaron folatos en cualquier momento de la gestación ( $p=0,023$ ). El 67% (2 de 3) de las gestantes con antecedentes familiares de DTNs en parientes de primer grado o en hijos previos tomaron folatos periconcepcionales frente al 12% (44 de 379) que no tenía antecedentes familiares ni de DTNs, ni de ningún otro defecto congénito ( $p=0,031$ ).

**Tabla 11.5.- Características de las profilaxis según la condición socioeconómica de las participantes o de sus parejas (estudio de 2002).**

<i>Condición socioeconómica</i>	<i>Ingesta de folatos</i>			<i>Subtotales</i>
	<i>Inicio periconcepcional</i>	<i>Inicio postconcepcional</i>	<i>No</i>	
<i>Directivos, técnicos y profesionales de las Fuerzas Armadas</i>	17 (27%)	40 (65%)	5 (8%)	62 (100%)
<i>Administrativos, comerciantes y estudiantes</i>	11 (14%)	58 (72%)	11 (14%)	80 (100%)
<i>Trabajadores manuales, pensionistas y rentistas</i>	25 (9%)	173 (62%)	82 (29%)	280 (100%)
<i>TOTAL</i>	53 (13%)	271 (64%)	98 (23%)	422 (100%)

( $\chi^2=28,70$ ;  $p<0,001$ )

El 14% de 122 usuarias de anticonceptivos tomaron folatos periconcepcionales, el 71% los iniciaron después de la concepción y el 15% no los tomaron; sin embargo, las cifras correspondientes para las no usuarias fueron del 12% de 300, 61% y 27%. La diferencia entre estas proporciones fue significativa ( $p=0,032$ ), por lo tanto, las consumidoras de anticonceptivos tomaron más folatos, aunque la idoneidad cronológica de los suplementos fue similar en ambos grupos.

Con relación a las especialidades farmacéuticas prescritas, destacaron por su uso mayoritario el ácido fólico 0,4 mg con vitamina B<sub>12</sub> (49% de 324) y el ácido fólico 5 mg (45%). A gran distancia, le sigue el ácido levofolínico (siete usuarias). La posología fue de un comprimido al día en el 98% de las mujeres que tomaron suplementos, mientras que al resto se le recomendó tomar dos comprimidos diarios.

Los profesionales que recomendaron el ácido fólico fueron por orden decreciente de frecuencia: comadrona (59% de 324), ginecólogo (30%) y médico de familia (5%). Los medios de comunicación (2%), los amigos (1%) y el médico especialista no ginecólogo (1%) constituyeron un origen poco frecuente de la toma de folatos. Al contrario, el 49% de las 53 prevenciones periconcepcionales fueron prescritas por el ginecólogo, seguido por la comadrona (21%) y el médico de familia (11%). Destacamos que el 33% de las profilaxis prescritas por el médico de familia fueron periconcepcionales, el 27% de las aconsejadas por el ginecólogo y el 6% de las recomendadas por la matrona ( $p < 0,001$ ).

Las finalidades de la profilaxis según las pacientes que tomaron suplementos fueron: prevención de DTNs (38%), prevención de malformaciones en general (25%), otras razones tales como retraso de crecimiento intrauterino, anemia, abrupcio placentae, etc. (1%). Sin embargo, el 36% de las que tomaron folatos no conocían la razón exacta de la prescripción, aunque sabían que era “para el feto”. La comprensión de la indicación de la prescripción favoreció su seguimiento. Así, el 100% de las gestantes que abandonaron la profilaxis antes de las ocho semanas y el 35% de las restantes que la prosiguieron ignoraban el objetivo concreto de la misma ( $p = 0,016$ ). Destacamos que ninguna de las cuatro gestantes que dejaron los suplementos antes de las ocho semanas los había iniciado periconcepcionalmente.

El cumplimiento de la profilaxis fue correcto en la mayoría de las participantes. Así, el 84% de las que consumieron suplementos declararon no haberse olvidado ningún comprimido, el 9% omitieron un comprimido cada diez días aproximadamente, y el 4% dejaron dos de cada diez.

En nuestra muestra, el 69% (IC 95% 64-73) de las entrevistadas afirmaron haber proyectado su embarazo, pero sólo el 18% las mismas tomaron folatos periconcepcionales; ninguna de las que no preveía su embarazo usó suplementos vitamínicos con ácido fólico ( $p < 0,001$ ). Además, hubo nueve casos en los que a pesar de que la consecución del embarazo se demoraba, la profilaxis se utilizó durante 20 ó más semanas, e incluso una de ellas alcanzó las 45 semanas. Por otra parte, de entre siete encuestadas que manifestaron esterilidad de varios años de evolución, con ulteriores embarazos conseguidos espontáneamente o mediante técnicas de reproducción asistida, ninguna cumplió con la prevención de forma óptima.

La consulta preconcepcional favoreció significativamente el uso de suplementos, puesto que 46% (35 de 76) de las mujeres que utilizaron periconcepcionalmente los folatos acudieron a dicha consulta frente al 5% (18 de 346) de las que no acudieron ( $p < 0,001$ ). Destacamos que en el 7% (5 de 76) de las consultas preconcepcionales no se recomendaron vitaminas.

La tabla 11.6 resume los hallazgos del análisis bivariante, esto es, la ingesta de folatos periconcepcionales es significativamente más frecuente entre mujeres de más de 29 años, nacidas en la Unión Europea, de condición socioeconómica más alta, que han realizado la consulta preconcepcional y que han planificado su embarazo.

**Tabla 11.6.- Efecto de una serie de variables sobre el inicio periconcepcional de los suplementos con folatos (estudio de 2002).**

	Variable	OR (IC 95%)	p
<i>Edad materna</i>	<30	<b>0,6 (0,4-0,9)</b>	<b>0,017</b>
	≥30	1,0	
<i>Nacionalidad/etnia</i>	Unión Europea	<b>19,1 (2,6-139,8)</b>	<b>&lt;0,001</b>
	Europa Oriental, Asia, África, Iberoamérica y etnia gitana	1,0	
<i>Paridad</i>	Primigesta	0,9 (0,5-1,7)	0,887
	Multigesta	1,0	
<i>Sector sanitario</i>	Público	0,7 (0,3-1,9)	0,444
	Privado	1,0	
<i>Convivencia con pareja</i>	Sí	1,0 (0,1-22,2)	1,0
	No	1,0	
<i>Condición socioeconómica</i>	Directivos, técnicos, militares, administrativos, comerciantes y estudiantes	<b>2,5 (1,4-4,5)</b>	<b>0,003</b>
	Trabajadores manuales, pensionistas y rentistas	1,0	
<i>Antecedentes familiares de malformaciones</i>	(-)	0,5 (0,2-1,1)	0,080
	(+)	1,0	
<i>Usuaris de anti-conceptivos orales</i>	Sí	1,2 (0,6-2,3)	0,587
	No	1,0	
<i>Consulta preconcepcional</i>	Sí	<b>15,6 (8,1-29,9)</b>	<b>&lt;0,001</b>
	No	1,0	
<i>Planificación gestacional</i>	Sí	<b>59,0 (3,6-963,8)</b>	<b>&lt;0,001</b>
	No	1,0	

\* Variables incluidas en el análisis multivariante.

OR (odds ratio), IC 95% (intervalo de confianza del 95%).

Los valores estadísticamente significativos se han destacado en negrita.

Hemos realizado una regresión logística (tabla 11.7) utilizando como variable dependiente el uso periconcepcional de folatos (periconcepcional frente a inicio postconcepcional más ausencia de profilaxis). La categorización utilizada para las variables independientes incluidas en el análisis multivariante fue la que sigue: edad materna (menor de 30/mayor de 29), nacionalidad o etnia (Unión Europea/resto de nacionalidades y etnia gitana), condición socioeconómica (directivos, técnicos, Fuerzas Armadas, estudiantes, comerciantes/trabajadores manuales, pensionistas, rentistas), antecedentes familiares de malformaciones (sí/no) y realización de la consulta preconcepcional (sí/no). Según la regresión logística, la nacionalidad y la realización de la consulta preconcepcional son predictoras independientes del inicio de los suplementos antes de la concepción.

**Tabla 11.7.- Análisis multivariante de las variables asociadas a la toma periconcepcional de folatos (estudio de 2002).**

Variable		OR cruda	OR ajustada	IC 95%
<i>Nacionalidad/etnia</i>	Unión Europea	19,1	12,3	1,6-93,5
	Europa Oriental, Asia, África, Iberoamérica y etnia gitana	1,0	1,0	
<i>Consulta pre-concepcional</i>	Sí	15,6	13,3	6,8-26,2
	No	1,0	1,0	

OR (odds ratio), IC 95% (intervalo de confianza del 95% de la odds ratio ajustada).

La OR cruda se ha obtenido mediante análisis bivariante, y la ajustada mediante multivariante.

### 11.3.3 Evolución de la ingesta de suplementos con folatos entre 1998 y 2002

La comparación de los datos obtenidos en dos periodos distintos nos permite estudiar la tendencia de la prevención primaria. Así, en la tabla 11.8 se aprecia un aumento significativo de las profilaxis con folatos tanto las periconcepcionales como las totales ( $p < 0,001$ ).

Se ha apreciado un avance significativo en el inicio de la ingesta de ácido fólico, puesto que en 1998 la mediana fue de diez semanas de gestación (amplitud 0-36) y en 2002 fue de siete semanas (amplitud 0-29) ( $p < 0,001$ ). Además, la proporción de gestantes que tomaron suplementos hasta el término ha descendido significativamente, esto es, fueron el 23% de todas las que tomaron ácido fólico en cualquier momento del embarazo en 1998 y el 10% en 2002 ( $p < 0,001$ ).

**Tabla 11.8.- Idoneidad de la toma de folatos según el año en que se realizó el estudio.**

<i>Uso de folatos</i>	1998	2002
<i>Inicio periconcepcional</i>	17 (3%)	53 (13%)
<i>Inicio postconcepcional</i>	362 (56%)	271 (64%)
<i>No tomó folatos</i>	269 (41%)	98 (23%)
<i>Totales</i>	648	422

( $\chi^2=66,50$ ;  $p < 0,001$ )

Si comparamos los resultados expuestos en las tablas 11.3 y 11.6, apreciamos que en 1998 sólo hay un aumento significativo de profilaxis periconcepcionales entre las gestantes controladas en el sector asistencial privado, mientras que la edad materna y los anticonceptivos orales no introducen variaciones significativas, aunque la estimación puntual para la edad materna menor de 30 años es inferior a uno, igual que en el estudio de 2002. Ya en el segundo estudio se objetiva la clara influencia de la edad sobre la adecuación de la profilaxis. El efecto que ejerce el sector sanitario sobre la realización de prevenciones periconcepcionales desaparece en 2002, aunque

la OR sigue siendo inferior a uno. Aparte, se observa que las profilaxis totales y las iniciadas antes de las ocho semanas de amenorrea han aumentado de forma paralela y significativa tanto en el sector público como en el privado, sin embargo, el privado sigue aventajando al público (tabla 11.9).

**Tabla 11.9.- Clasificación de las prevenciones según su inicio y sector asistencial en los estudios de 1998 y 2002.**

Sector sanitario		Inicio profilaxis		Ausencia profilaxis	Totales	p
		< 8 SG	≥ 8 SG			
<i>Público</i>	1998	88 (15%)	236 (41%)	254 (44%)	578 (100%)	<0,001
	2002	159 (42%)	130 (34%)	94 (24%)	383 (100%)	
<i>Privado</i>	1998	23 (37%)	30 (48%)	9 (15%)	62 (100%)	0,002
	2002	27 (73%)	8 (22%)	2 (5%)	37 (100%)	

En la tabla 11.10 se aprecia la evolución hacia el aumento de protagonismo en la recomendación de las prevenciones, tanto periconcepcionales como totales, de la comadrona y el médico de Atención Primaria, en detrimento del ginecólogo. Las diferencias sólo son significativas para el total de profilaxis.

**Tabla 11.10.- Evolución de la proporción de profilaxis recomendadas por los profesionales sanitarios.**

Profesional sanitario		Año estudio		Diferencia* (IC 95%)	p
		1998	2002		
<i>Ginecólogo</i>	Periconcepcional	13/15 (87%)	26/43 (60%)	-26,2% (-43,9-1,7)	0,108
	Totales	268/363 (74%)	98/308 (32%)	<b>-42,0% (-48,5-34,8)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<i>Comadrona</i>	Periconcepcional	1/15 (7%)	11/43 (26%)	18,9% (-6,6-34,6)	0,156
	Totales	88/363 (24%)	192/308 (62%)	<b>38,1% (30,9-44,8)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<i>Médico de familia</i>	Periconcepcional	1/15 (7%)	6/43 (14%)	7,3% (-17,0-21,7)	0,663
	Totales	7/363 (2%)	18/308 (6%)	<b>3,9% (1,0-7,3)</b>	<b>0,008</b>

\* Año 2002 menos año 1998.

También las especialidades farmacéuticas prescritas han sufrido una variación significativa, dado que en 1998 de 375 prescripciones con marcas conocidas, 19% contenían ácido fólico, mientras que en 2002 este porcentaje descendía al 2% de 317 ( $p < 0,001$ ). Análogamente, la posología también ha mejorado, pasando el número de dosificaciones incorrectas (dosis doble o superior) de 17% en 1998 a 2% en 2002 ( $p < 0,001$ ).

## 11.4 Discusión

Las proporciones de prevenciones óptimas documentadas en la literatura son muy variables y dependen fundamentalmente del país y del año escrutados. Entonces, los extremos que hemos encontrado en la literatura oscilan entre el 0% de las mujeres sudamericanas<sup>18</sup> o el 0,5% de las sicilianas<sup>19</sup> y el 52% de las mujeres holandesas<sup>20</sup>. En un punto intermedio están las cifras procedentes del Reino Unido, donde el 31% de las gestantes tomaban suplementos antes de la concepción en 1996<sup>16</sup>, y el 45% en 1998<sup>21</sup>. En general, en países en los que se han realizado campañas institucionales de promoción del ácido fólico la proporción de mujeres que toman suplementos tiende a ser más alta. En España, las cifras publicadas son exiguas, así en 1995 en Cantabria sólo una entre 406 gestantes consumió suplementos periconcepcionales<sup>22</sup>; en otro estudio, realizado en un área sanitaria de Madrid entre 1999 y 2000, se documentó un 17% de profilaxis periconcepcionales apropiadas y un 71% de planificaciones gestacionales<sup>23</sup>, cifras que son más similares a las presentadas en nuestro trabajo de 2002. A pesar de que nuestros resultados no son generalizables, puesto que ambos estudios se basan en datos obtenidos en circunstancias muy concretas de tiempo y lugar, nos aportan cifras muy inferiores a las objetivadas en otros países, por lo tanto, cabe preguntarnos la razón de la falta de aplicación de una prevención primaria correcta de los DTNs en nuestro entorno. Varios factores pueden explicar este hallazgo. Con respecto al estudio de 1998, es posible que al empezarse a prescribir los folatos no se tuviera demasiado en cuenta la calidad de los estudios que avalaban su uso, a diferencia de la actualidad, época en que la Medicina basada en la Evidencia ya ha ganado muchos adeptos entre la clase médica; la divulgación, por parte de los laboratorios farmacéuticos, de múltiples estudios acerca de los eventuales beneficios preventivos de los folatos a lo largo de todo el embarazo (abortos recurrentes, preeclampsia, abrupcio placentae, prematuridad, retraso de crecimiento intrauterino, etc.)<sup>24-8</sup> pudo fomentar la confusión entre los prescriptores. Con relación al estudio de 2002, pensamos que la difusión insuficiente de las directrices del Ministerio de Sanidad y Consumo<sup>2</sup>, publicadas en 2001, entre los profesionales de la salud ha jugado un papel clave. También, el rol del folato como antianémico y coadyuvante en la síntesis de ácidos nucleicos<sup>3</sup> debe haber contribuido a la prodigalidad con que se han prescrito estos suplementos.

En el año 1998, se realizaron más profilaxis periconcepcionales en el sector sanitario privado que en el público. La edad materna, la clase social, la nacionalidad o etnia y la planificación familiar fueron factores determinantes de la adecuación de la toma de suplementos, no sólo en nuestro estudio de 2002, sino en otros trabajos<sup>29-33</sup>. La mayor frecuencia de prevenciones adecuadas entre las clases sociales más altas y entre las embarazadas controladas en el sector privado se interpreta como un mayor uso del ácido fólico por quien posiblemente menos lo necesite, puesto que los DTNs suelen ser más prevalentes entre las clases sociales más desfavorecidas<sup>34</sup>.

Se han catalogado la nacionalidad y la realización de la consulta preconcepcional como variables explicativas independientes en la regresión logística. Entonces, ser extranjera extracomunitaria significa tener menor acceso a una prevención primaria óptima, lo cual se explica por el desconocimiento del sistema sanitario, las barreras idiomáticas, las diferencias culturales y la baja condición socioeconómica, entre



otros; por lo tanto, la atención a este sector poblacional ha de ser uno de nuestros objetivos preferentes. La consulta preconcepcional es otro elemento clave en la propagación de la prevención primaria, y es probable que su protocolización mejore la prevención de los DTNs. En este contexto, otra medida útil sería la formación específica del personal sanitario, de forma que cada consulta constituya una oportunidad para la promoción de la salud maternoinfantil<sup>30</sup>. La incorporación de la consulta preconcepcional como actividad propia del nivel asistencial más próximo al usuario, la Atención Primaria, adelantaría el inicio de las prevenciones, sin duda. Hemos apreciado que el protagonismo de la comadrona y del médico de familia ha ido aumentando espontáneamente a lo largo del tiempo, lo cual respalda la idoneidad de este nivel asistencial para asumir esta responsabilidad si se le proporcionan los recursos necesarios. Asimismo, no debería ocurrir que la realización de la consulta preconcepcional no fuera acompañada de la prescripción del ácido fólico, como ocurrió en el 7% de nuestra casuística. Otro aspecto importante es que la paciente entienda la necesidad de la toma de folatos, puesto que este factor favorece la compleción de la profilaxis.

En nuestro entorno no hay costumbre de tomar polivitamínicos rutinariamente, ni tampoco se compran en comercios que no sean farmacias, a diferencia de lo que ocurre en EE.UU.<sup>30</sup> o Gran Bretaña, por lo tanto, es prácticamente imposible que una española que no planifica su embarazo tome vitaminas. En consecuencia, la profilaxis sólo puede alcanzar al 69% de nuestra población, que es la que proyecta su embarazo. De nuevo, estas cifras son muy parecidas a las informadas por otros autores<sup>35-6</sup>. Incluso en sectores poblacionales muy motivados como las mujeres con antecedentes familiares de DTNs<sup>37</sup>, las de edad más avanzada<sup>38</sup>, o las que consultan preconcepcionalmente, el porcentaje de prevenciones óptimas está lejos del 100%.

El uso del ácido fólico, y no folínico, y su posología han mejorado significativamente en nuestro entorno. Destacamos que estos hallazgos coinciden con los mencionados en el capítulo 8 con relación a la venta de especialidades con folatos. Con referencia al ácido folínico, creemos pertinente reproducir lo que estipula la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre el uso racional del medicamento: “los pacientes reciban de los fármacos indicados para su situación clínica aquél que esté mejor estudiado (...), a las menores dosis con las que se obtenga el beneficio terapéutico deseado, durante un periodo de tiempo adecuado, y al menor coste posible para ellos y para la comunidad”, por consiguiente, es evidente que el uso del ácido folínico para la prevención de los DTNs contraviene claramente las recomendaciones de la OMS, puesto que su utilidad se ha estudiado poco, la dosis unitaria es elevada (5 mg o más en la mayoría de sus presentaciones) y es caro<sup>39</sup>. Pensamos que sólo investigaciones prospectivas bien diseñadas que confronten el ácido fólico, un placebo y el ácido folínico pueden esclarecer si este último está indicado en la prevención de las anomalías que nos ocupan. Por el momento, únicamente disponemos de datos prometedores sobre el efecto hipohomocisteinémico precoz, intenso y persistente del folinato<sup>40</sup> que podría ser útil para aquellas mujeres que inician los suplementos una vez son conscientes de su estado de gravidez. Como consecuencia de esta situación, en España sólo hay tres especialidades farmacéuticas aprobadas para la prevención primaria de los DTNs: ácido fólico en dosis de 0,4, 5 y 10 mg<sup>41</sup>.

Es obvio que el progreso experimentado en proporción de profilaxis óptimas y en reducción de duraciones superfluas es insuficiente, puesto que esta medida pre-

ventiva no va a alcanzar jamás sus objetivos teóricos si no hay un cambio de estrategia. Dicho cambio supone no conformarnos con la prevención secundaria de estas anomalías (aborto inducido) como mal menor. Como veremos, la coyuntura actual nos permite aprovechar la experiencia acumulada en otros países sobre estrategias preventivas de DTNs a nivel poblacional (campañas promocionales de la toma de suplementos con folatos y fortificación de cereales).

El ácido fólico sintético (monoglutamatos), en forma de suplementos o fortificación alimentaria, constituye el mejor medio para conseguir unos niveles protectores esta vitamina, puesto que los folatos de la dieta (poliglutamatos) tienen una biodisponibilidad baja<sup>42</sup> y los hábitos dietéticos son muy difíciles de modificar<sup>36</sup>. Estas tres modalidades de repleción de las reservas de folatos (suplementos, fortificación y dieta rica en folatos) no son excluyentes, sino complementarias. Por consiguiente, no hay que renunciar a los suplementos farmacológicos o a una dieta adecuada, pero es imperativo el enriquecimiento o fortificación de los cereales y sus derivados con esta vitamina, ya que ésta es la única forma de llegar a todas las mujeres, incluso a las que consumen menos folatos<sup>43</sup>. La aplicación de esta medida en España constituye motivo de controversia, puesto que algunos autores opinan que nuestra dieta tiene un importante contenido en folatos y que nuestra prevalencia de DTNs es baja<sup>44</sup>. Nosotros pensamos, a tenor de los datos expuestos en otro capítulo de esta tesis, que no se puede mantener esta aseveración; aunque también es cierto que si en España hubiera mayor cobertura de los registros de defectos congénitos dispondríamos de unas cifras de frecuencia más informativas. En este contexto, creemos oportuno comentar que ya se han publicado los primeros resultados exitosos tras la implantación de la fortificación en términos de reducción de prevalencia de los DTNs<sup>45-6</sup>, hallazgos que no se han dado a conocer tras las campañas de promoción de los suplementos con folatos. Otro beneficio potencial de la fortificación es la prevención de la enfermedad cardiovascular, ya que la ingesta de folatos es inversamente proporcional al riesgo de estos procesos<sup>47</sup> y a su mortalidad<sup>48</sup>. Esperamos que los logros obtenidos mediante la fortificación en otros países propicien, a medio plazo, la instauración de esta medida en el nuestro complementada con la realización de estudios prospectivos para verificar la utilidad de los folatos en la población española. Dada la evidencia existente sobre los beneficios del ácido fólico, sería deseable una política de salud pública más activa que llegara a toda la población femenina en edad fértil y que lograra implicar a los profesionales sanitarios.

## 11.5 Bibliografía

1. Lumley J, Watson L, Watson M, Bower C. Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects (Cochrane Review). En: The Cochrane Library, Issue 4, 2002. Oxford: Update Software.
2. Dirección General de Salud Pública del Ministerio de Sanidad y Consumo. Recomendaciones sobre suplementación con ácido fólico para la prevención de defectos del tubo neural. *Inf Ter Sist Nac Salud* 2001;66-7.
3. Steegers-Theunissen R. Folate metabolism and neural tube defects: a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995;61:39-48.
4. Tolarova M. Periconceptional supplementation with vitamins and folic acid to prevent recurrence of cleft lip. *Lancet* 1982;2:217.
5. Tolarova M, Harris J. Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology* 1995;51:71-8.
6. Czeizel AE, Timar L, Sarkozi A. Dose-dependent effect of folic acid on the prevention of orofacial clefts. *Pediatrics* 1999;104(6). Disponible en: URL: <http://www.pediatrics.org/cgi/content/full/104/6/e66> (acceso 10/1/01).

7. Werler MM, Hayes C, Louik C, Shapiro S, Mitchell AA. Multivitamin supplementation and risk of birth defects. *Am J Epidemiol* 1999;150:675-8.
8. Shaw GM, O'Malley CD, Wasserman CR, Tolarova MM, Lammer EJ. Maternal periconceptional use of multivitamins and reduced risk for conotruncal heart defects and limb deficiencies among offspring. *Am J Med Genet* 1995;59:536-45.
9. Li DK, Daling JR, Mueller BA, Hickok DE, Fantel AG, Weiss NS. Periconceptional multivitamin use in relation to the risk of congenital urinary tract anomalies. *Epidemiology* 1995;6:205-7.
10. Czeizel AE. Reduction of urinary tract and cardiovascular defects by periconceptional multivitamin supplementation. *Am J Med Genet* 1996;62:179-83.
11. Botto LD, Mulinare J, Erickson JD: Occurrence of congenital heart defects in relation to maternal multivitamin use. *Am J Epidemiol* 2000;151:878-84.
12. Mahomed K. Folate supplementation in pregnancy (Cochrane Review). En: *The Cochrane Library*, Issue 1 2003. Oxford: Update Software.
13. Fabre E, Fortuny A. Asistencia preconcepcional. En: Fabre E, editor. *Manual de asistencia al embarazo normal*. Zaragoza: Editorial Luis Vives; 1993. p. 35-45.
14. Institut Balear d'Estadística (IBAE). Disponible en: URL: <http://www.caib.es/ibae/> (acceso 20/1/03).
15. Sharpe G, Young G. Most pregnant women do not take folic acid [carta]. *BMJ* 1995;311:256.
16. Wild J, Sutcliffe M, Schorah J, Levene MI. Prevention of neural-tube defects. *Lancet* 1997;350:30-1.
17. Development. En: Mange EJ, Mange AP, eds. *Basic human genetics*. 2ª ed. Massachusetts, MA: Sinauer Associates, Inc.; 1999. p. 307-35.
18. Castilla EE, da Graca Dutra M. Folate awareness among South American women [carta]. *Lancet* 1997;349:735.
19. Pepe F, Pepe P, Montaperto A, Rotolo N, Florio ML, Uccellatore F. [Consumo de folatos durante el periodo preconcepcional en las gestantes sicilianas y su conocimiento de la prevención de los defectos del tubo neural mediante suplementos de folatos] [Artículo en italiano]. *Minerva Ginecol* 1999;51:177-81.
20. Bekkers RLM, Eskes TKAB. Periconceptional folic acid intake in Nijmegen, Netherlands [carta]. *Lancet* 1999;353:292.
21. Huttly WJ, Wald NJ, Walters JC. Folic acid supplementation before pregnancy remains inadequate. *BMJ* 1999;319:1499.
22. Ballesteros G, Muñoz P, López ME, de Miguel JR. Folatos y vitamina B12 en mujeres gestantes. *Prog Obstet Ginecol* 1999;42:543-57.
23. García Carballo MM, González González AI, Jiménez García R. Profilaxis de los defectos del tubo neural con folatos en las mujeres gestantes del Área 10 de Madrid. *Aten Primaria* 2003;31:98-103.
24. Scholl TO, Hediger ML, Schall JI, Khoo CS, Fischer RL. Dietary and serum folate: their influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr* 1996;63:520-5.
25. Neegers YH, Goldenberg RL, Tamura T, Cliver SP, Hoffman HJ. The relationship between maternal dietary intake and infant birthweight. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1997;165:71-5.
26. Leeda M, Riyazi N, de Vries JIP, Jakobs C, van Geijn HP, Dekker GA. Effects of folic acid and vitamin B6 supplementation on women with hyperhomocysteinemia and a history of preeclampsia or fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:135-9.
27. Nelen WLD, Blom HJ, Steegers EAP, Den Heijer M, Thomas CMG, Eskes TKAB. Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 2000;95:519-24.
28. Scholl TO, Johnson WG. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2000;71(suppl):1295S-1303S.
29. Sayers G, Johnson Z, McDonnell R, Scallan E. Knowledge and use of peri-conceptional folic acid among antenatal patients. *Ir Med J* 1997;90:236-8.
30. Centers for Disease Control and Prevention. Knowledge and use of folic acid by women of childbearing age – United States, 1995 and 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999;48:325-7.
31. Mathews F, Yudkin P, Neil A. Folates in the periconceptional period: are women getting enough? *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105:954-9.
32. Itikala PR, Ruuska SE, Oakley GP Jr, Kloebler-Tarver AS, Klein L. Periconceptional intake of folic acid among low-income women [carta]. *JAMA* 2000;283:3074.
33. Stepanuk K, Tolosa JE, Lewis D, Myers V, Royds C, Sabogal JC, Librizzi R. Folic acid supplementation use among women who contact a teratology information service. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:964-7.
34. Wasserman CR, Shaw GM, Selvin S, Gould JB, Syme SL. Socioeconomic status, neighborhood social conditions, and neural tube defects. *Am J Public Health* 1998;88:1674-80.
35. Hurren C, Thorpe L, Veltman M, Fitzsimon K, Elliott K. Folic acid and prevention of neural-tube defects [carta]. *Lancet* 1997;350:664.
36. Elkin AC, Higham J. Folic acid supplements are more effective than increased dietary folate intake in elevating serum folate levels. *BJOG* 2000;107:285-9.
37. Centers for Disease Control and Prevention. Folic acid awareness and use among women with a history of a neural tube defect pregnancy – Texas, 2000-2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51(No. RR-13):16-19.
38. Brandenburg H, Traas MA, Laudy J, Ursem N, Westerveld AM, Wladimiroff JW. Periconceptional use of folic acid amongst women of advanced maternal age. *Prenat Diagn* 1999;19:132-5.
39. Martínez-Frías ML, Rodríguez-Pinilla E, Mejías C, Dequino G. Prevención primaria de defectos del tubo neural: ¿ácido fólico o ácido levofolínico? [carta]. *Med Clin (Barc)* 2002;118:358.
40. Fabre E, Gallo M, Lou AC, Juste G, Romero MS, Blasco C, y cols. Efecto del ácido levofolínico sobre las concentraciones de homocisteína plasmática en la mujer joven y sana en la consulta preconcepcional. *Med Clin (Barc)* 2001;117:211-5.
41. Servicio Navarro de Salud – Osasunbidea. Recomendaciones sobre suplementación con ácido fólico para la prevención de defectos del tubo neural. Boletín de Información Farmacoterapéutica del Servicio Navarro de Salud – Osasunbidea 2001;9. Disponible en: URL:<http://www.cfnavarra.es/WebGN/SOU/public/bj/textos/v9n4.htm> (acceso 8/11/02).
42. Cuskelly GJ, McNulty H, Scott JM. Effects of increasing dietary folate on red-cell folate: implications for prevention of neural tube defects. *Lancet* 1996;347:657-9.
43. McNulty H, Cuskelly GJ, Ward M. Response of red blood cell folate to intervention: implications for folate recommendations for the prevention of neural tube defects. *Am J Clin Nutr* 2000;71(suppl):1308S-11S.

44. Fernández-Ballart JD, Murphy MM. Prevención nutricional mediante suplementación con ácido fólico: evidencias y posibilidades. *Revista Española de Nutrición Comunitaria* 1999;5:30-41.
45. Olney RS, Mulinare J. Trends in neural tube defect prevalence, folic acid fortification, and vitamin supplement use. *Semin Perinatol* 2002;26:277-85.
46. Ray JG, Meier C, Vermeulen MJ, Boss SJ, Wyatt PR, Cole DEC. Association of neural tube defects and folic acid fortification in Canada. *Lancet* 2002;360:2047-8.
47. Bazzano LA, He J, Ogde LG, Loria C, Vupputuri S, Myers L, Whelton PK. Dietary intake of folate and risk of stroke in US men and women. NHANES I Epidemiologic follow-up study. *Stroke* 2002;33:1183-9.
48. Medrano MJ, Sierra MJ, Almazán J, Olalla MT, López-Abente G. The association of dietary folate, B6, and B12 with cardiovascular mortality in Spain: an ecological analysis. *Am J Public Health* 2000;90:1636-8.

# **12 Valoración analítica del metabolismo del folato y de la homocisteína**

## **12.1 Introducción**

El diseño de nuestro trabajo sobre el metabolismo de la homocisteína (Hcy) y del folato en las madres de defectos del tubo neural (DTNs) (capítulo 13) ha venido precedido de una búsqueda bibliográfica exhaustiva sobre las magnitudes analíticas cuantificadas y los métodos disponibles para su medición. Esta búsqueda también ha sido de indudable utilidad para interpretar los resultados y extraer las conclusiones.

En este capítulo, no sólo nos ceñimos a las magnitudes cuantificadas en esta tesis, sino que comentamos sucintamente otras pruebas diagnósticas también útiles para la valoración de las reservas de folatos y de vitamina B<sub>12</sub>.

Los apartados correspondientes a los métodos analíticos cuantitativos se estructuran en condiciones preanalíticas, fundamento y procedimiento. Al final, presentamos las evaluaciones disponibles de cada técnica, dando prioridad a las evaluaciones independientes. Además, se comparan los datos reales de imprecisión analítica con los objetivos teóricos, basados en la variabilidad intraindividual. Por último, se describe detalladamente la reacción en cadena de la polimerasa, puesto que es el único método que no está automatizado.

## **12.2 Valoración del status de folatos y cobalamina**

### **12.2.1 Metabolismo y formas circulantes**

#### **12.2.1.1 Folatos**

Como hemos visto en el apartado 9.2.1, folato es la denominación genérica para un conjunto de moléculas que contienen ácido pteroilglutámico. En la sangre, la forma mayoritaria es el metil-tetrahidrofolato (metil-THF). Si se ingiere ácido fólico sintético a dosis altas, hallamos pteroilmonoglutamato en sangre<sup>1,2</sup>. Dos terceras partes del metil-THF del plasma están unidas a proteínas, entre las que destaca la albúmina<sup>3</sup>.

#### **12.2.1.2 Vitamina B<sub>12</sub>**

La vitamina B<sub>12</sub> o cobalamina es una familia de moléculas cuya característica común es la presencia de un anillo de corrina con un átomo de cobalto en el centro. Los diferentes radicales unidos al cobalto determinan los distintos tipos de vitamina B<sub>12</sub> (sección 9.3.1), pero en el suero la forma predominante es la metilcobalamina. La mayoría de inmunoensayos comercializados miden todas las formas de cobalamina previa conversión a cianocobalamina<sup>4</sup>.

La vitamina B<sub>12</sub> se une a múltiples ligandos proteicos, tal es el caso del factor intrínseco (indispensable para la absorción de cobalamina en el íleon distal), y las transcobalaminas (TCs) I (proteína R o haptocorrina), II y III. La mayor parte de la cobalamina sérica se une a la TC I y menos del 20% a la TC II. La TC I es una proteína de almacenamiento presente en la mayoría de líquidos orgánicos, y la II transporta la cobalamina a los receptores de membrana celulares, por consiguiente, la holo-TC II (proteína transportadora + cobalamina) es la fracción activa de la vitamina<sup>4</sup>.

## **12.2.2 Utilidad de las mediciones en sangre**

### **12.2.2.1 Folatos sérico e intraeritrocitario**

Las concentraciones de folato sérico se ven claramente influidas por la dieta. Sus niveles aumentan con la ingesta, razón por la cual se recomienda la obtención de muestras de sangre tras el ayuno nocturno habitual. Si bien los niveles de folatos disminuyen tras un breve periodo de restricción dietética<sup>5</sup>, el ayuno prolongado durante 24-36 horas puede duplicar sus concentraciones séricas<sup>6,7</sup>. Lamentablemente, la sensibilidad del folato sérico para el diagnóstico de su deficiencia es incierto, puesto que puede hallarse sólo en el límite bajo de la normalidad en pacientes con anemia megaloblástica claramente inducida por la carencia de folatos<sup>8</sup>. Al contrario, la ingesta regular de alcohol se asocia a hipofolatemia sérica en individuos con depósitos tisulares normales<sup>9</sup>. Si hay déficit de cobalamina, los niveles de folato sérico suelen aumentar, posiblemente a causa de la acumulación de metil-THF secundaria al bloqueo de la metionina sintetasa (MTR), enzima cobalamina-dependiente<sup>10</sup>. Análogamente, el 20% de pacientes con anemia perniciosa tienen concentraciones de folato sérico elevadas, mientras que son incomprensiblemente bajas en el 10% de estos pacientes<sup>9</sup>.

El interés por la cuantificación del folato intraeritrocitario, cuyas concentraciones son entre 40 y 100 veces superiores a su homólogo en suero<sup>4</sup>, ha surgido a raíz de los inconvenientes ya mencionados de la valoración del folato sérico. Como los eritrocitos acumulan los folatos durante la eritropoyesis, sus niveles permanecen constantes durante toda su vida (aproximadamente 120 días), entonces, los niveles de folato eritrocitario vienen a ser el promedio del status de folatos durante la eritropoyesis y, por consiguiente, son menos sensibles a las variaciones dietéticas a corto plazo. Además, las concentraciones de folato eritrocitario se correlacionan mejor con la megaloblastosis en sangre periférica y en médula ósea que las de folato sérico<sup>11</sup>. Lamentablemente, esta magnitud también tiene importantes limitaciones en cuanto a

su sensibilidad y especificidad, lo cual reduce su utilidad. Así, en un estudio de Varadi y cols.<sup>12</sup> sólo el 76% de gestantes con anemia megaloblástica supuestamente secundaria a déficit de folatos tuvieron niveles inferiores a 150 ng/mL (límite inferior habitual del intervalo de referencia). La deficiencia de cobalamina también interfiere con esta medición, causando niveles de folato eritrocitario falsamente disminuidos hasta en el 60% de pacientes con anemia perniciosa<sup>9</sup>. Este hallazgo se atribuye al papel clave que debe de ejercer la cobalamina en el traspaso del metil-THF del plasma a las células<sup>13</sup>.

### 12.2.2.2 Cobalamina sérica

Lindenbaum y cols. estudiaron los niveles de cobalamina sérica en un grupo de pacientes con clínica compatible con deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> y respondedores a la terapia sustitutiva. Cuatrocientos doce de 419 pacientes tuvieron niveles inferiores a 200 pg/mL, punto de corte que se suele utilizar habitualmente, por consiguiente, la sensibilidad para la cobalamina sérica inferior a 200 pg/mL fue del 98%<sup>14</sup>. Al contrario, Pennypacker y cols.<sup>15</sup> trataron con cobalamina a 29 ancianos cuyos niveles eran inferiores o iguales a 300 pg/mL y hallaron que un número similar de pacientes con concentraciones entre 201 y 300 pg/mL, e inferiores a 200 pg/mL tuvieron niveles elevados de ácido metilmalónico y/o homocisteína total (tHcy) (ver más adelante) que se normalizaron tras la administración de cobalamina, hecho que les llevó a concluir que la cobalamina sérica era una magnitud poco sensible. De hecho, parece que la cobalamina sérica refleja a la vez las reservas y la ingesta de esta vitamina. Entonces, aun en situaciones de ingesta deficiente, los niveles séricos de vitamina B<sub>12</sub> se mantendrían a expensas de las reservas tisulares. Por consiguiente, los valores bajos de cobalamina representarían un déficit de larga duración. En este contexto, se han identificado algunas condiciones que exhiben valores normales de vitamina B<sub>12</sub> cuando hay depleción de sus reservas<sup>9</sup> (tabla 12.1).

La escasa especificidad de la cuantificación de la cobalamina sérica explica que sólo el 60% de una serie de 300 pacientes no seleccionados con sospecha de deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> y niveles de la misma por debajo de 200 pg/mL respondieran clínicamente a la administración parenteral de cobalamina<sup>16</sup>. Adicionalmente, hasta una tercera parte de los pacientes folato-deficientes tienen niveles de cobalamina inferiores a 100 pg/mL que se normalizan tras la terapia con folatos, aunque se ignora el mecanismo de esta alteración<sup>9</sup>. Por último, existen múltiples causas reconocidas de niveles falsamente reducidos de cobalamina que también contribuyen a su falta de especificidad<sup>9</sup> (tabla 12.2).

**Tabla 12.1.- Causas de sobrevaloración de los niveles de cobalamina (niveles normales de esta magnitud en condiciones de depleción de la misma).**

<i>Procesos mielo-proliferativos</i>	<i>Policitemia</i>
	<i>Leucemia mieloide crónica</i>
	<i>Otros</i>
<i>Hepatopatías</i>	
<i>Deficiencia congénita de transcobalamina II</i>	
<i>Sobrecrecimiento bacteriano intestinal</i>	
<i>Administración de cobalamina</i>	

**Tabla 12.2.- Causas de niveles falsamente disminuidos de cobalamina.**

<i>Déficit de folatos</i>
<i>Gestación</i>
<i>Anticonceptivos hormonales orales</i>
<i>Deficiencia congénita de haptocorrina sérica</i>
<i>Mieloma múltiple</i>

## 12.2.3 Variabilidad biológica

### 12.2.3.1 Folatos

#### 12.2.3.1.1 Causas fisiológicas

La absorción de los folatos naturales siempre es inferior a la de los folatos sintéticos<sup>17-8</sup>. La malabsorción, el crecimiento, el embarazo y la lactancia, la matriz alimentaria, el pH en la mucosa yeyunal, la duración del tránsito intestinal y la presencia de inhibidores de la actividad de la pteroilpoliglutamato hidrolasa pueden modificar la proporción de folato dietético absorbido<sup>19</sup>.

Se ha documentado que la diferente disponibilidad de alimentos ricos en folatos en las distintas estaciones del año determina cambios significativos en los niveles de folatos séricos y eritrocitarios de un conjunto de individuos sanos que no toman folatos sintéticos. Sin embargo, estas diferencias no se han traducido en variaciones significativas de las concentraciones de tHcy<sup>20</sup>.

Los consumidores crónicos de alcohol tienen niveles más bajos de folatos que los no consumidores. Ello se debe principalmente a la ingesta escasa de folatos, y menos frecuentemente a la disminución de la absorción de folatos (reducción de la expresión del gen que codifica la proteína intestinal transportadora de folato), al descenso de su captación hepática y al aumento de su excreción renal<sup>21-6</sup>.

El tabaquismo también predispone a la deficiencia de folatos<sup>27-30</sup>. Al igual que en el enolismo, la causa fundamental parece residir en el aporte deficitario de folatos<sup>25,31</sup>. Incluso se ha objetivado que los no fumadores que viven con fumadores llegan a adoptar los hábitos dietéticos perniciosos de sus convivientes y acaban por te-



ner niveles de folato más bajos que los no fumadores que habitan con otros no fumadores<sup>32</sup>.

### 12.3.3.1.2 Causas patológicas

Se han tratado en el apartado 9.2.6.

### 12.3.3.1.3 Causas farmacológicas

Los fármacos antagonistas del folato incluyen variados agentes de prescripción frecuente (tabla 12.3).

**Tabla 12.3.- Fármacos antifolato.**

<i>Clases</i>	<i>Fármacos</i>
Quimioterápicos	Aminopterina y metotrexate
Fármacos antiepilépticos	Carbamazepina, fenitoína, fenobarbital, primidona y lamotrigina
Antibióticos	Trimetoprim, sulfamidas, sulfasalazina y pirimetamina
Diuréticos	Triamtereno
Antidiabéticos	Metformina
Hipolipemiantes	Colestiramina, colestipol

Los quimioterápicos aminopterina y metotrexate inhiben la dihidrofolato reductasa, enzima por la que tienen mayor afinidad que su sustrato fisiológico<sup>33</sup>.

Los fármacos antiepilépticos que pueden interferir en el metabolismo de los folatos son: fenitoína, carbamazepina, fenobarbital, primidona y lamotrigina. Parece que bajo el tratamiento con fenitoína las concentraciones de folato disminuyen<sup>34-5</sup>, aunque la progresión hacia anemia megaloblástica ocurre en menos del 1% de pacientes<sup>36</sup>, sin embargo la macrocitosis es frecuente<sup>37-8</sup>. A la inversa, la administración concomitante de 10 mg diarios de ácido fólico durante 15 días hace descender las concentraciones de fenitoína en sangre entre un 15% y un 45%<sup>38</sup>. Esta disminución de niveles se puede traducir en un aumento de episodios convulsivos<sup>39</sup> que no todos los ensayos clínicos han podido constatar<sup>35,40</sup>. La carbamazepina y el fenobarbital reducen las concentraciones de folato sérico posiblemente a través de la inducción enzimática hepática que producen<sup>41</sup>. La primidona se biotransforma en fenobarbital<sup>42</sup>, por lo tanto es un fármaco antifolato que puede precipitar la anemia megaloblástica en sujetos predispuestos<sup>43</sup>. El efecto antifolato de la fenitoína, el fenobarbital y la primidona se ha visto respaldado por los incrementos de las concentraciones de tHcy plasmática que ocasionan<sup>44</sup>. El supuesto efecto antifolato del valproato<sup>45</sup> es controvertido en la actualidad<sup>42,44</sup>. La lamotrigina es un anticomicial de aparición reciente que inhibe la dihidrofolato reductasa<sup>46</sup>.

Los antimicrobianos trimetoprim, sulfamidas, sulfasalazina y pirimetamina

también afectan el metabolismo de los folatos. Las sulfamidas son análogos estructurales del ácido p-aminobenzoico (PABA) e inhiben competitivamente la dihidropteroato sintetasa que cataliza la síntesis de ácido dihidropteroico a partir de pteridina y PABA<sup>47</sup>. El trimetoprim y la pirimetamina inhiben competitivamente la dihidrofolato reductasa de los organismos unicelulares. La inhibición de la síntesis del ácido fólico es especialmente nociva para las bacterias que el ácido fólico no puede atravesar, fenómeno que no ocurre en las células de los mamíferos<sup>47</sup>. La afinidad varía según la célula en la que se encuentra la dihidrofolato reductasa, así ésta es superior entre el trimetoprim y las enzimas bacterianas, y la pirimetamina y las enzimas del plasmodio, a pesar de ello la pirimetamina puede causar anemia megaloblástica a dosis altas que se previene y trata con ácido fólico (N<sup>5</sup>-formil-THF)<sup>48</sup>.

El diurético triamterene es un inhibidor competitivo de la absorción del folato<sup>49</sup> y sólo raramente causa anemia megaloblástica transitoria, leucopenia y trombocitopenia<sup>50</sup>. El antidiabético metformina<sup>51</sup> y los hipolipemiantes colestipol y colestiramina<sup>51-3</sup> disminuyen la absorción del folato.

En definitiva, el antagonismo de los folatos ejercido por algunos fármacos no siempre está bien documentado en la literatura médica (p.ej. lamotrigina, triamterene, metformina, colestipol o colestiramina), pero incluso en casos claros de antagonismo se necesitan dosis altas del fármaco y/o predisposición del sujeto.

Hace años se relacionaban los anticonceptivos orales de alta dosis de estrógenos con la depleción de folatos<sup>54-5</sup>, pero esta asociación no se ha podido confirmar ni en estudios metabólicos en los que se controló la ingesta dietética de las participantes<sup>56</sup>, ni en trabajos sobre anticonceptivos con 20 µg de etinilestradiol<sup>57</sup>.

#### **12.2.3.1.4 Causas genéticas**

Se ha evidenciado que la presencia del polimorfismo C677T de la enzima metilén-THF reductasa (MTHFR) (ver más adelante) se asocia a una mayor frecuencia de niveles bajos de folatos tanto plasmáticos como eritrocitarios<sup>58-9</sup>. Las gestantes fumadoras tienen concentraciones séricas y eritrocitarias de folatos más bajas que las no fumadoras, sobre todo si son portadoras homocigotas de la mutación C677T<sup>60</sup>.

## **12.2.3.2 Cobalamina**

### **12.2.3.2.1 Causas fisiológicas**

Las concentraciones plasmáticas de cobalamina tienden a disminuir con la edad<sup>61-2</sup>. Ello se atribuye a malabsorción de cobalamina de los alimentos, a causa de hipoclorhidria<sup>63-4</sup>, gastritis atrófica<sup>65</sup> o sobrecrecimiento bacteriano, condiciones que se hacen más prevalentes al envejecer<sup>66</sup>. La vitamina B<sub>12</sub> cristalina no parece verse afectada por la malabsorción ligada al envejecimiento<sup>67</sup>.

La relación entre los niveles bajos de cobalamina y el tabaquismo se ha documentado en múltiples estudios<sup>30,32</sup>, pero no se ha podido corroborar al controlar otros factores de confusión<sup>62,68</sup>, por consiguiente, las evidencias existentes no respaldan el efecto independiente del tabaco sobre las concentraciones de cobalamina.

Fernandes-Costa y cols. informaron de niveles de cobalamina séricos más altos entre mujeres jóvenes que en varones de edades similares, pero en ambos casos los niveles eran adecuados<sup>69</sup>. Por otra parte, no todos los estudios bien diseñados han podido confirmar esta asociación<sup>62</sup>.

### **12.2.3.2.2 Causas patológicas**

Se han explicado en el apartado 9.3.6.

### **12.2.3.2.3 Causas farmacológicas**

El óxido nitroso inhalado durante más de seis horas produce anemia megaloblástica, y la inhalación repetida de esta molécula causa una neuropatía similar a la del déficit de cobalamina. Ello se debe a que el óxido nitroso oxida la cobalamina, de forma que ésta se inactiva y no puede ejercer de cofactor de la MTR. La hipoproducción resultante de metionina llega a limitar también la disponibilidad de formas activas de folatos<sup>70</sup>. Afortunadamente, el uso de este fármaco no tiene consecuencias si se usa durante intervenciones quirúrgicas que no excedan de la duración habitual<sup>71-2</sup>.

## **12.2.4 Métodos para la valoración del status de folatos y cobalamina**

### **12.2.4.1 Consideraciones generales**

El problema común a la valoración de las reservas de folatos y de cobalamina es la inexistencia de patrones oro para el diagnóstico de estas alteraciones<sup>4,9</sup>. Los cambios hematológicos diagnósticos (anemia macrocítica, cambios megaloblásticos en la médula ósea) son característicos de la depleción severa de estas vitaminas, pero en la hipovitaminosis incipiente pueden aparecer macrocitosis o algunos neutrófilos hipersegmentados en el frotis sanguíneo en ausencia de anemia. Si hay ferropenia concomitante, los valores del volumen corpuscular medio perderán su valor diagnóstico al ser probablemente normales<sup>73</sup>. Como hay sospechas de que los DTNs se relacionan con unas carencias sutiles de estas vitaminas, es obvio que los indicadores hematológicos antedichos no son los más apropiados para la investigación de las anomalías objeto de esta tesis. Sin embargo, también es cierto que la clínica clásica (hematológica y neurológica) del déficit de folatos y/o de cobalamina junto con la respuesta a los tratamientos vitamínicos ha guiado la instauración de otras pruebas diagnósticas no hematológicas aptas para el diagnóstico de déficits incipientes, siempre y cuando conozcamos sus ventajas y sus limitaciones. Las mencionadas pruebas son el objeto de los apartados siguientes.

### **12.2.4.2 Prueba de la supresión de la desoxiuridina**

La prueba de la supresión de la desoxiuridina se fundamenta en que la conversión del ácido desoxiuridílico en ácido desoxitimidílico es una reacción que depende directamente del metilén-THF e indirectamente de la metilcobalamina. Por consiguiente, el déficit de folato y/o de cobalamina bloqueará esta reacción, y el desoxiuridilato se acumulará. En la médula ósea normal, la desoxiuridina participa en la síntesis del timidilato y suprime casi por completo la incorporación de timidina tritiada al ácido desoxirribonucleico (ADN). Si hay déficit de folato y/o de cobalamina, la timidina tritiada se incorpora al ADN<sup>74</sup>. Como hemos visto, esta prueba se realiza en mielocitos y es necesario utilizar timidina marcada radiactivamente, pero cuenta con la ventaja de que identifica déficits precoces, previos a su expresión hematológica. Si la deficiencia es de folatos, cualquier coenzima del folato puede corregir esta prueba. Al contrario, si la carencia es de cobalamina, sólo se corrige con ácido folínico (N<sup>5</sup>-formil-THF) o con cobalamina y ácido fólico juntos en un grado menor, mientras que el metil-THF no lo corrige e incluso empeora su resultado<sup>75-6</sup>, dado que la desmetilación de este sustrato se ve reducida (“trampa del metilfolato”)<sup>77</sup>.

### 12.2.4.3 Prueba del ácido formiminoglutámico

La cuantificación del ácido formiminoglutámico (FIGLU) en orina tras una sobrecarga de histidina constituye una prueba funcional útil para la detección de las deficiencias vitamínicas que nos ocupan<sup>78</sup>. El FIGLU es un metabolito intermediario en la conversión de la histidina a ácido glutámico y el THF es la coenzima que cataliza la degradación de FIGLU a glutamato. Si hay depleción de folatos, tras la administración de una dosis de 15 g de histidina oral la excreción urinaria de FIGLU aumenta en las 24 horas siguientes.

Esta prueba fue muy utilizada, hace ya varias décadas, en el estudio del status vitamínico de las gestantes portadoras de hijos con defectos del sistema nervioso central (capítulo 10) y de las anemias durante el embarazo<sup>79-80</sup>. Su principal ventaja reside en su bajo precio, puesto que su especificidad para el diagnóstico de la carencia de folatos es objeto de controversia<sup>81</sup>. La necesidad de recoger orina durante 24 horas y su posible alteración si hay carencia de vitamina B<sub>12</sub><sup>82</sup> limitan su aplicación.

### 12.2.4.4 Ensayos con vitaminas

En la década de los 70 se utilizaban los ensayos microbiológicos, pero en la actualidad los más difundidos en los laboratorios de análisis clínicos son los radioinmunoensayos.

Los ensayos microbiológicos se basan en el uso de microorganismos con patrones de crecimiento directamente proporcionales a la concentración de vitamina en una muestra dada<sup>77</sup>. Para la cuantificación de cobalamina se utiliza la *Euglena gracilis* y el *Lactobacillus leichmannii*, mientras que para el folato total se usa el *Lactobacillus casei*. El *Streptococcus faecalis* es de ayuda para determinar algunos derivados del folato, pero no sirve para cuantificar el metil-folato, que es el principal coenzima del folato en las células y en el suero. El crecimiento microbiano se mide por medio de la titulación automatizada del ácido láctico formado durante la incubación. La necesidad de un periodo de incubación de 48 horas y el efecto inhibitor que ejercen algunos antibióticos y fármacos antifolato administrados al paciente antes de la obtención de la muestra constituyen sus inconvenientes más destacados. Por otra parte, son muy exactos y precisos.

Los radioinmunoensayos son más sencillos de manejar y cuantifican la vitamina B<sub>12</sub> previa conversión a cianocobalamina por medio del cianuro potásico, mientras que el folato sérico se reduce y estabiliza con ditiotreitol (DTT) antes de su cuantificación<sup>4</sup>. Estos métodos pueden medir el folato y la cobalamina a la vez en muestras de plasma o suero, y también el folato eritrocitario previo hemolizado de una muestra de sangre total. Por otra parte, los niveles de folato plasmático son similares tanto calculados por ensayos microbiológicos como por radioinmunoensayos<sup>83</sup>. La variación de las condiciones preanalíticas relacionadas con la hemólisis de la muestra y los inconvenientes propios de la medición del folato en los lisados hace que la medición de folato en los hematíes no sea tan exacta como sería deseable<sup>84</sup>. De hecho, los niveles de folato eritrocitario calculados con estos ensayos pueden ser normales hasta

en el 40% de los casos de depleción grave confirmada por las manifestaciones clínicas, la respuesta al tratamiento y otros métodos diagnósticos<sup>77</sup>. Por último, los niveles de cobalamina medidos por radioinmunoensayo pueden estar falsamente elevados hasta en un 13% de las muestras de pacientes con anemia perniciosa documentada y niveles de cobalamina inferiores a 120 ng/mL según los ensayos microbiológicos<sup>77</sup>. Las concentraciones de B<sub>12</sub> obtenidas con los ensayos radioinmunológicos fueron más altas que las calculadas por los microbiológicos<sup>85</sup>, hasta que se purificó el factor intrínseco dispensado con los kits comerciales<sup>82</sup> (ver más adelante).

Los sistemas cromatográficos pueden escrutar la cantidad y calidad de los coenzimas circulantes del folato, aunque sólo se utilizan en un contexto de investigación, dadas la laboriosidad de estas técnicas y la labilidad de los coenzimas<sup>86</sup>.

Como la única fracción de cobalamina activa es la unida a la TC II, se ha propuesto la medición de la holo-TC II como alternativa a los inmunoensayos habituales. Se ha objetivado que los niveles de esta magnitud bajan antes de que lo haga la cobalamina sérica total<sup>87</sup>, y que su correlación con la malabsorción es mejor que la obtenida con la cobalamina plasmática<sup>88</sup>, por lo tanto esta magnitud indicaría déficits precoces<sup>89</sup>. Lamentablemente, las concentraciones de holo-TC II pueden ser bajas en pacientes con macrocitosis no relacionada con el déficit de B<sub>12</sub>, lo cual limita su aplicación en la práctica clínica<sup>90</sup>.

### 12.2.4.5 Ensayos metabólicos

Se fundamentan en la cuantificación de los metabolitos sintetizados gracias a la mediación del folato y/o de la cobalamina. Las moléculas utilizadas para este propósito son; la tHcy, el ácido metilmalónico, la cistationina, la betaína, la N,N-dimetilglicina, la N-metilglicina y el ácido metilcítrico en suero.

Como la determinación de tHcy se tratará más adelante, sólo comentamos que la bibliografía favorable a su uso en la valoración del status de folatos y de cobalamina es abundante, dadas sus altas sensibilidad y especificidad<sup>14,91-4</sup>.

El ácido metilmalónico se convierte en metilmalonil-coA, y éste se metaboliza a succinil-coA por medio de una hidrolasa que utiliza la adenosil-cobalamina como coenzima, por consiguiente la depleción de cobalamina se asociará a incrementos de metilmalonil-coA y de ácido metilmalónico. Obviamente, esta magnitud no se ha de ver modificada por la carencia de folato, por lo tanto, contribuye a distinguir entre el déficit de folato y de cobalamina<sup>91</sup>. Esta molécula se cuantifica tanto en sangre como en orina. Al igual que la determinación de tHcy es también muy sensible y específica para el diagnóstico de los déficits de cobalamina<sup>16,91,95</sup>. Adicionalmente, el ácido metilmalónico es un marcador precoz de depleción, puesto que puede estar elevado en hasta un 20% de pacientes con niveles séricos normales de vitamina B<sub>12</sub><sup>95</sup>.

En definitiva, las determinaciones de tHcy y de metilmalonato son tan específicas que sus niveles normales prácticamente excluyen la deficiencia de cobalamina aun en presencia de concentraciones bajas de esta última<sup>77</sup>, que podrían deberse a otras causas ajenas al status vitamínico.

Un grupo de científicos de la Universidad de Colorado han desarrollado un en-

sayo de cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (GC-MS) para la cuantificación de cistationina, betaína, N,N-dimetilglicina, N-metilglicina y ácido metilcátrico. Las referencias bibliográficas con respecto al uso de estos metabolitos en la valoración del status vitamínico son escasas y, posiblemente, podrían constituir líneas novedosas para la investigación de las enfermedades relacionadas con el metabolismo de la Hcy.

La cistationina sérica, resultado de la condensación de la serina y la Hcy por medio de la cistationina  $\beta$ -sintetasa (CBS), está elevada por encima de los límites de la normalidad en el 95% de los pacientes con déficit clínico de folatos y en el 87% con carencia clínica de cobalamina<sup>96</sup>.

La N,N-dimetilglicina es el metabolito resultante de la desmetilación de la betaína con la consiguiente metilación de la Hcy a metionina. Esta reacción no requiere ni cobalamina ni folato, aunque la N,N-dimetilglicina se convierte en N-metilglicina y después en glicina mediante reacciones que generan metilén-THF. En 25 pacientes con deficiencia de folato, los niveles de betaína sérica fueron normales en la mayoría, pero el 76% y el 60% de los mismos tenían niveles de N,N-dimetilglicina y N-metilglicina muy por encima de los límites superiores de los intervalos de referencia establecidos en este trabajo. Al contrario, la mayoría de los 50 pacientes con deficiencia de cobalamina tuvieron niveles normales de estos tres metabolitos y en ninguno de ellos se detectó un incremento de N-metilglicina. Como consecuencia de estos resultados, los autores de este trabajo concluyen que los niveles de N,N-dimetilglicina y N-metilglicina están incrementados en la mayoría de pacientes con deficiencia de folatos<sup>97</sup>.

El ácido oxaloacético se condensa con la acetil-coA por medio de la acción de la citrato sintetasa (EC 2.3.3.1) resultando en la formación de ácido metilcátrico. Esta enzima también cataliza la formación de ácido metilcátrico a partir del ácido oxaloacético y de la propionil-coA. La deficiencia de cobalamina puede conducir a incrementos del ácido metilcátrico. En el 88% de una serie de 50 pacientes con deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> confirmada clínicamente los valores del ácido metilcátrico fueron más altos que el límite superior del intervalo de referencia<sup>98</sup>.

## 12.2.4.6 Conclusiones

En la tabla 12.4 resumimos las características más destacadas de las pruebas diagnósticas comentadas en los apartados anteriores<sup>4,9</sup>.

**Tabla 12.4.- Pruebas diagnósticas para las deficiencias de folatos y cobalamina.**

Prueba	Depleción de folatos	Depleción de cobalamina	Frecuencia de utilización	Utilidad diagnóstica	Coste
<i>Cobalamina sérica</i>	Normal	↓	Alta	Media	Medio
<i>Folato sérico</i>	↓	Normal o ↑	Alta	Media	Medio
<i>Folato eritrocitario</i>	↓	↓	Baja	Media	Moderado
<i>Ácido metilmalónico sérico</i>	Normal	↑	Baja	Alta	Moderado
<i>tHcy plasmática</i>	↑↑	↑↑↑	Media	Alta	Moderado
<i>Cistationina sérica</i>	↑	↑	Baja	Alta	Alto
<i>N,N-dimetilglicina sérica</i>	↑	Normal	Baja	-	Alto
<i>N-metilglicina sérica</i>	↑	Normal	Baja	-	Alto
<i>Ácido 2-metilcitríco sérico</i>	Normal	↑	Baja	-	Alto
<i>Prueba de la supresión de desoxiuridina</i>	Anormal. Se corrige con todas las formas de folato pero no con cobalamina	Anormal. Se corrige completamente con ácido fólico y parcialmente con cobalamina + ácido fólico; empeora con metil-tetrahydrofolato	Baja	Alta	Moderado
<i>Prueba del FIGLU</i>	↑	↑	Baja	Media	Bajo

↑: el número de flechas simbolizan la cuantía de la incremento.  
tHcy (homocisteína total).

La infrautilización de muchas de las pruebas explicadas reside en su desconocimiento por parte del clínico, en la necesidad de aparataje específico y caro, y en la laboriosidad de algunas de las técnicas analíticas. Sin embargo, la exactitud diagnóstica sólo se alcanzará tras la aplicación juiciosa de varias de las pruebas mencionadas<sup>4,9,77</sup>, principalmente si perseguimos desenmascarar déficits vitamínicos sutiles.

## **12.2.5 Método de cuantificación del folato y de la cobalamina utilizado en esta tesis**

### **12.2.5.1 Condiciones preanalíticas**

Las muestras deben obtenerse de pacientes en ayunas, dado que el folato sérico aumenta apreciablemente tras la ingesta<sup>5</sup>. No se han de recoger las muestras en tubos con ascorbato o fluoruros, ya que cualquiera de estos aditivos destruye la cobalamina<sup>99</sup>. Como los eritrocitos contienen grandes cantidades de folato, hay que desechar las muestras hemolizadas si pretendemos analizar el suero o el plasma<sup>9</sup>.



Las muestras de suero o de plasma han de recogerse en tubos de cristal con sistemas de vacío. Para obtener el suero hay que dejar transcurrir 30-60 minutos a temperatura ambiente con el tubo cerrado. Antes de analizar las muestras hay que conservarlas a 2°-8°C siempre que este lapso no supere las cuatro horas, en cuyo caso hay que mantenerlas a -20°C por lo menos. Las muestras son estables a esta última temperatura durante 6-8 semanas<sup>99</sup>.

## 12.2.5.2 Fundamento de la técnica

El método elegido es el radioinmunoensayo (RIA), esto es, un inmunoensayo (método cuyas mediciones se basan en las reacciones antígeno-anticuerpo), en el que un trazador radiactivo se utiliza para marcar el antígeno o el anticuerpo. La medición del folato y de la vitamina B<sub>12</sub> se lleva a cabo de forma simultánea con el mismo procedimiento<sup>99</sup>. Los elementos que intervienen en este ensayo (SimulTRAC-SNB Vitamina B<sub>12</sub> [<sup>57</sup>Co]/Folato [<sup>125</sup>I] (no boil, solid phase) (ICN, Orangeburg, NY, EE.UU.)) son:

1. Los estándares: uno para el ácido fólico (en forma de ácido pteroilglutámico) y otro para la cobalamina. El fabricante los dispensa en soluciones cuyas concentraciones son conocidas con el fin de que podamos representar la curva de calibración.
2. Los trazadores radiactivos (cobalamina marcada con <sup>57</sup>Co y folato marcado con <sup>125</sup>I).
3. Los fijadores o anticuerpos que ligan de forma específica los estándares, los trazadores radiactivos, el metil-THF y la cobalamina de las muestras problema.

El fijador dirigido contra el folato es una β-lactoglobulina, obtenido de la leche bovina, y el dirigido contra la cobalamina es factor intrínseco purificado de origen porcino. Se ha eliminado la proteína R que pudiera acompañar al factor intrínseco por cromatografía de afinidad, puesto que la proteína R es muy afín a los análogos de la cobalamina, y podría causar niveles falsamente elevados. Los fijadores del folato y de la cobalamina se unen a un soporte sólido de forma covalente (“solid phase”).

Al mezclar el estándar (o la muestra), los fijadores y los trazadores se establece una competencia entre el estándar (o la muestra) y los trazadores para unirse a los fijadores. Si en el estándar (o en la muestra) hay una concentración alta de folato (o de cobalamina), se unirán más moléculas no marcadas radiactivamente a los fijadores y viceversa, esto es, la radiactividad ligada a los fijadores será inversamente proporcional a la concentración en el estándar (o la muestra).

Los fijadores séricos endógenos de vitamina B<sub>12</sub> y folato se eliminan tras la incubación con solución de trazador/DTT durante 15 minutos y subsiguiente extracción de diez minutos de duración a pH alcalino (uso de reactivo extractor con hidróxido sódico 1M), maniobra que evita el tener que hervir la muestra a 100°C (“no boil”)<sup>100</sup>.

El pH de fijación es de 9,5, puesto que al alcanzarlo tanto el metil-THF de la

muestra como el pteroilglutamato del estándar y del trazador tienen la misma afinidad por el fijador.

Los dos radioisótopos utilizados obedecen a la emisión de niveles de energía fácilmente separables por muchos contadores comerciales de dos canales.

### 12.2.5.3 Procedimiento

El fabricante del kit de radioensayo SimulTRAC-SNB recomienda seguir los siguientes pasos<sup>99</sup>:

1. Numerar 16 tubos para los estándares.
2. Numerar dos tubos por cada muestra problema, empezando por el número 17.
3. Añadir 200  $\mu\text{L}$  del reactivo 2A (solución de trazador/DTT) a todos los tubos.
4. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
5. Añadir 100  $\mu\text{L}$  del reactivo extractor a los tubos 3-16 y a todos los de la muestra. Vortear.
6. Incubar durante diez minutos a temperatura ambiente.
7. Mezclar bien el frasco de reactivo blanco Simultrac-SNB (contiene soporte sólido sin fijador formulado a la misma concentración de fase sólida que el fijador). Añadir 1000  $\mu\text{L}$  de reactivo blanco a los tubos 3 y 4.
8. Mezclar bien el vial de fijador Simultrac-SNB. Añadir 1000  $\mu\text{L}$  de fijador a los tubos 5-16 y a todos los tubos de la muestra. Vortear.
9. Incubar los tubos 3-16 y los de las muestras a temperatura ambiente durante 60 minutos contados a partir de la última adición del fijador.
10. Cubrir la gradilla de los tubos con papel de aluminio para protegerlos de la luz o mantenerlos en un sitio oscuro.
11. Centrifugar a un mínimo de 1000g durante diez minutos y preferentemente en frío.
12. Decantar con cuidado y desechar los sobrenadantes. Eliminar la última gota tocando el tubo con papel absorbente.
13. Contar la radiactividad en los sedimentos restantes de los tubos 1 y 2, consecutivamente durante un minuto con un contador gamma. Los recuentos en los tubos 1 y 2 han de estar entre 10 000 y 25 000 para el [ $^{57}\text{Co}$ ] y entre 15 000 y 35 000 para [ $^{125}\text{I}$ ].
14. Se calculan las curvas de calibración para la vitamina B<sub>12</sub> a partir del recuento de [ $^{57}\text{Co}$ ] y para el folato a partir del recuento de [ $^{125}\text{I}$ ]. Se promedian los resultados de cada par de tubos con el mismo estándar o con la misma muestra. Se sustrae el valor del blanco (tubos 3 y 4) de los demás recuentos. Se representa la curva de calibración en escala logarítmica, poniendo en abscisas el porcentaje calculado de fijación del trazador (cociente entre las cuentas corregidas para cada tubo y las cuentas corregidas promedio para los tubos 5 y 6) y en ordenadas las concentraciones correspondientes a la cobalamina (pg/mL) y al folato (ng/mL).
15. Se asignarán las concentraciones correspondientes a la cobalamina y al fo-

lato de acuerdo con el porcentaje calculado de fijación del trazador y los valores de ordenadas correspondientes a la curva patrón.

### 12.2.5.4 Evaluación

La evaluación por el fabricante<sup>99</sup> ofrece los siguientes resultados:

- Imprecisión: la amplitud para los coeficientes de variación (CVs) intraensayo fue de 3,2-11,2% para la vitamina B<sub>12</sub> y 4,1-8,6% para el folato, mientras que los CVs interensayo oscilaron entre 4,2% y 12,3% para la cobalamina y 7,1% y 11,7% para el folato.
- Correlación entre procedimientos: la comparación entre los valores de cobalamina obtenidos con este RIA y el ensayo microbiológico con *Euglena gracilis* resultó en un valor de r de 0,96 y una ecuación de la recta de regresión  $y=1,1x-32$  (pg/mL) donde x es el ensayo microbiológico e y el ensayo Simultrac-SNB. Las concentraciones de folato obtenidas con el kit Simultrac-S se compararon con las obtenidas con el kit que nos ocupa, y el valor de la r fue de 0,97 y el de la ecuación  $y=1,03x+0,01$  (ng/mL), siendo x el kit de RIA Simultrac-S y la y el kit Simultrac-SNB.
- Estudio de recuperación: la recuperación media de la cianocobalamina y del metil-THF añadidos por separado a dos muestras de suero fue del 100,1% para la cobalamina y del 102,0% para el folato.
- Reactividad cruzada: el factor intrínseco del kit tiene una reactividad cruzada con la cobinamida (un análogo de la vitamina B<sub>12</sub>) inferior al 0,01%.
- Detectabilidad: definida como las concentraciones correspondientes al 90% de fijación del trazador es de 75 pg/mL para la vitamina B<sub>12</sub> y de 0,6 ng/mL para el folato.

## 12.3 Cuantificación de la homocisteína

### 12.3.1 Metabolismo y formas circulantes

La Hcy es un metabolito azufrado intermedio formado durante la conversión de metionina a cisteína. La metionina es un aminoácido esencial y constituye la única fuente de Hcy<sup>101</sup>. Como se ha visto en el capítulo 9, la metionina contribuye a la síntesis de S-adenosil-metionina y proteínas. La S-adenosil-metionina es el mayor donador de metilos del organismo y esta transferencia de metilos resulta en la formación de S-adenosil-Hcy, metabolito tóxico, que pierde la adenosina y se convierte en Hcy.

Se ignora el origen exacto de la Hcy plasmática, aunque se cree que proviene de los hepatocitos y de las células en proliferación. Se cree que la Hcy plasmática es captada por las células y metabolizada, dado que sólo el 0,05% de la Hcy producida por las células se elimina a través de la orina<sup>102</sup>. Los estudios en ratas muestran que la degradación de la Hcy en el tejido renal tras su reabsorción representa la proporción más importante de su aclaramiento total<sup>103</sup>.

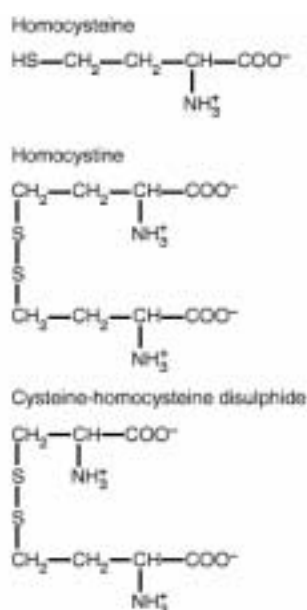
La Hcy posee un radical tiol libre y su pKa es de 8,9, por lo tanto, se oxida muy fácilmente a pH fisiológico y forma puentes disulfuro en el plasma con otras moléculas<sup>101</sup>. Entonces, en plasma hallamos la Hcy con su grupo tiol libre, o unido a otras moléculas mediante puentes disulfuro: dos moléculas de Hcy unidas (homocistina), dipéptido de Hcy y cisteína, o conjugada con proteínas<sup>104</sup> (figura 12.1). De las cuatro formas de Hcy presentes en plasma, la minoritaria es la Hcy libre que representa menos del 2%, los dipéptidos homocistina y Hcy-cisteína constituyen el 10-15% y la fracción conjugada con las proteínas el 80% restante<sup>105-6</sup>. La existencia de la Hcy tanto en su forma libre como dimérica u homocistina ha motivado que algunos autores utilicen la denominación “homocist(e)ina”<sup>104</sup>. Las proteínas transportadoras de Hcy contienen residuos reactivos de cisteína que ligan la Hcy y, aunque no está clara su naturaleza, parece que la albúmina es la más destacada<sup>107</sup>.

### 12.3.2 ¿Qué es la homocisteína total?

La determinación de la Hcy libre se dejó de realizar al requerirse el tratamiento inmediato de la muestra con ácido y la centrifugación del plasma, ya que en caso contrario, la forma libre se une progresivamente a las proteínas de transporte<sup>108</sup>. Obviamente, estas condiciones preanalíticas son difíciles de cumplir en el contexto clínico.

La Hcy determinada habitualmente es la tHcy, esto es, las cuatro fracciones de Hcy mencionadas anteriormente. Antes de su determinación se reducen los puentes disulfuro mediante la adición de agentes reductores como el DTT, el boruro sódico o los reactivos organofosforados<sup>109-10</sup>. Como más del 80% de la Hcy está conjugada con las proteínas, la determinación de la tHcy confiere mayor sensibilidad para su uso clínico que la Hcy libre, cuya concentración es muy inferior.

**Figura 12.1.- Formas circulantes de homocisteína no ligadas a proteínas.**



Homocysteine (homocisteína),  
homocystine (homocistina), cys-  
teine-homocysteine disulphide  
(dímeros de cisteína-  
homocisteína).

Aunque lo mejor es que cada laboratorio elabore sus intervalos de referencia de acuerdo con la técnica que utilice, a modo orientativo se acepta que éstos pueden hallarse entre 13 y 18  $\mu\text{mol/L}$  para el suero y 10-15  $\mu\text{mol/L}$  para el plasma<sup>110</sup>.

Prácticamente todas las determinaciones de tHcy son plasmáticas y raramente se cuantifica en orina, ya que, como hemos comentado, se reabsorbe dentro de los túbulos renales en un altísimo porcentaje<sup>104</sup>, y menos del 2% de la Hcy administrada en solución acuosa por vía oral se recupera a partir de la orina<sup>111</sup>.

## 12.3.3 Variabilidad biológica

### 12.3.3.1 Edad y sexo

La concentración de Hcy aumenta de forma directamente proporcional a la edad, y es superior en los varones y en las mujeres postmenopáusicas<sup>112-4</sup>. Ello se atribuye a diferencias en el status vitamínico en los distintos sexos y en los diferentes grupos de edad<sup>115-6</sup>, a la disminución fisiológica de la filtración glomerular con el devenir del tiempo<sup>117</sup> y a la influencia de las hormonas sexuales, puesto que existe una correlación negativa significativa entre los niveles de 17- $\beta$ -estradiol sérico y de

tHcy plasmática<sup>118</sup> La creatinina también puede explicar las diferencias sexuales en las concentraciones de tHcy, puesto que se correlaciona positivamente con las mismas y con la masa muscular, que es mayor en los varones<sup>112</sup>.

### 12.3.3.2 Etnia

Disponemos hasta la fecha de estudios aislados sobre los niveles de tHcy en distintos grupos étnicos. Como suele ser frecuente en estos casos, es difícil desligar el trasfondo genético propio de cada grupo étnico de las influencias ambientales que son también muy parecidas dentro de cada colectivo del mismo origen. La diferente distribución geográfica del alelo mutado C677T (ver más adelante) puede ser una de las causas<sup>119</sup>. Así, se han hallado niveles inferiores de tHcy basal en negros sudafricanos comparados con blancos de la misma edad y dieta<sup>120</sup>, y tras la prueba de sobrecarga de metionina (cuantificación seriada de los niveles de tHcy tras la administración de metionina oral, es útil para el estudio de la transulfuración y la detección de las mutaciones del gen que codifica la CBS)<sup>121</sup>. Estos hallazgos con relación a la raza negra se han corroborado en un estudio multiétnico que reclutó sujetos sanos mayores de 60 años de Los Ángeles<sup>122</sup>; también se encontraron niveles más bajos de tHcy para la población asiática con respecto al resto de etnias. Al contrario, Obeid y cols.<sup>123</sup> han objetivado niveles de tHcy superiores en 170 sujetos sanos procedentes de Bangladesh y habitantes de Londres en comparación con los participantes blancos de edad similar.

### 12.3.3.3 Ciclo menstrual, embarazo y uso de hormonales sexuales

Talova y cols. han detectado un descenso medio de 1,1  $\mu\text{mol/L}$  de tHcy al pasar de la fase proliferativa a la secretora en 15 mujeres sanas<sup>124</sup>. Esta disminución se ha corroborado en otro estudio de los mismos autores<sup>125</sup>.

Durante la gestación, y posiblemente a consecuencia de la hemodilución propia de este estado, las concentraciones de tHcy descienden entre un 30% y un 50%, pero retornan a su estado habitual entre el segundo y el cuarto día del puerperio<sup>126</sup>.

La terapia hormonal sustitutiva disminuye las concentraciones basales de tHcy aunque este descenso es de 1  $\mu\text{mol/L}$  o inferior<sup>127-9</sup>. Con respecto al uso de anticonceptivos, la investigación de Brattström y cols. informa de ausencia de diferencias con respecto a los valores de tHcy basal y post-sobrecarga de metionina entre 17 mujeres consumidoras de anticonceptivos orales y 13 controles<sup>130</sup>. Además, parece que la administración de etinilestradiol durante un corto periodo de tiempo no cambia las concentraciones de tHcy<sup>131</sup>.

### 12.3.3.4 Dieta

El status de las vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y folato influye sobre los niveles de tHcy, que aumentan en caso de depleción<sup>108,115,132-4</sup>. También el consumo de proteínas, única fuente de metionina para los humanos<sup>101</sup>, produce variaciones en sus concentraciones, sin embargo, las reacciones de remetilación y transulfuración se adaptan al exceso de metionina de forma que su ingesta en demasía no cause hiperhomocisteinemia de forma mantenida<sup>134</sup>. Varios estudios han documentado descensos de la homocisteinemia que se han prolongado hasta cuatro horas tras la ingesta de desayunos con 15-18 g de proteínas<sup>135</sup> y hasta ocho horas tras un desayuno con 32 g<sup>136</sup>, respectivamente. Sin embargo, la magnitud de estos cambios no ha alcanzado el 5% con respecto a las concentraciones de tHcy basales<sup>135</sup>. Al contrario, después de un almuerzo rico en proteínas (50 g), la tHcy plasmática aumenta lentamente a partir de las tres horas, y alcanza su máximo incremento a las seis-ocho horas (13,5% (media) ± 7,5% (desviación estándar) a las ocho horas)<sup>135</sup>.

En estudios más recientes como el Hordaland Homocysteine Study se observó que los participantes que no habían comido durante las seis horas previas a las venopunciones tenían concentraciones medias de tHcy significativamente superiores en comparación con los que habían comido (11,7 frente a 11,2 µmol/L en varones y 10,2 frente a 9,7 µmol/L en mujeres), esto es, un incremento medio del 4,3% en los varones y del 4,9% en las mujeres<sup>137</sup>. Estos hallazgos son similares a los documentados anteriormente tras un desayuno con 15-18 g de proteínas<sup>135</sup>.

La aplicación práctica de los hallazgos antedichos se concreta en la obligación de obtener las muestras de sangre para la medición de tHcy tras una cena cuyo contenido proteico no exceda del habitual. No está tan clara la necesidad de ayuno matutino previo a la venopunción, puesto que la variación introducida por el desayuno es inferior al 5%. Sin embargo, hay que tener en cuenta este factor al comparar los estudios en los que las extracciones de sangre se realizaron en ayunas con los que estudiaron muestras postprandiales<sup>137</sup>. En definitiva, las variaciones descritas relacionadas con la ingesta pueden falsear en mayor o menor grado el riesgo cardiovascular atribuido a un sujeto de acuerdo con sus niveles de tHcy, aunque difícilmente afectarán al diagnóstico de los déficits vitamínicos o de la homocistinuria<sup>135</sup>.

### 12.3.3.5 Estaciones

La variabilidad estacional se ha considerado en al menos tres trabajos sobre individuos sanos que la han enfocado de distinta manera (tabla 12.5). Así, Garg y cols. la estudiaron indirectamente al comparar los valores de tHcy cuantificados en una serie de nueve individuos, a cada uno de los cuales se les extrajeron dos muestras separadas por 30 meses<sup>113</sup>. Al contrario, los otros dos trabajos especificados en la tabla 12.5 se diseñaron específicamente para averiguar si las concentraciones de tHcy se veían influidas por la disponibilidad variable de alimentos ricos en folatos en las distintas estaciones del año<sup>20,138</sup>. Sólo en el estudio de Clarke y cols.<sup>138</sup> se hallaron diferencias significativas al comparar los valores de tHcy correspondientes los bi-

mestres julio-agosto y enero-febrero que constituyeron los periodos con valores medios de tHcy máximos y mínimos respectivamente, pero las objeciones a este estudio son la edad de los participantes y que los pacientes podían consumir alimentos fortificados y/o vitaminas, lo cual puede enmascarar los cambios estacionales. Con el fin de soslayar estos inconvenientes McKinley y cols. realizaron otro estudio<sup>20</sup> que si bien incluye una muestra menos numerosa, utiliza unos criterios de inclusión más estrictos y las edades de los participantes son más variadas. Sin embargo, no se objetivaron diferencias significativas para los niveles de tHcy a lo largo de las distintas estaciones y, como ya se ha comentado en el apartado 12.2.3.1.1, sí que se encontraron para las concentraciones de folatos sérico y eritrocitario. Parece ser que la ingesta dietética de alimentos ricos en vitamina B no afecta de forma relevante el status de este complejo vitamínico, mientras que la ingesta de suplementos vitamínicos sí que introduce cambios más evidentes<sup>139</sup>.

**Tabla 12.5.- Estudios sobre la variabilidad estacional de las medidas de homocisteína total en plasma.**

Estudio	Método analítico	Participantes				Diferencia media (IC 95%) ( $\mu\text{mol/L}$ )	
		Nº	Rango edad	Nº muestras/participante	Intervalo extracciones		
Garg y cols. <sup>113</sup>	HPLC	9	¿?	2	30 meses	-0,03 (-1,25-1,19)	
Clarke y cols. <sup>a,138</sup>	HPLC	96	65-74	7	2 meses	0,32 (-19,6- -0,35)	
McKinley y cols. <sup>b,20</sup>	FPIA	22	23-55	4	3 meses	Primavera	10,22 $\pm$ 3,41
						Verano	10,45 $\pm$ 3,46
						Otoño	10,62 $\pm$ 3,50
						Invierno	10,53 $\pm$ 4,31

IC 95% (intervalo de confianza del 95%), HPLC (high performance liquid chromatography), FPIA (fluorescence polarized immunoassay).

Las determinaciones se realizaron en sujetos en ayunas, salvo en el estudio de Clarke.

<sup>a</sup> Valores de homocisteína total de julio-agosto menos valores de enero-febrero. Los participantes podían consumir suplementos vitamínicos y/o alimentos fortificados.

<sup>b</sup> Valores de homocisteína total (medias  $\pm$  desviación estándar) para las distintas estaciones,  $p=0,719$ .

Los valores del coeficiente de confiabilidad (cociente entre la varianza interindividual y la total) alcanzados para todos los trabajos citados en este apartado<sup>20,113,138</sup> son superiores o iguales a 0,9, salvo para el trabajo de Clarke y cols. que es de 0,88<sup>138</sup>. El valor máximo lo alcanza la casuística de Garg y cols. con un valor de 0,94<sup>113</sup>. Por consiguiente, una determinación única de tHcy documenta bien los valores promedio para la tHcy de cada participante.



### **12.3.3.6 Consumo de café**

Se ha descrito una relación del tipo dosis-respuesta y de signo positivo entre el consumo de café y el incremento de los niveles de tHcy plasmática en diversos estudios, aunque el incremento inducido por éste es modesto<sup>140-2</sup>.

### **12.3.3.7 Hábitos tóxicos**

El hábito tabáquico se ha relacionado con un incremento de las concentraciones de tHcy, asociación que parece ser más marcada en el sexo femenino<sup>143</sup>. El consumo de elevadas cantidades diarias de alcohol de forma crónica aumenta los niveles de tHcy plasmática<sup>144</sup>, aunque el consumo diario pero escaso de alcohol parece disminuir la homocisteinemia<sup>104</sup>.

### **12.3.3.8 Ejercicio físico**

La realización de ejercicio físico y los niveles basales de tHcy se relacionan entre sí de forma inversamente proporcional<sup>143,145</sup>.

### **12.3.3.9 Postura**

Como las concentraciones de tHcy son un 19% inferiores en promedio tras 30 minutos de decúbito supino con respecto a la sedestación<sup>107,146</sup>, se recomienda que las extracciones no se realicen en decúbito supino, postura poco habitual durante las extracciones de sangre ambulatorias<sup>104</sup>.

### **12.3.3.10 Éstasis venoso**

La aplicación de un torniquete durante tres minutos incrementa los valores de tHcy en un 2,8% en promedio, variación que no nos parece relevante si la comparamos con su CV intraindividual (ver más adelante)<sup>107</sup>.

### **12.3.3.11 Insuficiencia renal**

Los niveles de tHcy ascienden a partir de un deterioro moderado de la función renal<sup>147-8</sup>, sin embargo la razón de este aumento no se ha identificado<sup>148</sup>.

### **12.3.3.12 Diabetes mellitus**

Algunos autores han documentado niveles de tHcy iguales o inferiores en los pacientes diabéticos<sup>117,149</sup> con respecto a los controles sanos, hecho que se ha atribuido a la hiperfiltración glomerular, propia de la nefropatía diabética incipiente<sup>117</sup>. Sin embargo, otras investigaciones han hallado en estos pacientes grados variables de hiperhomocisteinemia que está vinculada a la aparición de complicaciones crónicas tanto en diabéticos de tipo 1<sup>150</sup> como de tipo 2<sup>151</sup>.

### **12.3.3.13 Hipotiroidismo**

El hipotiroidismo subclínico no incrementa los niveles de tHcy<sup>152</sup>, a diferencia del hipotiroidismo sintomático que sí causa hiperhomocisteinemia. El hipertiroidismo no hace variar los niveles de tHcy<sup>153</sup>, o bien los disminuye<sup>154</sup>. Los niveles de tHcy son directamente proporcionales a los niveles de hormona tiroestimulante y si bien la terapia sustitutiva disminuye significativamente los niveles basales de tHcy, no restituye los niveles de tHcy post-sobrecarga de metionina a la normalidad<sup>155</sup>.

### **12.3.3.14 Trasplantes**

Los trasplantes cardíaco<sup>156</sup> y renal<sup>157-8</sup> se asocian a hiperhomocisteinemia. En el caso del injerto renal, el aumento de tHcy se atribuye a la hipofunción renal, a la hipofolatemia, y a los usos de ciclosporina y corticoides<sup>159-61</sup>.

### **12.3.3.15 Procesos hiperproliferativos**

Se ha descrito hiperhomocisteinemia significativa en 12 niños con leucemia linfoblástica aguda antes del inicio de la quimioterapia (13,2  $\mu\text{mol/L}$  en niños enfermos frente a 6,5  $\mu\text{mol/L}$  en niños sanos), estos valores de tHcy se correlacionaron con las concentraciones de folato sérico y el recuento de leucocitos en sangre periférica<sup>162</sup>. También se ha documentado un incremento significativo de la tHcy basal entre los afectados de psoriasis severa, hallazgo que parece secundario a la alta proporción de mitosis en las células epiteliales de las lesiones cutáneas<sup>163</sup>.

### **12.3.3.16 Artritis reumatoide**

Los pacientes afectados por artritis reumatoide tienen las concentraciones de tHcy superiores a los controles, diferencias que son significativas incluso para el grupo de enfermos que no son tratados con metotrexate<sup>164-5</sup>.

### **12.3.3.17 Hipertensión arterial**

La hipertensión arterial, sistólica aislada<sup>166</sup> y diastólica, se ha vinculado a un incremento significativo de la tHcy<sup>145,167-8</sup>. El Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) estadounidense ha objetivado que la tHcy se asocia positivamente con las cifras de tensión arterial tras ajustar los resultados para otros factores de riesgo cardiovascular. Por cada incremento de 5 µmol/L se detectan unos aumentos medios de tensión arterial sistólica y diastólica de 0,5 y 0,7 mmHg respectivamente en varones y de 0,7 y 1,2 mmHg en mujeres<sup>168</sup>.

### **12.3.3.18 Enfermedades cardiovasculares y neuropsiquiátricas**

Estas dolencias también se asocian a hiperhomocisteinemia y se han tratado en la sección 9.2.7. Recordamos que la elevación de la tHcy se ha asociado con los factores de riesgo cardiovasculares más conocidos, esto es, el sexo masculino, la edad, el tabaquismo, la hipertensión, la hipercolesterolemia y el sedentarismo<sup>143</sup>. Además, en un estudio de casos y controles multicéntrico europeo se ha establecido que los niveles altos de tHcy constituyen un factor de riesgo independiente de enfermedad cardiovascular de cuantía comparable al tabaquismo o a la dislipemia<sup>169</sup> (sección 9.2.7.1).

### **12.3.3.19 Fármacos**

Se ha descrito hiperhomocisteinemia ligada al uso de medicamentos que interfieren con los ciclos metabólicos del folato y la Hcy, o con la absorción de folato. Estos fármacos son el metotrexate<sup>170-1</sup>, cuyo efecto que se ve potenciado si se combina con la sulfasalazina<sup>172</sup>; los fármacos antiepilépticos<sup>170,173-4</sup>; la colestiramina<sup>51,175</sup>; los fibratos<sup>51</sup>; el ácido nicotínico o niacina<sup>51,176</sup>; la metformina<sup>51</sup>; el óxido nitroso<sup>177</sup>; la L-dopa y los inhibidores de la dopa-decarboxilasa<sup>178</sup>. Al contrario, la penicilamina<sup>179</sup> y la acetilcisteína son aminotioles disminuyen los niveles de tHcy<sup>180</sup>.

### **12.3.3.20 Trisomía 21**

El gen que codifica la enzima CBS se localiza en el cromosoma 21 y se sobreexpresa en los niños con síndrome de Down, hecho que parece ser la causa de sus niveles más bajos de tHcy con respecto a la población normal<sup>181-2</sup>.

### **12.3.3.21 Factores genéticos**

La distribución de las concentraciones basales de tHcy en la población general no es gaussiana, sino que se prolonga hacia la derecha, lo que se atribuye a metabolopatías que afectan al ciclo de la Hcy<sup>108,110</sup>. De hecho, el acúmulo de Hcy se debe a las alteraciones de la CBS, de la MTR, de la MTHFR, o a un defecto del metabolismo de la cobalamina (mutaciones cblC-G). Así, la homocistinuria es el resultado de la deficiencia homocigota de la CBS y se vincula a concentraciones de tHcy superiores a 50  $\mu\text{mol/L}$ <sup>143</sup>. Se han descrito más de 90 mutaciones distintas del gen de la CBS asociadas a la homocistinuria<sup>183</sup>. En la población general hasta 1/70 individuos son heterocigotos para las mutaciones de la CBS, lo cual da lugar a concentraciones de tHcy basales prácticamente normales, pero elevadas tras la sobrecarga de metionina<sup>184-5</sup>. Las deficiencias homocigotas severas del complejo de la MTR originan hiperhomocisteinemias moderadas y severas<sup>186</sup>. Se han documentado 24 mutaciones responsables de la deficiencia severa de la MTHFR que, a su vez, constituye la metabolopatía congénita del folato más frecuente<sup>187</sup>. Al contrario, la variedad termolábil de la MTHFR, causada por la mutación puntual C677T, pasa más desapercibida, causando hiperhomocisteinemia leve sólo en presencia de niveles de folato plasmático inferiores a la mediana<sup>188</sup>. Por último, los errores congénitos del metabolismo de la cobalamina (mutaciones cblC a cblG) causan hiperhomocisteinemia severa puesto que afectan al correcto funcionamiento de la MTR<sup>97,189-90</sup>.

### **12.3.3.22 Conclusiones sobre la variabilidad biológica**

En la tabla 12.6 se resumen los factores que introducen variaciones en las concentraciones de tHcy y la magnitud de las mismas<sup>191</sup>.

## **12.3.4 Procedimientos de medida de la homocisteína total utilizados en esta tesis**

Si bien en el pasado se utilizaban métodos más laboriosos (intercambio iónico, determinaciones radienzimáticas), el interés creciente en clínica por la Hcy ha propiciado la aparición de métodos rápidos, automatizados y de rendimientos crecientes. Entre ellos se hallan los utilizados en este trabajo: la cromatografía en fase líquida de alta resolución y el inmunoensayo de fluorescencia polarizada.

**Tabla 12.6.- Factores determinantes de los niveles de homocisteína total (modificado de H. Refsum y cols.<sup>191</sup>).**

<i>Grupos de factores</i>	<i>Factores específicos</i>	<i>Efecto</i>
<b><i>Fisiológicos</i></b>	Envejecimiento	(↑)
	Sexo masculino	(↑)
	Función renal, reducción de la filtración	(↑)
	Incremento de la masa muscular	(↑)
	Raza blanca	(↑)
	Fase secretora	(↓)
	Embarazo	↓
	Ingesta proteica	(↑)
	Consumo de café	(↑)
	Hábito tabáquico	(↑)
	Enolismo	↑
	Ejercicio físico	↓
	Decúbito supino	↓
	Éstasis venoso	(↑)
<b><i>Patológicos</i></b>	Déficit de folatos	↑↑↑
	Déficit de vitamina B <sub>12</sub>	↑↑↑
	Déficit de vitamina B <sub>6</sub>	↑
	Insuficiencia renal	↑↑
	Diabetes mellitus	↓/↑
	Hipotiroidismo	↑
	Trasplante	↑
	Procesos hiperproliferativos	↑
	Artritis reumatoide	↑
	Hipertensión arterial	↑
	Enfermedades cardiovasculares	↑
	Trastornos neuropsiquiátricos	↑
<b><i>Fármacos</i></b>	Ingesta de vitaminas	↓
	Metotrexate	↑
	Fármacos antiepilépticos	↑
	Colestiramina	↑
	Fibratos	↑
	Niacina	↑
	Metformina	↑
	Óxido nitroso	↑↑
	L-dopa	↑
	Tratamiento hormonal sustitutivo	↓
Aminotioles (acetilcisteína, penicilamina)	↓	
<b><i>Cromosómicos/ genéticos</i></b>	Trisomía 21	↓
	Homocigosidad para defectos de la CBS	↑↑↑
	Heterocigosidad para defectos de la CBS	↑
	Homocigosidad para defectos de la MTR	↑↑↑
	Homocigosidad para defectos de la MTHFR	↑↑↑
	Heterocigosidad para defectos de la MTHFR	↑
	MTHFR termolábil	↑
Mutaciones cblC-G	↑↑↑	

↓ (reducción de la concentración de homocisteína total), (↑) (aumento de la concentración de homocisteína total, pero dentro de los intervalos de referencia), ↑, ↑↑, ↑↑↑ (hiperhomocisteinemias leve (15-30 μmol/L), moderada (30-100 μmol/L) y severa (>100 μmol/L)), CBS (cistationina-β-sintetasa), MTR (metionina sintetasa), MTHFR (metilén-tetrahidrofolato reductasa), SAH (S-adenosil-homocisteína).

### 12.3.4.1 Condiciones preanalíticas

La estandarización de la fase preanalítica surge de la influencia negativa de una

serie de factores sobre la exactitud de los resultados obtenidos<sup>192</sup>, y de la necesidad de diagnosticar correctamente aquellos pequeños incrementos de tHcy que se traducen en cambios importantes del riesgo cardiovascular<sup>193</sup> o nos aportan pistas valiosas para el esclarecimiento de las etiopatogénias de diversas enfermedades<sup>194</sup>.

A diferencia de otras magnitudes bioquímicas como el colesterol o la glucemia, la determinación de la tHcy no está ni mucho menos tan estandarizada. Así, las muestras se recogen en tubos con una gama de anticoagulantes que variará según el método analítico que se vaya a utilizar. La mayoría de las técnicas permiten el uso de EDTA o heparina a las concentraciones habituales de los tubos con sistemas de vacío que se suelen utilizar para su recogida<sup>104</sup>.

Tras su extracción, los elementos formes de la sangre liberan Hcy al plasma de forma directamente proporcional a la temperatura y al tiempo transcurrido antes del procesamiento de las muestras, esto es, las concentraciones de tHcy aumentan a razón de un 10% por hora a temperatura ambiente, e incluso se ha documentado un aumento de las mismas a 4° C<sup>195</sup>. Este fenómeno hace desaconsejable para algunos autores la determinación de tHcy en suero, ya que la concentración de esta magnitud aumentaría en un 5-10% durante el tiempo que se requiere para la formación del coágulo antes de proceder a la centrifugación de la muestra con el fin de separar el suero restante<sup>104</sup>. Además, este incremento *ex vivo* no depende de las concentraciones de tHcy en la muestra<sup>192</sup>, lo que tiende a igualar las concentraciones de tHcy en todos los especímenes que se han procesado tras un periodo más o menos prolongado a temperatura ambiente<sup>196</sup>. El aumento de tHcy *ex vivo* se puede soslayar mediante la colocación de los tubos sobre hielo y su centrifugación lo antes posible (siempre dentro de la primera hora tras su extracción)<sup>195</sup>. Si no se puede proceder de esta forma, tal y como ocurre en extracciones fuera del hospital o en el caso de estudios epidemiológicos, se puede recurrir al uso de estabilizadores como el fluoruro sódico<sup>197</sup>, el citrato ácido<sup>198</sup> o la 3-deazaadenosina<sup>199-200</sup>. También se ha propuesto la medición de tHcy en sangre total recogida en tubos con EDTA tras hemolizar sus elementos formes, puesto que la concentración de Hcy intraeritrocitaria es muy baja<sup>201</sup>, aunque esta estrategia requiere la elaboración de nuevos intervalos de referencia. Como se describieron diferencias significativas entre los niveles de tHcy obtenidos tras la adición de fluoruro sódico<sup>202</sup> y citrato ácido<sup>198,203</sup> con respecto a la determinación plasmática tras conservación de la muestra en hielo y centrifugación antes de una hora, nuestro grupo optó por escrutar los resultados obtenidos con la 3-deazaadenosina<sup>204</sup>. Propusimos un estudio en el que se compararon los niveles de tHcy en las muestras de 24 participantes sanos recogidas en dos tubos Vacutainer® (Beckton-Dickinson, NJ, EE.UU.) con 1,8 g/L EDTA-K<sub>3</sub>. Uno de ellos, fue colocado inmediatamente en baño de hielo y centrifugado durante cinco minutos a 1200g y a 0°C antes de que transcurriera una hora desde la extracción y se obtuvo una parte alícuota que se congeló a -80°C (concentración de referencia). Al otro, se le añadió 3-deazaadenosina (D-8296, Sigma-Aldrich Corporation, MO, EE.UU.), a una concentración final de 50 µmol/L y se realizaron inmediatamente seis partes alícuotas. Tres se mantuvieron durante una, cuatro y seis horas respectivamente a temperatura ambiente y las otras tres se mantuvieron durante análogos lapsos de tiempo a 37°C. Transcurrido este tiempo se centrifugaron durante cinco minutos a 1200g y también se congelaron a -80°C hasta la cuantificación de tHcy. La tHcy plasmática se determinó mediante el inmunoensayo de fluorescencia polarizada o fluorescence polarized

immunoassay (FPIA), en el autoanalizador IMx (Abbott Laboratories, Diagnostics Division, IL, EE.UU.)<sup>205</sup>. Todas las determinaciones, una vez descongeladas las muestras, fueron realizadas en la misma serie analítica. Los resultados de este estudio se resumen en la tabla 12.7 y en la figura 12.2. Como se puede observar, no hay diferencias significativas con respecto a la concentración de referencia en los niveles de tHcy de las muestras mantenidas a temperatura ambiente y sí en las muestras mantenidas a 37°C a partir de cuatro horas sin centrifugar.

**Tabla 12.7.- Efecto de la 3-deazaadenosina a concentraciones finales de 50 µmol/L en partes alícuotas de sangre total sobre los niveles de homocisteína total plasmática (µmol/L) en función de la temperatura y del tiempo transcurridos antes de su centrifugación (estudio propio<sup>204</sup>).**

	Referencia <sup>c</sup>	25° C (temperatura ambiente)			37° C		
		1 hora	4 horas	6 horas	1 hora	4 horas	6 horas
Concentraciones <sup>a</sup>	8,65 ± 8,35	8,47 ± 8,20	8,60 ± 8,48	8,76 ± 8,32	8,80 ± 8,64	<b>9,81 ± 8,93*</b>	<b>10,0 ± 8,9**</b>
Descenso <sup>b</sup>		0,19 (-0,14-0,52)	0,06 (-0,38-0,50)	-0,10 (-0,7-0,49)	-0,14 (-0,59-0,3)	<b>-1,16 (-1,99- -0,32)</b>	<b>-1,34 (-2,05- -0,63)</b>
Coefficiente de Pearson		<b>0,996***</b>	<b>0,992***</b>	<b>0,986***</b>	<b>0,993***</b>	<b>0,976***</b>	<b>0,983***</b>

<sup>a</sup> Media ± desviación estándar.

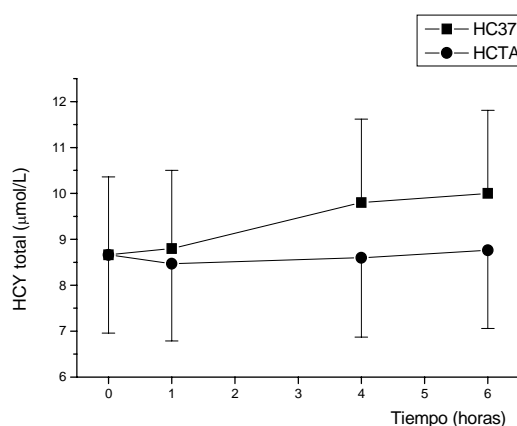
<sup>b</sup> Media (intervalo de confianza del 95%).

<sup>c</sup> Muestra centrifugada antes de una hora postextracción.

\* p=0,009, \*\* p=0,001, \*\*\* p<0,001.

Los valores estadísticamente significativos se han destacado en negrita.

**Figura 12.2.- Cambios de la concentración de homocisteína total plasmática según el tiempo transcurrido y la temperatura de exposición previos a la centrifugación en partes alícuotas de sangre total a las que se agregó 3-deazaadenosina a una concentración final de 50 µmol/L (estudio propio<sup>204</sup>).**



Los círculos (●) simbolizan las medias de las concentraciones de las partes alícuotas mantenidas a temperatura ambiente (25°C) y los cuadrados (■) las medias de las concentraciones de las expuestas a 37° C. Las barras verticales representan los errores estándar de las medias.

Al iniciar el trabajo expuesto en el próximo capítulo aparecieron distintas investigaciones sobre la inconveniencia de usar este estabilizador si se usaba la FPIA<sup>206-7</sup>, puesto que la 3-deazaadenosina inhibe competitivamente la S-adenosil-L-

Hcy (SAH) hidrolasa o adenosilhomocisteinasa<sup>199</sup>, y la FPIA cuantifica la Hcy tras convertirla en SAH mediante la mencionada enzima<sup>205</sup>. Dawling documentó la interferencia entre el uso de 3-deazaadenosina y la medición de tHcy por FPIA en un pool de plasma, y observó un descenso significativo en las concentraciones de tHcy a partir de concentraciones de 100 o más  $\mu\text{mol/L}$  de estabilizador<sup>207</sup>. Pensamos que no se pueden aplicar los resultados de estos hallazgos a nuestro experimento, ya que Dawling añadió 3-deazaadenosina al plasma y nosotros a la sangre total. De hecho, es fundamental que este estabilizador se mezcle necesariamente con sangre total (contiene eritrocitos) si pretendemos preservar los niveles de tHcy de las muestras y no sólo con el plasma (sin eritrocitos). Por otra parte, Woltersdorf y cols. añadieron 3-deazaadenosina hasta alcanzar una concentración final de 100  $\mu\text{mol/L}$  en las muestras de sangre total obtenidas de 11 individuos sanos y hallaron una reducción media significativa del 8,8% de los niveles de tHcy con respecto a los controles. Además la adición a cinco partes alícuotas provenientes de una de las muestras de sangre incluidas en el estudio de cantidades crecientes de 3-deazaadenosina (concentraciones finales de 0, 10, 50, 100 y 1000  $\mu\text{mol/L}$ ) mostró un descenso progresivo en las concentraciones de tHcy plasmática medidas con el inmunoensayo de Abbott. Destacamos, sin embargo, que en esta investigación no se especifica ni la duración de la exposición a la 3-deazaadenosina, ni la temperatura a la que permanecieron las muestras antes de su centrifugación<sup>206</sup>.

Con el fin de descartar definitivamente la existencia de interferencia metodológica relevante con la FPIA, se recogieron 12 muestras de sangre adicionales en tubos Vacutainer® con 1,8 g/L de EDTA-K<sub>3</sub> y se obtuvieron dos partes alícuotas de cada una de ellas, una con una concentración final de 50  $\mu\text{mol/L}$  de 3-deazaadenosina y otra con un volumen equivalente de suero fisiológico, que fueron centrifugadas inmediatamente tras su extracción y congeladas (manejo análogo a las otras muestras). Las diferencias entre los valores de ambas series de datos no fueron significativas ( $p=0,104$ ) y los niveles medios fueron de 7,32 y 7,11  $\mu\text{mol/L}$  para las muestras sin estabilizador y para las muestras con él, respectivamente, o lo que es lo mismo, se objetivó un descenso medio de 0,21  $\mu\text{mol/L}$  con un intervalo de confianza del 95% que oscila entre 0,47 y -0,05  $\mu\text{mol/L}$ . Ello se traduce en un descenso porcentual medio del 2,9% sobre la media de los controles que en el peor de los casos (extremo superior del intervalo de confianza) sería del 6,4%. Estas cifras de descenso nos parecen irrelevantes si las comparamos con el CV intraindividual de la tHcy (ver más adelante).

Como consecuencia de lo anterior, pensamos que nuestras conclusiones respaldan el uso de este estabilizador en todas las muestras destinadas a la determinación de tHcy y escrutadas en el capítulo 13. Las muestras se extrajeron entre las ocho y las nueve horas de la mañana y se centrifugaron a las cuatro horas de su obtención, aproximadamente. Se usaron bolsas de hielo para su refrigeración durante el transporte en verano.

Las concentraciones de tHcy se mantienen en plasma conservado a temperatura ambiente hasta cuatro días después de la extracción de la muestra<sup>192</sup>. La estabilidad de la tHcy se prolonga durante varias semanas si la temperatura baja a 0°-2°C<sup>108</sup> y durante varios meses e incluso años si congelamos las muestras a -20°C<sup>208</sup>. Además, la congelación y la descongelación repetidas de la muestra no afectan los niveles de



tHcy<sup>208-9</sup>.

El volumen requerido para la mayoría de los métodos oscila entre 50 y 150  $\mu\text{L}$  de plasma, aunque para los inmunoensayos sólo hacen falta 25  $\mu\text{L}$ <sup>104</sup>.

## **12.3.4.2 Consideraciones generales sobre los procedimientos de medida de la homocisteína**

### **12.3.4.2.1 Reducción de los enlaces disulfuro**

Todos los métodos que miden la tHcy requieren la reducción previa de los enlaces disulfuro, lo cual facilita su medición<sup>108</sup>. Para este propósito se han utilizado agentes azufrados como el DTT, la tri-n-butilfosfina, o la tri-n-alkilfosfina (TAP) entre otros. No existe el agente reductor ideal, ya que todos tienen algún inconveniente. La TAP tiene que disolverse previamente en dimetilformamida<sup>104</sup>. Los agentes azufrados pueden competir con la Hcy al entrar en contacto con los reactivos utilizados para la derivatización (próximo apartado).

### **12.3.4.2.2 Derivatización de la homocisteína**

Los tres grupos reactivos de la Hcy (amino, carboxilo y sulfhidrilo) se ligan a marcadores fluorescentes si usamos cromatografía en fase líquida de alta resolución (HPLC) con detector fluorimétrico<sup>104</sup>.

### **12.3.4.2.3 Codeterminación de otros aminotioles**

La codeterminación de otros aminoácidos y péptidos azufrados que participan en el ciclo de la Hcy tales como la cisteína, la metionina, o el glutatión constituyen una opción de la HPLC<sup>108</sup>, que nos permite detectar eventuales defectos enzimáticos y formular hipótesis patogénicas en la investigación de las enfermedades supuestamente relacionadas con una alteración del metabolismo de la Hcy.

## **12.3.4.3 Cromatografía en fase líquida de alta resolución**

### **12.3.4.3.1 Fundamentos<sup>210-1</sup>**

La cromatografía es una técnica de separación que distribuye los componentes que se han de aislar en dos fases inmiscibles: una fija o estacionaria y otra móvil. En

nuestro caso, la fase estacionaria es sólida y se deposita en un tubo (columna cromatográfica) y la móvil es líquida. La cromatografía en fase líquida de alta resolución, o de alta eficacia, o high performance liquid chromatography es un caso particular de la cromatografía, en el que la introducción de una presión externa acelera el proceso de separación y mejora su calidad. Por consiguiente, el procedimiento consiste en hacer pasar una fase móvil líquida, constituida por un disolvente adecuado y la muestra, a alta presión a través de una columna que contiene la fase estacionaria. A causa de la distinta interacción de la muestra con cada una de las fases, los componentes se retienen con mayor o menor intensidad y eluyen (salen por arrastre) separados de la columna. Se analiza directamente el eluyente de la columna mediante un detector (de fluorescencia en esta tesis), lo cual permite el registro de una serie de picos pertenecientes a las distintas fracciones o cromatograma. La concentración de cada componente se conoce a partir del área o de la altura de los picos.

Los principales componentes de un equipo de HPLC son: una fuente de solvente, un sistema de bombas de alta presión que introducen solvente a una velocidad de flujo concreta y continuamente, un sistema de inyección de la muestra en la columna, la columna, el detector y el registrador o integrador de fracciones que calcula los resultados obtenidos.

Para la cuantificación de aminotioles hemos utilizado la cromatografía en fase reversa que permite separar las moléculas de acuerdo con su polaridad. La fase estacionaria contiene grupos funcionales apolares, entre cuyos componentes posibles destaca el octadecilsilano o cadena hidrocarbonada de 18 átomos de carbono unidos a partículas de sílice (C<sub>18</sub>). Como las moléculas interactúan entre sí si su polaridad es similar, las moléculas que contienen una pequeña área no polar interactúan débilmente con la fase estacionaria y se eluyen rápidamente de la columna, mientras que si el área apolar es más grande interactúan fuertemente con la fase estacionaria y no se pueden eluir con agua.

Si pretendemos separar una mezcla de componentes de polaridades muy diferentes precisaremos eluir por gradiente, esto es, variar paulatinamente la polaridad de la fase móvil según un gradiente creciente o decreciente de polaridad. La adición al agua de un solvente menos polar como el metanol o el acetonitrilo de forma gradual y a concentraciones crecientes permite una gran resolución en la separación de los aminoácidos, al promover la competición entre las fases móvil y estacionaria para atraer hacia sí la porción menos polar de la molécula. En definitiva, las moléculas polares son las primeras eluidas y las no polares las últimas.

Al contrario, si los componentes que deseamos cuantificar tienen polaridades similares, tal es el caso que nos ocupa, es suficiente con un sistema isocrático (fase móvil con solventes que se mantienen en proporciones fijas durante el análisis).

### **12.3.4.3.2 Procedimiento**

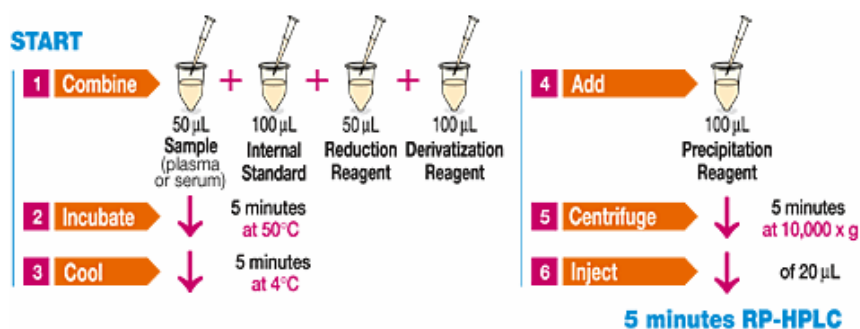
El kit de reactivos de HPLC de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) para la medición de la tHcy usa la TAP como agente reductor y derivatiza con ABD-F (ácido 4-amino-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol sulfónico)<sup>212-3</sup>.

El procedimiento consta de los pasos siguientes (figura 12.3)<sup>212-3</sup>:

- Mezcla de 50  $\mu\text{L}$  de la muestra, con 100  $\mu\text{L}$  del estándar interno, 50  $\mu\text{L}$  de TAP y 100  $\mu\text{L}$  de ABD-F.
- Incubación a 50°C durante cinco minutos y después a 4°C durante otros cinco minutos.
- Precipitación de las proteínas plasmáticas con ácido tricloroacético.
- Centrifugación de la mezcla a 10 000g durante cinco minutos para separar el sobrenadante.
- Inyección de 20  $\mu\text{L}$  de la solución en el sistema cromatográfico.

Este procedimiento automatizado de HPLC usa un sistema isocrático y tiene un rendimiento de una muestra cada 20 minutos según el fabricante.

**Figura 12.3.- Protocolo del ensayo HPLC para la determinación de aminotioles con el kit Bio-Rad.**

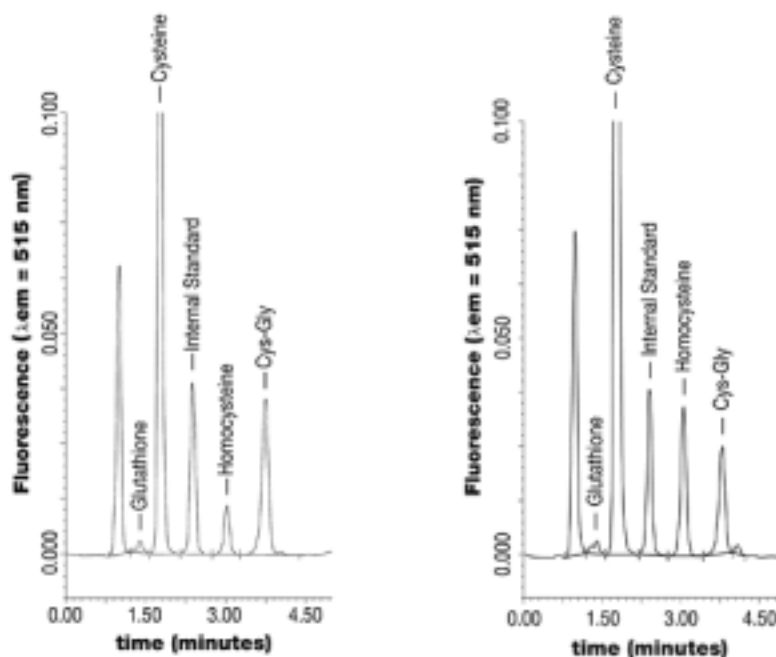


HPLC (high performance liquid chromatography), combine (añadir), sample (muestra), serum (suero), internal standard (estándar interno), reduction reagent (reactivo reductor), derivatization reagent (reactivo para derivatizar), incubate (incubar), cool (enfriar), add (añadir), precipitation reagent (reactivo precipitador), centrifuge (centrifugar), inject (inyectar), RP-HPLC (HPLC en fase reversa).

Nuestro sistema cromatográfico incluyó la columna Novapack C18, la bomba Waters 600-E, el Waters 474 scanning fluorescence detector (detector fluorimétrico) y, por último, el Millennium 2010 Chromatography Manager que se encarga de la adquisición y cuantificación de los datos (todo de Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.). Las longitudes de onda necesarias para la detección de los tioles marcados con ABD-F fueron de 385 nm para la excitación y 515 nm para la emisión, respectivamente.

Los picos cromatográficos detectados con el kit de Bio-Rad se aprecian en la figura 12.4<sup>212</sup>.

**Figura 12.4.- Cromatogramas correspondientes a dos muestras con concentraciones de homocisteína total normal (izquierda) y elevada (derecha) obtenidos con el kit Bio-Rad.**



Fluorescence ( $\lambda_{em}=515$  nm) (fluorescencia ( $\lambda$  de emisión de 515 nm)), time (minutes) (tiempo en minutos), glutathione (glutatión), cysteine (cisteína), internal standard (estándar interno), homocysteine (homocisteína), Cys-Gly (cisteinglicina).

### 12.3.4.3.3 Evaluación

Dias y cols.<sup>214</sup> evaluaron el kit de Bio-Rad y lo compararon con otro ensayo de fluorescencia que utiliza el SBD-F (ácido amonio-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol-4-sulfónico) como marcador y con un enzoinmunoensayo (Axis Biochemicals, Oslo, Noruega). Los resultados se especifican a continuación:

- ◆ Imprecisión: el ensayo de Bio-Rad obtuvo para las muestras de dos controles (7,6 y 23,1  $\mu\text{mol/L}$  de tHcy respectivamente) analizadas por duplicado diariamente durante 21 días, los CVs intra e interseriales de 3,5% y 6,2% para la concentración más baja; y de 5,7% y 4,9% para la más alta, mientras que la imprecisión analítica total fue del 7,1%.
- ◆ Correlación entre procedimientos: se analizaron duplicados de muestras de 95 pacientes cuyas enfermedades de base se asociaban a hiperhomocisteinemia en dos días separados, y las diferencias medias fueron de 1,02 (ABD-F), 1,16 (SBD-F) y 2,12  $\mu\text{mol/L}$  (enzoinmunoensayo). Si  $x$  es la concentración medida con el ensayo con SBD-F e  $y$  la medida con el kit Bio-Rad, la ecuación de la recta fue  $y=0,89x-3,1$ , mientras que el valor de  $r$  fue de 0,98. El sesgo intermétodos se valoró por medio de la comparación de las medias de los resultados antedichos obtenidos con cada método por separado con la media de todos los resultados juntos, y las diferencias calculadas fueron: -2,5 ( $p<0,001$ ) para ABD-F, 2,6 para SBD-F ( $p<0,001$ ) y -0,1  $\mu\text{mol/L}$  para el enzoinmunoensayo.

- ◆ Calibradores: los del kit Bio-Rad generaron concentraciones más altas con los métodos inmunoenzimáticos y con SBD-F, y viceversa.
- ◆ Estudio de recuperación: las recuperaciones medias oscilaron entre 83% y 101% para concentraciones de tHcy entre 0,5 y 100  $\mu\text{mol/L}$ .
- ◆ Amplitud de linealidad: se escrutó mediante la dilución seriada con el Bio-Rad Assay Reconstitution Buffer a partir de un pool de plasma de pacientes con altas concentraciones de tHcy. La linealidad se mantuvo a lo largo del intervalo de concentración que va desde 0,5 a 100  $\mu\text{mol/L}$  ( $r=0,99$ ; ecuación de la recta de regresión  $y=1,03x-0,68$ ,  $x$  es el valor esperado e  $y$  el observado).
- ◆ Intervalos de referencia: se establecieron para las poblaciones masculina y femenina sanas. Se observó que sus límites se correspondían con los obtenidos por el método que utiliza SBD-F de Araki y Sako<sup>215</sup>, pionero en la determinación de tHcy por medio de la HPLC.

En definitiva, las conclusiones de la evaluación del kit de Bio-Rad son:

- a) Simplificación y rapidez en los pasos correspondientes a la reducción y derivatización (la TAP es más hidrosoluble que la tri-n-butilfosfina y el ABD-F reacciona con los tioles 30 veces más rápido que el SBD-F).
- b) Los valores más bajos de los CVs interseriales con respecto al método HPLC SBD-F son consecuencia de una mayor automatización de este procedimiento.
- c) Las diferencias observadas entre los calibradores utilizados con las técnicas escrutadas introducen un sesgo intermétodos que se podría soslayar mediante el uso de un calibrador estandarizado, preparado con D,L-homocistina. La D,L homocistina se dispensa muy pura, con muy poca variación entre lotes y una mayor estabilidad en plasma que la forma reducida.
- d) El sesgo intermétodos significativo y negativo del kit Bio-Rad con respecto a los otros dos métodos evaluados puede ser importante para la detección de pequeños aumentos de tHcy.

## 12.3.4.4 Inmunoensayo de fluorescencia polarizada<sup>205</sup>

### 12.3.4.4.1 Fundamentos

La FPIA es un inmunoensayo útil para el análisis de moléculas pequeñas mediante polarización (modificación de los rayos luminosos por medio de la refracción o reflexión, de tal manera que queden incapaces de refractarse o reflejarse de nuevo en ciertas direcciones) y marcado de las moléculas con agentes fluorescentes. Este ensayo utiliza una técnica indirecta para medir la tHcy, puesto que introduce un anticuerpo contra la SAH y no contra la Hcy, estrategia que evita el tener que producir un anticuerpo que sea capaz de discriminar la L-Hcy de otros aminoácidos química-

mente similares como la L-metionina y la L-cisteína, habitualmente presentes en concentraciones muy superiores. La Hcy, liberada de sus puentes disulfuro por el agente reductor DTT, se convierte en SAH tras la adición de adenosina y la acción de la enzima SAH hidrolasa<sup>207</sup>. La SAH se incuba con el anticuerpo anti-SAH y después con SAH marcada con un trazador fluorescente (S-adenosil-L-cisteína-6-carboxifluoresceín amida). Al atravesar la luz polarizada las muestras, el grado de despolarización es inversamente proporcional a la cantidad de SAH fluorescente unida al anticuerpo.

Las ventajas de este método residen en su automatización y su alto rendimiento (20 muestras por hora).

### 12.3.4.4.2 Procedimiento

Este método ha sido desarrollado por los Laboratorios Abbott (Abbott Park, IL, EE.UU.) y utiliza el analizador IMx®. Los Laboratorios Abbott dispensan el analizador IMx®, los pocillos y los cartuchos desechables que se utilizan para el procesamiento de la muestra, la solución tampón, el anticuerpo monoclonal anti-SAH (4-481-244) y la SAH marcada con un trazador fluorescente. La hidrolasa de la SAH es de origen bovino y se obtiene mediante los procedimientos habituales de purificación proteica seguidos de cromatografía de afinidad sobre agarosa y azul dextrano<sup>216</sup>.

Los pasos que se precisan para la realización del ensayo son<sup>205</sup>:

1. Realización de la curva de calibración: se cargan aproximadamente 70  $\mu\text{L}$  de cada uno de los seis calibradores por duplicado dentro del mismo tipo de tubos en los que más tarde se cargan las muestras.
2. El brazo automatizado del analizador pipetea y mezcla en el pocillo de la reacción 25  $\mu\text{L}$  del calibrador; 25  $\mu\text{L}$  de una solución que contiene adenosina (200  $\mu\text{mol/L}$ ) y DTT (10  $\text{mmol/L}$ ); 60  $\mu\text{L}$  de hidrolasa de la SAH; y 70  $\mu\text{L}$  de tampón.
3. Incubación a 34°C durante 30 minutos.
4. Se transfieren a la cubeta de la reacción 23  $\mu\text{L}$  de la mezcla de la reacción y 65  $\mu\text{L}$  de la solución con el anticuerpo monoclonal murino y se mezclan con la solución tampón hasta completar 1 mL de volumen.
5. Incubación durante diez minutos.
6. Lectura de base con el detector de fluorescencia para tener un valor de referencia con el que comparar la lectura ulterior.
7. Se mezclan 85  $\mu\text{L}$  de la solución con la SAH fluorescente, una segunda parte alícuota de 23  $\mu\text{L}$  de la mezcla de la reacción, y el volumen necesario de la solución tampón hasta completar 2 mL.
8. Nueva lectura con el detector de fluorescencia transcurridos diez minutos.
9. El microprocesador calcula la polarización en mP, la corrige según la lectura de base y realiza una curva de calibración a partir de los valores obtenidos por los seis calibradores por medio de la fórmula de una curva logarítmica que se basa en cuatro parámetros. La curva almacenada en este microprocesador se utiliza para el cálculo de las concentraciones de tHcy de las muestras procesadas en el primer ciclo o en ciclos posteriores.

10. Una vez que se ha construido la curva de calibración, las muestras problema toman el lugar de los calibradores.

### 12.3.4.4.3 Evaluación

Shipchandler y cols. fueron los primeros a los que se les aceptó una evaluación independiente de la FPIA para su publicación<sup>205</sup> y obtuvieron los siguientes resultados:

- Imprecisión: los CVs intraensayo se obtuvieron tras la medición de los calibradores por triplicado en el mismo carrusel y la repetición de esta maniobra otras tres veces para conocer los CVs interensayo. La amplitud para los CVs intraensayo fue de 0,0-8,0% y para los interensayo fue de 0,0-6,4%.
- Precisión: se escrutó por medio de la medición de seis muestras de plasma en tres instrumentos IMx distintos diariamente durante cinco días y los valores para los CVs oscilaron entre 5,7% para 11,9  $\mu\text{mol/L}$  y 10,2% para 5,0  $\mu\text{mol/L}$  (n=15).
- Estabilidad de la curva de calibración: se realizó una curva por medio del análisis por duplicado de los seis calibradores en los días 0, 4, 9, 13 y 16. La amplitud de los CVs estuvo entre 0,4% y 1,7%. Por consiguiente, la curva de calibración es estable durante dos semanas, lo cual hace innecesaria la calibración frecuente del equipo.
- Correlación entre procedimientos: la comparación con tres métodos de HPLC y GC-MS generó valores de r entre 0,980 y 0,997, con pendientes entre 1,030 y 1,493.
- Estudio de recuperación: la recuperación media de la Hcy añadida a dos muestras de sangre fue 97,1% y 99,9%.
- Reactividad cruzada: no se objetivó ni con L-cisteína ni con L-metionina.

Tras el primer estudio, los Laboratorios Abbott promovieron el uso de su método por distintos laboratorios europeos y la imprecisión total en 21 centros osciló entre 2,3% y 3,3% (CVs) según el fabricante<sup>217</sup>. Otros estudios independientes que han evaluado este método también han mostrado resultados favorables<sup>218-21</sup>.

### 12.3.4.5 Cuantificación de la homocisteína total: ¿HPLC TAP/ABD-F o FPIA?

Pfeiffer y cols.<sup>222</sup> coordinaron un estudio internacional sobre la medición de tHcy plasmática que incluyó 14 laboratorios. Para este propósito los participantes analizaron pools de plasma con concentraciones de tHcy de 6,9, 13,4 y 28,6  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente. El método de referencia utilizado fue la GC-MS, puesto que su calidad metrológica es muy alta. El kit de Bio-Rad se situó entre los métodos con ma-

yor desacuerdo con respecto al método de referencia, y la FPIA entre los procedimientos cuyos valores eran más concordantes. La imprecisión analítica alcanzó en el caso de la FPIA los niveles mínimos establecidos por Fraser y cols.<sup>223</sup> (próxima sección), mientras que ello no ocurrió con el kit de Bio-Rad. Los laboratorios de este estudio que utilizaron la FPIA obtuvieron resultados concordantes entre sí y con la mayoría de los otros métodos escrutados en este estudio. En resumen, este estudio evalúa más favorablemente la FPIA que el kit de Bio-Rad. Como veremos, en esta tesis se han utilizado estos dos procedimientos de medida con el fin de corroborar nuestros resultados.

## 12.4 Evaluación de los métodos analíticos utilizados en esta tesis

Fraser y cols. han fijado unas metas de calidad para cada magnitud analítica de acuerdo con su variabilidad biológica<sup>223</sup> (tabla 12.8), o sea los CVs intraindividuales e interindividuales. Como cada una de las técnicas manejadas en esta tesis se realizan en un mismo laboratorio, prescindimos de la variabilidad interindividual, básica para la valoración del sesgo analítico interlaboratorios.

Los valores de los CVs intraindividuales de la tHcy se han obtenido a partir de estudios que han escrutado la variabilidad a corto plazo de la medición de la tHcy (tabla 12.9). Todos incluyen sujetos sanos<sup>107,113,224-5</sup>, pero la permisividad con respecto al consumo de suplementos vitamínicos y la ingesta previa a la obtención de las muestras es variable. Los CVs intraindividuales van del 7%<sup>113</sup> al 9,4%<sup>224</sup>. En el estudio de Rasmussen y cols. se escrutan los diferentes CVs antes y después del uso de suplementos con 0,4 mg diarios de ácido fólico, no hallándose cambio significativo de los CVs<sup>107</sup>.

**Tabla 12.8.- Objetivos de calidad para la imprecisión analítica.**

	<b>Imprecisión</b>
<i>Óptimo</i>	0,25 * CV <sub>WP</sub>
<i>Deseable</i>	0,50 * CV <sub>WP</sub>
<i>Mínimo</i>	0,75 * CV <sub>WP</sub>

CV<sub>WP</sub> (coeficiente de variación intraindividual).



**Tabla 12.9.- Variabilidad a corto plazo de las mediciones de homocisteína total plasmática.**

<i>Estudio</i>	<i>Método</i>	<i>Participantes</i>				<i>CV<sub>SWP</sub></i> (%)
		<i>Nº</i>	<i>Rango edad</i>	<i>Muestras/participante</i>	<i>Intervalo flebotomías</i>	
<i>Garg y cols.</i> <sup>113</sup>	HPLC	20	21-65	4	Semanal	7,0
<i>Cobbaert y cols.</i> <sup>a,224</sup>	HPLC	54	21-46	4	Quincenal	9,4
<i>Rasmussen y cols.</i> <sup>b,107</sup>	Ensayo de dilución basado en isótopos estables	24	28-63	4	0-1-3-4 semanas	8,1/8,4
<i>Rossi y cols.</i> <sup>c,225</sup>	HPLC	20	27-77	4	Semanal	8,3

CVs (coeficientes de variación), WP (intraindividual o within-person), HPLC (high performance liquid chromatography).

Las determinaciones se realizaron en sujetos sanos en ayunas, salvo en el estudio de Rasmussen.

<sup>a</sup> Se permitió el consumo de suplementos vitamínicos, tranquilizantes menores, y aspirina/paracetamol ocasionales.

<sup>b</sup> Flebotomía 2 horas tras un desayuno continental. Valores de CVs antes (muestras obtenidas a las 0 y 1 semanas) y después de suplementar con 0,4 mg/día de ácido fólico durante 3 semanas (muestras obtenidas a las 3 y 4 semanas).

<sup>c</sup> No hubo entre los participantes ni cambios de dieta, ni de hábitos de vida; ausencia de suplementos vitamínicos.

La SEQC (Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Biología Molecular) ha difundido los valores de las especificaciones de calidad para la mayoría de magnitudes solicitadas en la práctica clínica<sup>226</sup>. Para ello, ha utilizado los datos de variabilidad biológica expuestos anteriormente y otros obtenidos también a partir de la bibliografía y de tesis doctorales. En la tabla 12.10 se detallan los objetivos de imprecisión de la SEQC para algunas de las magnitudes analíticas determinadas en esta tesis.

Møller y Rasmussen<sup>227</sup> también han calculado los valores de las especificaciones de calidad para las mediciones de tHcy, según las directrices de Fraser y cols.<sup>223</sup> y sus valores para la imprecisión son: 2% (óptimo), 4% (deseable) y 6% (mínimo), esto es, más estrictos que los de la SEQC.

**Tabla 12.10.- Objetivos de imprecisión analítica para las mediciones de folato, cobalamina y homocisteína total.**

<b>Magnitud analítica</b>	<b>CV<sub>WP</sub></b>	<b>Imprecisión</b>		
		<b>Óptima</b>	<b>Deseable</b>	<b>Mínima</b>
<i>Folato sérico</i>	24,0%	6,0%	12,0%	18,0%
<i>Cobalamina sérica</i>	5,2%	1,3%	2,6%	3,9%
<i>tHcy plasmática</i>	9,0%	2,3%	4,5%	6,9%

CV<sub>WP</sub> (coeficiente de variación intraindividual).

Hemos comparado los objetivos de calidad antedichos con los datos suministrados por el fabricante del kit Simultrac-SNB<sup>99</sup> y con los procedentes de las evalua-

ciones independientes del kit de Bio-Rad<sup>214</sup> y de la FPIA<sup>205</sup>. El CV total correspondiente a la imprecisión analítica se ha calculado según la fórmula matemática  $[CV^2_{\text{intraensayo}} + CV^2_{\text{interensayo}}]^{0,5}$ . Así, la determinación de los niveles de folato sérico con el kit Simultrac-SNB tiene una imprecisión máxima del 14,5% que corresponde a los controles de concentraciones más bajas y una mínima del 8,2% que corresponde a los de concentraciones más altas, por consiguiente, estos valores caen dentro de los límites recomendados en las especificaciones de calidad mínimas y, salvo el valor máximo, están dentro de los objetivos de calidad deseables. La cuantificación de cobalamina ofrece unos valores de CV total que oscilan entre 16,6% y 7,1%, cifras ambas que distan bastante de los objetivos mínimos de imprecisión para esta magnitud. La determinación de tHcy se acerca a las especificaciones mínimas de calidad para los dos métodos utilizados. En el caso de la FPIA, el CV total oscila entre 0% y 9,1%, mientras que para la HPLC los valores para los controles proporcionados por Bio-Rad con concentraciones de 7,6  $\mu\text{mol/L}$  y 23,1  $\mu\text{mol/L}$  son de 7,1% y 7,5% respectivamente.

## 12.5 Variabilidad biológica de la cisteína

La cisteína se asocia con el género<sup>228</sup> y con la ingesta proteica<sup>135</sup> del mismo modo que la Hcy. También se ve influida por los cambios del índice de Quetelet y, en los individuos de mediana edad, por las variaciones de los niveles de colesterol y de la tensión arterial diastólica<sup>229</sup>. La hiperfiltración explica los niveles más bajos de cisteína en diabéticos con nefropatía<sup>117</sup>, mientras que un índice de filtración deprimido incrementa sus concentraciones<sup>148</sup>. Por último, no parece que la cisteína se relacione ni con el status de folatos, ni de cobalamina, ni de piridoxina<sup>230</sup>.

## 12.6 Escrutinio del polimorfismo C677T

### 12.6.1 El polimorfismo C677T

Este polimorfismo corresponde a una mutación puntual (cambio de citosina por timina) en el nucleótido 677 de la enzima MTHFR (apartado 10.5.2.1.1). Sus características y vínculo con los DTNs se pueden consultar en el capítulo 10.

### 12.6.2 Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa<sup>231</sup>

La reacción en cadena de la polimerasa, más popularmente conocida como “polymerase chain reaction” (PCR) es un método de replicación enzimática de una secuencia determinada de ADN. Esta técnica utiliza cebadores (primers en inglés), esto es, secuencias cortas de nucleótidos sintéticos (de 15 a 30 bases) que se hibridan de forma específica con cada una de las dos cadenas complementarias de ADN de la muestra, en las zonas que flanquean la secuencia de interés. Para que el método consiga sus objetivos es prioritario un buen diseño de los cebadores, esto es, que no contengan zonas de más de dos bases de longitud que sean complementarias entre sí, especialmente en sus extremos 3', de lo contrario podrían formarse dímeros entre ellos. Además, no deben poseer estructura secundaria, ni contener secuencias largas formadas por una sola base, y su contenido en citosina y guanina debe oscilar entre un 40% y un 60%.

La reacción de amplificación del ADN se realiza en un volumen pequeño de solución (50-100  $\mu$ L) dentro de tubos de microcentrifugadora. La solución de la reacción contiene el ADN que se desea amplificar, los cebadores, la Taq polimerasa (enzima termoestable que polimeriza el ADN procedente del microorganismo *Thermus aquaticus*), los trifosfatos de los desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), y una solución amortiguadora o tampón con ion magnesio.

Es recomendable que la muestra problema contenga ADN lineal y exento de proteínas, con el fin de evitar la precipitación de las mismas por el calor. La concentración de los cuatro desoxirribonucleótidos en la solución de reacción suele ser similar y muy superior a la cantidad mínima estimada necesaria. Este exceso favorece su incorporación a las nuevas cadenas y la fidelidad en el copiado de la secuencia original o ADN molde. El ion magnesio interviene en el apareamiento de los cebadores, en la disociación del ADN molde de los productos de la reacción y en la actividad de la Taq polimerasa. Al contrario, el magnesio en exceso favorece la formación de productos no deseados con el consiguiente falseamiento de los resultados, mientras que si hay defecto de este ion no se obtiene el producto copiado.

Hay que calentar la solución para desnaturalizar la doble hélice de ADN, pero al enfriarse la solución, el ADN molde se hibrida primero con los cebadores y después con los cuatro desoxirribonucleótidos. En cada ciclo de calentamiento-

enfriamiento se forma una copia de cada cadena sencilla de ADN, y el número de copias se duplica cada vez que se repite el ciclo. Después de 20 a 30 ciclos sucesivos de desnaturalización, apareamiento y polimerización las cadenas de ADN molde iniciales se multiplican por  $2^{20}$ - $2^{30}$  veces (en general,  $2^n$ , siendo n el número de ciclos). En la práctica, el rendimiento de la técnica es inferior al valor teórico, fundamentalmente debido a propiedades intrínsecas de la cinética enzimática, estabilidad de los componentes, etc.

Al concluir la polimerización, disponemos de dos tipos de productos, unos cortos y otros largos. Los productos cortos contienen la secuencia de ADN problema y los largos son cadenas originales de ADN de la muestra sin extremos 3' definidos y que se han multiplicado de forma aritmética. Tras 30 ciclos la cantidad de productos largos es despreciable.

Los ciclos mencionados de desnaturalización, apareamiento (o hibridación o annealing) y polimerización (o extensión) han de ejecutarse según determinadas condiciones de duración y temperatura: la doble cadena de ADN se desnaturaliza a 90°-95°C entre 20 segundos y un minuto; los cebadores se hibridan a las secuencias de ADN molde a 40°-60°C entre 20 segundos y un minuto; la Taq polimerasa actúa a 70°-75°C entre 30 segundos y dos minutos. La duración de los lapsos de incubación está en función de la longitud del ADN amplificado. El paso de una temperatura a otra se producirá con mayor o menor rapidez según lo moderno que sea el equipo, pero en general, los cambios de temperatura se producen a una velocidad de 0,3°-1°C por segundo, ello se traduce en una duración aproximada de cinco minutos por ciclo. El proceso total de amplificación (20-30 ciclos) dura algo menos de tres horas. El aparato que se utiliza para este propósito es el termociclador. El sistema que es más fiable y versátil en la regulación de los cambios de temperatura es el basado en las resistencias eléctricas. La evaporación del material contenido en los tubos que introducimos en el termociclador se evita mediante la adición a la solución de la reacción de aceite mineral o glicerina. El método de refrigeración predominante en estos aparatos consiste en un circuito cerrado de líquido refrigerante.

La Taq polimerasa logra su actividad óptima a los 70°-75°C, aunque resiste temperaturas superiores a los 90°C, y mantiene su actividad enzimática después de la desnaturalización, lo que hace innecesaria su reposición en cada ciclo. Esta enzima amplifica fragmentos de hasta 10 000 bases a una velocidad de polimerización de 150 nucleótidos por segundo y molécula de enzima, además su probabilidad de error es muy baja. Si bien en los primeros ciclos el número de copias del ADN molde aumenta exponencialmente, tras un número determinado de ciclos su actividad llega a una meseta, por lo que el aumento del número de copias se obtiene a una velocidad inferior.

Esta técnica no está exenta de inconvenientes. Así, la especificidad no es total, esto es, no sólo se copia el ADN molde sino también otras secuencias no relacionadas. Este problema puede minimizarse aumentando la temperatura de hibridación o mediante reacciones de amplificación consecutivas (utilizando varios pares de cebadores). Otra limitación es la reasociación rápida de las dos cadenas del fragmento de ADN molde, lo cual impide el apareamiento de los cebadores. También, la Taq polimerasa puede incorporar al azar nucleótidos erróneos. In vitro se producen procesos de recombinación que generan mosaicos alélicos. Pero el principal problema de esta

técnica es su susceptibilidad a la contaminación con ADN exógeno. Ello es más frecuente si el material que se desea amplificar es escaso o está parcialmente degradado. En este contexto, se han de habilitar áreas independientes para la realización de la técnica, se debe usar material desechable, cámaras de flujo laminar, lámparas ultravioleta y autoclave para la esterilización del material no desechable. En cada estudio hay que utilizar un control positivo y otro negativo (agua bidestilada). En caso de que haya dudas sobre el resultado hay que repetir la técnica.

Si una mutación o polimorfismo crea o destruye un diana de restricción, ésta puede descubrirse fácilmente mediante la amplificación seguida de la digestión con la endonucleasa de restricción correspondiente. Ello constituye la base del análisis de longitud de los fragmentos de restricción de los polimorfismos, o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), un ejemplo del cual lo tenemos en el procedimiento utilizado en esta tesis para el escrutinio de la mutación puntual C677T.

### 12.6.3 Procedimiento

El protocolo que seguimos se basa en el descrito por Frosst y cols.<sup>232</sup>. Los pasos del mismo son: purificación del ADN, reacción en cadena por la polimerasa, digestión, lectura e interpretación de resultados.

#### 12.6.3.1 Purificación del ácido desoxirribonucleico

Utilizamos el Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI, EE.UU.) para muestras de sangre de 0,3 mL. La muestra se obtiene con sistemas Vacutainer® (Beckton-Dickinson, NJ, EE.UU.) y se almacena en tubos de la misma marca con el anticoagulante EDTA de 3 mL. El protocolo se especifica a continuación:

- ❑ Se agita suavemente el tubo Vacutainer® para homogeneizar su contenido.
- ❑ Se añaden 300 µL de sangre a un tubo estéril de microcentrifugadora de 1,5 mL que contiene 900 µL de Cell Lysis Solution (lisa eritrocitos). La mezcla se agita suavemente por inversión, ya que interesa mantener la integridad de las células sanguíneas nucleadas.
- ❑ Incubación de la mezcla durante diez minutos a 22°-24°C, invirtiendo el tubo cada tres-cinco minutos.
- ❑ Centrifugación a 13 000-16 000g durante 20 segundos. Una vez concluida esta maniobra, visualizaremos un sobrenadante rojizo constituido por hemoglobina y un pellet blanquecino de células nucleadas sanguíneas.
- ❑ Eliminar todo el sobrenadante posible con una pipeta Pasteur (el sobrenadante contiene mucha hemoglobina que puede interferir por ser de naturaleza proteica) sin tocar el pellet que suele estar suelto. El líquido residual que ha de quedar no debe sobrepasar los 20 µL.
- ❑ Vortear el tubo para resuspender las células blancas del pellet.
- ❑ Añadir 300 µL de Nuclei Lysis Solution (tampón más agresivo que la solu-

ción de lisis de eritrocitos) y mezclar mediante pipeteo o vórtex (contribuyen a lisar las células nucleadas). La mezcla es aparentemente acelular y muy viscosa.

- ❑ Añadir 100 µL de Protein Precipitation Solution (sales) y vortear. La presencia de grumos proteicos tras este proceso no es infrecuente.
- ❑ Centrifugación a 13 000-16 000g durante tres minutos a 22°-24°C. Se forma un pellet proteico marrón oscuro.
- ❑ Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo de microcentrifugadora de 1,5 mL al que le habremos añadido previamente 300 µL de isopropanol.
- ❑ Mezclar suavemente por inversión hasta visualizar la medusa de ADN.
- ❑ Eliminar el sobrenadante por decantación y añadir al ADN 300 µL de etanol al 70%. Invertir el tubo varias veces para lavar la medusa.
- ❑ Aspirar el etanol con una pipeta Pasteur, evitando coger el pellet de ADN. Después invertimos el tubo sobre papel absorbente y secamos la medusa durante 10-15 minutos.
- ❑ Añadir 100 µL de ADN Rehydration Solution (Tris-HCl 10 mM a pH 7,4 y EDTA 1 mM a pH 8,0) e incubar a 65°C durante una hora. Es conveniente golpear el tubo suavemente con las puntas de los dedos para facilitar el proceso. Alternativamente, se puede rehidratar el ADN mediante incubación de la mezcla a 22°-24°C o 4°C durante toda la noche.
- ❑ El ADN se almacena a 2°-8°C hasta su procesamiento ulterior (no añadimos ARNasa al lisado nuclear ya que almacenamos las muestras como máximo durante varios meses).

El ADN purificado se cuantifica con una parte alícuota de 10 µL de cada muestra de ADN que se diluye en agua estéril hasta completar 100 µL. Se lee la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) y 280 nm ( $A_{280}$ ) con el fin de calcular la concentración de ADN obtenida para cada muestra ( $\text{ADN (ng/}\mu\text{L)} = 50 \times \text{DO}_{260}$ ) (tabla 12.11) y el cociente  $A_{260}/A_{280}$  (informa de la desnaturalización del ADN y de la contaminación proteica del mismo).

**Tabla 12.11.- Fórmula para calcular la concentración de ácido desoxirribonucleico a partir de la absorbancia a 260 nm.**

$$\text{ADN (ng/}\mu\text{L)} = x \text{ UDO} * [(50 \mu\text{g/mL disolución})/1 \text{ UDO}] * [0,1 \text{ mL disolución}/0,01 \text{ mL muestra ADN}] * [10 \text{ mL}/10^3 \mu\text{L}] * [10 \text{ ng}/1 \mu\text{g}] = 50 * \text{DO}_{260}$$

ADN (ácido desoxirribonucleico), UDO (unidades de densidad óptica),  $\text{DO}_{260}$  (densidad óptica a 260 nm de absorbancia).

### 12.6.3.2 Reacción en cadena por la polimerasa

Se utiliza el Kit PCR core System I (Promega® M7665) y los primers (Genset® Oligos, Genset, París, Francia) que generan fragmentos de 198 pares de bases (pb):

- 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' (cebador A).
- 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3' (cebador B).

La composición del medio de reacción o master mix se representa en la tabla 12.12.

- Tras haber pipeteado los distintos componentes de la master mix (a excepción de la Taq polimerasa) en un tubo Eppendorf les daremos un pulso de centrifugadora para homogeneizar.
- Preparamos la disolución de la Taq polimerasa, que se dispensa por la casa comercial a una dilución de 5 U/ $\mu$ L, introduciendo en un tubo Eppendorf 0,3  $\mu$ L de Taq y 4,7  $\mu$ L de agua bidestilada por muestra.
- Pipeteamos el volumen correspondiente a 0,5  $\mu$ g de ADN en los tubos de PCR, después completamos hasta 30  $\mu$ L con agua bidestilada. Añadimos 15  $\mu$ L de master mix (sin Taq polimerasa). Por último, añadimos 5  $\mu$ L de la solución de Taq polimerasa. Damos un pulso de centrifugadora para mezclar bien todos los componentes.
- Añadir 50  $\mu$ L de aceite mineral sobre los tubos de PCR e introducir en el termociclador.
- Utilizamos el termociclador Hybaid Limited OmniGene® TR3 CM220 S 00988 (Hybaid Limited, Middlesex, Reino Unido) con el programa siguiente: 60 segundos a 95°C (desnaturalización); 90 segundos a 62°C (apareamiento); 60 segundos a 72°C (extensión) durante 35 ciclos. Hay que extraer los tubos de PCR una vez concluido el programa para conservarlos a 4°C.

**Tabla 12.12.- Composición de la master mix utilizada en la PCR que escruta la presencia del alelo C677T.**

COMPONENTES	VOLÚMENES POR MUESTRA *
MgCl <sub>2</sub> , 25mM	3 $\mu$ L
Tampón de reacción con Taq polimerasa 10x	5 $\mu$ L
dNTP 10 mM	1 $\mu$ L
Cebador A	1,5 $\mu$ L
Cebador B	1,3 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	3,2 $\mu$ L
Taq polimerasa	5 $\mu$ L
Volumen total medio (sin Taq polimerasa)	15 $\mu$ L
Volumen muestra	30 $\mu$ L
Volumen total (muestra + medio)	50 $\mu$ L

PCR (reacción en cadena por la polimerasa), dNTP (trifosfatos de los desoxirribonucleótidos).

\* Se multiplican los volúmenes por el número de muestras que hay que cargar más uno.

- Preparamos un gel de agarosa al 3% (3 g de agarosa en 100 mL de tampón de electroforesis tris-acetato (pH 8,2)). Se disuelve la agarosa en horno microondas.
- El tampón tris acetato (TAE) se prepara concentrado (10x) con 242,2 g de Tris base, 18,61 g de EDTA Na<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O y 60,0 mL de ácido acético glacial. Enrasamos con agua destilada hasta 5 L. Obviamente, para su uso debe diluirse a 1/10.
- Los pocillos se cargan con 10  $\mu$ L de muestra y 3  $\mu$ L de tampón de carga (4 mL de EDTA Na<sub>2</sub> 0,25 M, 100  $\mu$ L de dodecil sulfato sódico (SDS) 10%, 5 mL de glicerol, 10 mg de azul de bromofenol y 900  $\mu$ L de agua estéril).

Uno de los pocillos se cargará con un marcador de ADN y otro con agua (control negativo). Se realiza la electroforesis de las muestras a 97-100 V durante 180 minutos.

- Una vez concluida la electroforesis, se sumerge el gel en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/mL).
- Transiluminamos el gel con rayos ultravioleta para ver si hay bandas de 198 pb, así sabemos si es útil proseguir con la digestión.

### 12.6.3.3 Digestión

Usamos la endonucleasa *HinfI* suministrada por Promega que reconoce la secuencia GANTC y corta la cadena en dos fragmentos (G y ANTC). La sustitución de citosina por timina en el nucleótido 677 crea una diana de restricción para este enzima que no aparece en el alelo normal, cortándose el fragmento de 198 pb en uno de 175 y otro de 23 pb.

El medio de digestión se detalla en la tabla 12.13.

**Tabla 12.13.- Composición del medio de digestión utilizado en la PCR que escruta la presencia del alelo C677T.**

COMPONENTES	VOLÚMENES POR MUESTRA*
Tampón** 10x	3 µL
BSA	0,5 µL
<i>HinfI</i> (10 U/µL)	1 µL
Agua bidestilada	5,5 µL
Volumen total medio	10 µL
Volumen muestra	25 µL
Volumen total (muestra + medio)	35 µL

PCR (reacción en cadena por la polimerasa), BSA (seroalbúmina bovina).

\* Se multiplican los volúmenes por el número de muestras que hay que cargar más uno.

\*\* Los componentes del tampón son tris HCl (pH 7,5) 60 mM, NaCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 60 mM y ditiotreitól 10 mM a 37°C.

- Se incuban las mezclas a 37°C durante tres horas y media.
- Se prepara la electroforesis con un gel de agarosa al 3% con el tampón TAE.
- Se siembran los pocillos con 25 µL de muestra y 4 µL de tampón de carga. En el primer pocillo pipeteamos un marcador de ADN y en el segundo un heterocigoto como control de digestión.
- Se hacen electroforesis de las muestras a 97-100 V durante 180 minutos.
- Inmersión en cubeta con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio.



### 12.6.3.4 Lectura e interpretación de los resultados

Transiluminamos el gel y lo fotografiamos. Los resultados posibles son:

- Una banda de 198 pb: AA (wild type).
- Una banda de 175 pb: VV (homocigoto).
- Dos bandas de 198 y 175 pb: AV (heterocigoto).

### 12.6.3.5 Precauciones para disminuir los diagnósticos falsos

Las causas más frecuentes de resultados erróneos son la contaminación de la muestra y la digestión insuficiente. Para evitar la contaminación, manipulamos las muestras con guantes. La siembra de un pocillo con agua en lugar de muestra nos sirve de despistaje de la presencia de material genético extraño. Por último, la digestión insuficiente se detecta usando muestra de un heterocigoto conocido (protocolo propio) o coamplificando un fragmento del gen correspondiente a la MTHFR y otro fragmento cualquiera pero con una diana de restricción común, tal es el caso del exón III del fibrinógeno A $\alpha$ <sup>233</sup>.

Por último, y tras hacer una búsqueda bibliográfica cuidadosa nos adherimos a la frase de Botto y Yang, referente al escrutinio de las variantes del gen de la MTHFR por medio de la PCR: “no hemos podido hallar datos sobre la especificidad, sensibilidad, y valor predictivo de estas pruebas...”<sup>234</sup>.

## 12.7 Bibliografía

1. Lucock MD, Wild J, Smithells R, Hartley R. In vivo characterisation of the absorption and biotransformation of pteroylglutamic acid in man: a model for future studies. *Biochem Med Metab Biol* 1989;42:30-42.
2. Kelly, McPartlin J, Goggins M, Weir DG, Scott JM. Unmetabolised folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1790-5.
3. Steegers-Theunissen R. Folate metabolism and neural tube defects: a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995;61:39-48.
4. Klee GG. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B<sub>12</sub> and folate. *Clin Chem* 2000;46(8 Pt 2):1277-83.
5. Reizenstein P. Errors and artefacts in serum folic-acid assays. *Acta Med Scand* 1965;178:133-9.
6. Piertz K, Hages M, Remer T. Methodological aspects in vitamin bioavailability testing. *J Micronutr Anal* 1990;7:207-22.
7. Cahill EE, McPartlin J, Gibney MJ. The effects of fasting and refeeding healthy volunteers on serum folate levels. *Int J Vitam Nutr Res* 1998;68:142-5.
8. Savage DG, Lindenbaum J, Stabler SP, Allen RH. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am J Med* 1994;96:239-46.
9. Snow CF. Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency: a guide for the primary care physician. *Arch Intern Med*. 1999;159:1289-98.
10. Herbert V, Zalusky R. Interrelations of vitamin B12 and folic acid metabolism: Folic acid clearance studies. *J Clin Invest* 1962;41:1263-76.
11. Hoffbrand AV, Newcombe FA, Mollin DL. Method of assay of red cell folate activity and the value of the assay as a test for folate deficiency. *J Clin Pathol* 1966;19:17-28.
12. Varadi S, Abbott D, Elwis A. Correlation of peripheral white cell and bone marrow changes with folate levels in pregnancy and their clinical significance. *J Clin Pathol* 1966;19:33-6.
13. Tisman G, Herbert V. B 12 dependence of cell uptake of serum folate: an explanation for high serum folate and cell folate depletion in B 12 deficiency. *Blood* 1973;41:465-9.

14. Lindenbaum J, Savage DG, Stabler SP, Allen RH. Diagnosis of cobalamin deficiency: II. Relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol* 1990;34:99-107.
15. Pennypacker LC, Allen RH, Kelly JP, Matthews LM, Grigsby J, Kaye K, y cols. High prevalence of cobalamin deficiency in elderly outpatients. *J Am Geriatr Soc* 1992;40:1197-204.
16. Stabler SP, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Clinical spectrum and diagnosis of cobalamin deficiency. *Blood* 1990;76:871-81.
17. Sauberlich HE, Kretsch MJ, Skala JH, Johnson HL, Taylor PC. Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *Am J Clin Nutr* 1987;46:1016-28.
18. Cuskelly GJ, McNulty H, Scott JM. Effect of increasing dietary folate on red-cell folate: implications for prevention of neural tube defects. *Lancet* 1996;347:657-9.
19. Gregory JF III. Case study: folate bioavailability. *J Nutr* 2001;131:1376S-82S.
20. McKinley MC, Strain JJ, McPartlin J, Scott JM, McNulty H. Plasma homocysteine is not subject to seasonal variation. *Clin Chem* 2001;47:1430-6.
21. Eichner ER, Hillman RS. The evolution of anemia in alcoholic patients. *Am J Med* 1971;50:218-32.
22. Halsted CH, Robles EA, Mezey E. Intestinal malabsorption in folate-deficient alcoholics. *Gastroenterology* 1973;64:526-32.
23. Russell RM, Rosenberg IH, Wislon PD, Iber FL, Oaks EB, Giovetti AC, y cols. Increased urinary excretion and prolonged turnover time of folic acid during ethanol ingestion. *Am J Clin Nutr* 1983;38:64-70.
24. McMartin KE, Collins TD, Shiao CQ, Vidrine L, Redetzki HM. Study of dose-dependence and urinary folate excretion produced by ethanol in humans and rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1986;10:419-24.
25. Brussaard JH, Lowik MR, van den Berg H, Brants HA, Goldbohm RA. Folate intake and status among adults in the Netherlands. *Eur J Clin Nutr* 1997;51 Suppl 3:S46-50.
26. Halsted CH, Villanueva JA, Devlin AM, Chandler CJ. Metabolic interactions of alcohol and folate. *J Nutr* 2002;132(8 Suppl):2367S-2372S.
27. Ortega RM, López-Sobaler AM, González-Gross MM, Redondo MM, Marzana I, Zamora MJ, Andrés P. Influence of smoking on folate intake and blood folate concentrations in a group of elderly Spanish men. *J Am Coll Nutr* 1994;13:68-72.
28. Piyathilake CJ, Macaluso M, Hine RJ, Richards EW, Krumdieck CL. Local and systemic effects of cigarette smoking on folate and vitamin B-12. *Am J Clin Nutr* 1994;60:559-66.
29. McDonald SD, Perkins SL, Jodouin CA, Walker MC. Folate levels in pregnant women who smoke: An important gene/environment interaction. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:620-5.
30. Pagan K, Hou J, Goldenberg RL, Cliver SP, Tamura T. Effect of smoking on serum concentrations of total homocysteine and B vitamins in mid-pregnancy. *Clin Chim Acta* 2001;306:103-9.
31. Subar AF, Harlan LC, Mattson ME. Food and nutrient intake differences between smokers and non-smokers in the U.S. *Am J Publ Health* 1990;80:1323-9.
32. Trobs M, Renner T, Scherer G, Heller WD, Geiss HC, Wolfram G, y cols. Nutrition, antioxidants, and risk factor profile of nonsmokers, passive smokers and smokers of the Prevention Education Program (PEP) in Nuremberg, Germany. *Prev Med* 2002;34:600-7.
33. Quimioterapia antineoplásica I. Bases fundamentales. Antimetabolitos. En: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A. Compendio de Farmacología Humana. 2ª ed. Pamplona: EUNSA; 1980. p. 617-28.
34. Reynolds EH. Anticonvulsant drugs, folate deficiency, and metabolic bone disease. *Br Med J* 1972;2:656-7.
35. Rivey MP, Schottelius DD, Berg MJ. Phenytoin-folic acid: a review. *Drug Intell Clin Pharm* 1984;18:292-301.
36. MacCosbe PE, Toomey K. Interaction of phenytoin and folic acid. *Clin Pharm* 1983;2:362-9.
37. Reynolds EH, Chanarin I, Milner G, Matthews DM. Anticonvulsant therapy, folic acid and vitamin B12 metabolism and mental symptoms. *Epilepsia* 1966;7:261-70.
38. Glazko AJ. Antiepileptic drugs: biotransformation, metabolism, and serum half-life. *Epilepsia* 1975;16:367-91.
39. Baylis EM, Crowley JM, Preece JM, Sylvester PE, Marks V. Influence of folic acid on blood-phenytoin levels. *Lancet* 1971;1:62-4.
40. Ralston AJ, Snaith RP, Hinley JB. Effects of folic acid on fit-frequency and behaviour in epileptics on anticonvulsants. *Lancet* 1970;1:867-8.
41. Kishi T, Fujita N, Eguchi T, Ueda K. Mechanism for reduction of serum folate by antiepileptic drugs during prolonged therapy. *Neurol Sci* 1997;145:109-12.
42. Brodie MJ, Dichter MA. Antiepileptic drugs. *N Engl J Med* 1996;334:168-75.
43. Taliani U, Camellini A, Bernardi P, Biggi A, Rossini P, Castello S. [Un caso clinico de anemia megaloblástica durante el tratamiento con primidona] [Artículo en italiano]. *Acta Biomed Ateneo Parmense* 1989;60:245-8.
44. Apeland T, Mansoor MA, Strandjord RE. Antiepileptic drugs as independent predictors of plasma total homocysteine levels. *Epilepsy Res* 2001;47:27-35.
45. Nau H. Valproic acid-induced neural tube defects. *Ciba Found Symp* 1994;144-60.
46. Yerby MS. Antiepileptic drug use and pregnancy. *OB/GYN Special Edition* 2002;5:27-9.
47. Sulfamidas y co-trimoxazol. Sulfonas. En: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A. Compendio de Farmacología Humana. 2ª ed. Pamplona: EUNSA; 1980. p. 696-704.
48. Fármacos antimaláricos. En: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A. Compendio de Farmacología Humana. 2ª ed. Pamplona: EUNSA; 1980. p. 750-7.
49. Zimmerman J, Selhub J, Rosenberg IH. Competitive inhibition of folic acid absorption in rat jejunum by triamterene. *J Lab Clin Med* 1986;108:272-6.
50. Corcino J, Waxman S, Herbert V. Mechanism of triamterene-induced megaloblastosis. *Ann Intern Med* 1970;73:419-24.
51. Desouza C, Keebler M, McNamara DB, Fonseca V. Drugs affecting homocysteine metabolism: impact on cardiovascular risk. *Drugs* 2002;62:605-16.
52. Leonard JP, Desager JP, Beckers C, Harvengt C. In vitro binding of various biological substances by two hypocholesterolaemic resins. Cholestyramine and colestipol. *Arzneimittelforschung* 1979;29:979-81.
53. Hoppner K, Lampi B. Bioavailability of folate following ingestion of cholestyramine in the rat. *Int J Vitam Nutr Res* 1991;61:130-4.

54. Grace E, Emans SJ, Drum DE. Hematologic abnormalities in adolescents who take oral contraceptive pills. *J Pediatr* 1982;101:771-4.
55. Shojania AM. Oral contraceptives: effect of folate and vitamin B12 metabolism. *Can Med Assoc J* 1982;126:244-7.
56. Rhode BM, Cooper BA, Farmer FA. Effect of orange juice, folic acid, and oral contraceptives on serum folate in women taking a folate-restricted diet. *J Am Coll Nutr* 1983;2:221-30.
57. Sutterlin MW, Bussen SS, Rieger L, Diel J, Steck T. Serum folate and vitamin B12 levels in women using modern oral contraceptives (OC) containing 20 microg ethinyl estradiol. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;107:57-61.
58. Schmitz C, Lindpaintner K, Verhoef P, Gaziano JM, Buring J. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and myocardial infarction. A case-control study. *Circulation* 1996;94:1812-4.
59. Molloy AM, Daly S, Mills JL, Kirke PN, Whitehead AS, Ramsbottom D, y cols. Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: Implications for folate intake recommendations. *Lancet* 1997;349:1591-3.
60. McDonald SD, Perkins SL, Jodouin CA, Walker MC. Folate levels in pregnant women who smoke: An important gene/environment interaction. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:620-5.
61. Lindenbaum J, Rosenberg IH, Wilson PW, Stabler SP, Allen RH. Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham elderly population. *Am J Clin Nutr* 1994;60:2-11.
62. Wahlin A, Backman L, Hultdin J, Adolfsson R, Nilsson LG. Reference values for serum levels of vitamin B12 and folic acid in a population-based sample of adults between 35 and 80 years of age. *Public Health Nutr* 2002;5:505-11.
63. Scarlett JD, Read H, O'Dea K. Protein-bound cobalamin absorption declines in the elderly. *Am J Hematol* 1992;39:79-83.
64. Carmel R. Cobalamin, the stomach and aging. *Am J Clin Nutr* 1997;66:750-75.
65. Krasinski SD, Russell RM, Samloff IM, Jacob RA, Dallal GE, McGandy RB, y cols. Fundic atrophic gastritis in an elderly population: Effect on hemoglobin and several serum nutritional indicators. *J Am Geriatr Soc* 1996;34:800-6.
66. van Asselt DZ, van der Broek WJ, Lamers CB, Corstens FH, Hoefnagels WH. Free and protein-bound cobalamin absorption in healthy middle-aged and older subjects. *J Am Geriatr Soc* 1996;44:949-53.
67. Nilsson-Ehle H, Jagenburg R, Landahl S, Lindstedt G, Swolin B, Westin J. Cyanocobalamin absorption in the elderly: Results for healthy subjects and for subjects with low serum cobalamin concentration. *Clin Chem* 1986;32:1368-71.
68. Weggemans RM, de Groot LC, Haller J. Factors related to plasma folate and vitamin B12. The SENECA study. *Int J Food Sci Nutr* 1997;48:141-50.
69. Fernandes-Costa F, van Tonder S, Metz J. A sex difference in serum cobalamin and transcobalamin levels. *Am J Clin Nutr* 1985;41:784-6.
70. Chanarin I. The effects of nitrous oxide on cobalamins, folates, and on related events. *Crit Rev Toxicol* 1982;10:179-213.
71. Gokben M, Esener Z. Effect of nitrous oxide on serum vitamin-B12 levels under surgical anesthesia. *Acta Anaesthesiol Belg* 1985;36:71-7.
72. Deleu D, Louon A, Sivagnanam S, Sundaram K, Okereke P, Gravell D, y cols. Long-term effects of nitrous oxide anaesthesia on laboratory and clinical parameters in elderly Omani patients: a randomized double-blind study. *J Clin Pharm Ther* 2000;25:271-7.
73. Seward SJ, Safran C, Marton KI, Robinson SH. Does the mean corpuscular volume help physicians evaluate hospitalized patients with anemia? *J Gen Intern Med* 1990;5:187-91.
74. Marquet J, Zittoun J, Weynants C, Zittoun R. Thymidylate synthesis in a folate deprived cell line. *Br J Haematol* 1981;49:87-95.
75. Zittoun J, Marquet J, Zittoun R. Effect of folate and cobalamin compounds on the deoxyuridine suppression test in vitamin B12 and folate deficiency. *Blood* 1978;51:119-28.
76. Hoffbrand AV, Jackson BF. Correction of the DNA synthesis defect in vitamin B12 deficiency by tetrahydrofolate: evidence in favour of the methyl-folate trap hypothesis as the cause of megaloblastic anaemia in vitamin B12 deficiency. *Br J Haematol* 1993;83:643-7.
77. Zittoun J, Zittoun R. Modern clinical testing strategies in cobalamin and folate deficiency. *Semin Hematol* 1999;36:35-46.
78. Tabor H, Wyngarden L. A method for the determination of formiminoglutamic acid in urine. *J Clin Invest* 1958;37:824-828.
79. Hibbard BM. The role of folic acid in pregnancy with particular reference to anaemia, abortion and abortion. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1964;71:529-42.
80. Hibbard ED. FIGLU excretion in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1967;46:Suppl 7:61-9.
81. Marin G, Tentoni J, Cicchetti G. Anemia megaloblástica: su estudio en forma rápida y económica. *Sangre* 1997;42:235-238.
82. Vitamina B<sub>12</sub>. En: Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B<sub>6</sub>, Folate, Vitamin B<sub>12</sub>, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington (EE.UU.); National Academies Press; 2000. p. 306-356. URL: <http://www.nap.edu/books/0309065542/html/index.html> (acceso 20/2/03).
83. McGown EL, Lewis CM, Dong MH, Sauberlich HE. Results with commercial radioassay kits compared with microbiological assay of folate in serum and whole-blood. *Clin Chem* 1978;24:2186-91.
84. Nettland B, Bakke OM. Inadequate sample preparation technique as a source of error in determination of erythrocyte folate by competitive binding radioassay. *Clin Chem* 1977;23:1505-6.
85. Mollin DL, Hoffbrand AV, Ward PG, Lewis SM. Interlaboratory comparison of serum vitamin B12 assay. *J Clin Pathol* 1980;33:243-8.
86. Lucock MD, Daskalakis I, Schorah CJ, Lumb CH, Oliver M, Devitt H, y cols. Folate-homocysteine interrelations: potential new markers of folate status. *Mol Genet Metabol* 1999;67:23-35.
87. Herzlich B, Herbert V. Depletion of serum holotranscobalamin II: An early sign of negative vitamin B12 balance. *Lab Invest* 1988;58:332-7.
88. Lindgren A, Kilander A, Bagge A, Nexø E. Holotranscobalamin – a sensitive marker of cobalamin malabsorption. *Eur J Clin Invest* 1999;29:321-9.
89. Nexø E, Hvas AM, Bleie O, Refsum H, Fedosov SN, Vollset SE, y cols. Holo-transcobalamin is an early marker of changes in cobalamin homeostasis. A randomized placebo-controlled study. *Clin Chem* 2002;48:1768-71.

90. Wickramasinghe SN, Ratnayaka ID. Limited value of serum holo-transcobalamin II measurements in the differential diagnosis of macrocytosis. *J Clin Pathol* 1996;49:755-8.
91. Allen RH, Stabler SP, Savage DG, Lindenbaum J. Diagnosis of cobalamin deficiency I: usefulness of serum methylmalonic acid and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol* 1990;34:90-8.
92. Hall CA, Chu RC. Serum homocysteine in routine evaluation of potential vitamin B12 and folate deficiency. *Eur J Haematol* 1990;45:143-9.
93. Chadeaux B, Copper BA, Gilfix BM, Lue-Shing H, Carson W, Gavsie A, Rosenblatt DS. Homocysteine: relationship to serum cobalamin, serum folate, erythrocyte folate, and lobation of neutrophils. *Clin Invest Med* 1994;17:540-50.
94. Haltmayer M, Mueller T, Poelz W. Erythrocyte mean cellular volume and its relation to serum homocysteine, vitamin B12 and folate. *Acta Med Austriaca* 2002;29:57-60.
95. Hølleland G, Schneede J, Ueland PM, Lund PK, Refsum H, Sandberg S. Cobalamin deficiency in general practice. Assessment of the diagnostic utility and cost-benefit analysis of methylmalonic acid determination in relation to current diagnostic strategies. *Clin Chem* 1999;45:189-98.
96. Stabler SP, Lindenbaum J, Savage DG, Allen RH. Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency. *Blood* 1993;81:3404-13.
97. Allen RH, Stabler SP, Lindenbaum J. Serum betaine, N,N-dimethylglycine and N-methylglycine levels in patients with cobalamin and folate deficiency and related inborn errors of metabolism. *Metabolism* 1993;42:1448-60.
98. Allen RH, Stabler SP, Savage DG, Lindenbaum J. Elevation of 2-methylcitric acid I and II levels in serum, urine, and cerebrospinal fluid of patients with cobalamin deficiency. *Metabolism* 1993;42:978-88.
99. SimulTRAC-SNB. Kit de Radioensayo SimulTRAC-SNB SNB Vitamina B<sub>12</sub> [<sup>57</sup>Co]/Folato [<sup>125</sup>I]. Nueva York: ICN Pharmaceuticals, Inc.; 1998.
100. Higgins T, Wu A. Differences in vitamin B<sub>12</sub> results as measured with boil and no boil kits. *Clin Chem* 1983;29:587-8.
101. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990;1:228-37.
102. Refsum H, Guttormsen AB, Fiskerstrand T, Ueland PM. On the formation and fate of total plasma homocysteine. En: Graham I, Refsum H, Rosenberg IH, Ueland PM, editores. *Homocysteine metabolism: from basic science to clinical medicine*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1997. p. 23-9.
103. Bostom A, Brosnan JT, Hall B, Nadeau MR, Selhub J. Net uptake of plasma homocysteine by the rat kidney in vivo. *Atherosclerosis* 1995;116:59-62.
104. Rasmussen K, Møller J. Total homocysteine measurement in clinical practice. *Ann Clin Biochem* 2000;37:627-48.
105. Andersson A, Isaksson A, Brattström L, Hultberg B. Homocysteine and other thiols determined in plasma by HPLC and thiol-specific postcolumn derivatization. *Clin Chem* 1993;39:1590-7.
106. Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R. Determination of plasma homocysteine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Biochem* 1989;178:208-14.
107. Rasmussen K, Møller J, Lyngbak M. Within-person variation of plasma homocysteine and effects of posture and tourniquet application. *Clin Chem* 1999;45:1850-5.
108. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993;39:1764-79.
109. Refsum H, Helland D., Ueland PM. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin Chem* 1985;31:624-8.
110. Miner SES, Evrovski J, Cole DEC. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem* 1997;30:189-201.
111. Guttormsen AB, Mansoor AM, Fiskerstrand T, Ueland PM, Refsum H. Kinetics of plasma homocysteine in healthy subjects after peroral homocysteine loading. *Clin Chem* 1993;39:1390-7.
112. Andersson A, Brattström L, Israelsson B, Isaksson A, Hamfelt A, Hultberg B. Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 1992;22:79-87.
113. Garg UC, Zheng ZJ, Folsom AR, Moyer YS, Tsai MY, McGovern P, Eckfeldt JH. Short-term and long-term variability of plasma homocysteine measurement. *Clin Chem* 1997;43:141-5.
114. Fernández-Miranda C, de la Calle M, Manuel Bris J, Muelas M, Gómez P, Díaz-Rubio P. Influencia de la menopausia en la concentración plasmática de homocisteína. *Med Clin (Barc)* 2001;116:206-8.
115. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993;270:2693-8.
116. Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, Rogers G, Bowman BA, Gunter EW, y cols. Serum total homocysteine concentrations in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1991-1994): Population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentrations. *Ann Intern Med* 1999;131:331-9.
117. Wollesen F, Brattström L, Refsum H, Ueland PM, Berglund L, Berne C. Plasma total homocysteine and cysteine in relation to glomerular filtration rate in diabetes mellitus. *Kidney Int* 1999;55:1028-35.
118. Wouters MG, Moorees MT, van der Mooren MJ, Blom HJ, Boers GH, Schellekens LA, y cols. Plasma homocysteine and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 1995;25:801-5.
119. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000;151:862-77.
120. Vermaak WJ, Ubbink JB, Delport R, Becker PJ, Bissbort SH, Ungerer JP. Ethnic immunity to coronary heart disease? *Atherosclerosis* 1991;89:155-62.
121. Ubbink JB, Vermaak WJ, Delport R, van der Merwe A, Becker PJ, Potgieter H. Effective homocysteine metabolism may protect South African blacks against coronary heart disease. *Am J Clin Nutr* 1995;62:802-8.
122. Carmel R, Green R, Jacobsen DW, Rasmussen K, Florea M, Azen C. Serum cobalamin, homocysteine, and methylmalonic acid concentrations in a multiethnic elderly population: ethnic and sex differences in cobalamin and metabolite abnormalities. *Am J Clin Nutr* 1999;70:904-10.
123. Obeid OA, Mannan N, Perry G, Iles RA, Boucher BJ. Homocysteine and folate in healthy east London Bangladeshis [carta]. *Lancet* 1998;352:1829-30.
124. Tallova J, Tomandl J, Bicikova M, Hill M. Changes of plasma total homocysteine levels during the menstrual cycle. *Eur J Clin Invest* 1999;29:1041-4.
125. Tallova J, Bicikova M, Hill M, Tomandl J, Valentova D. Homocysteine during the menstrual cycle in depressive women. *Eur J Clin Invest* 2003;33:268-73.

126. Andersson A, Hultberg B, Brattström L, Isaksson A. Decreased serum homocysteine in pregnancy. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992;30:377-9.
127. Mijatovic V, Kenemans P, Netelenbos C, Jakobs C, Popp-Snijders C, Peters-Muller ER, van der Mooren MJ. Postmenopausal oral 17beta-estradiol continuously combined with hydrogesterone reduces fasting serum homocysteine levels. *Fertil Steril* 1998;69:876-82.
128. van Baal WM, Smolders RG, van der Mooren MJ, Teerlink T, Kenemans P. Hormone replacement therapy and plasma homocysteine levels. *Obstet Gynecol* 1999;94:485-91.
129. Madsen JS, Kristensen SR, Klitgaard NA, Bladbjerg EM, Abrahamsen B, Stilgren L, Jespersen J. Effect of long-term hormone replacement therapy on plasma homocysteine in postmenopausal women: a randomized controlled study. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:33-9.
130. Brattström L, Israelsson B, Olsson A, Andersson A, Hultberg B. Plasma homocysteine in women on oral oestrogen-containing contraceptives and in men with oestrogen-treated prostatic carcinoma. *Scand J Clin Lab Invest* 1992;52:283-7.
131. Merki-Feld GS, Imthurn B, Keller PJ. Effects of two oral contraceptives on plasma levels of nitric oxide, homocysteine, and lipid metabolism. *Metabolism* 2002;51:1216-21.
132. Kang SS, Wong PWK, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism* 1987;36:458-62.
133. Miller JW, Ribaya-Mercado JD, Russell RM, Shepard DC, Morrow FD, Cochary EF, y cols. Effect of vitamin B-6 deficiency on fasting plasma homocysteine concentrations. *Am J Clin Nutr* 1992;55:1154-60.
134. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998;157 [Suppl 2]:S40-S44.
135. Guttormsen AB, Schneede J, Fiskerstrand T, Ueland PM, Refsum HM. Plasma concentrations of homocysteine and other aminothiols compounds are related to food intake in healthy human subjects. *J Nutr* 1994;124:1934-41.
136. Ubbink JB, Vermaak WJ, van der Merwe A, Becker PJ. The effect of blood sample aging and food consumption on plasma total homocysteine. *Clin Chim Acta* 1992;207:119-28.
137. Nurk E, Tell GS, Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Plasma total homocysteine is influenced by prandial status in humans: the Hordaland Homocysteine Study. *J Nutr* 2001;131:1214-6.
138. Clarke R, Woodhouse P, Ulvik A, Frost C, Sherliker P, Refsum H, y cols. Variability and determinants of total homocysteine concentrations in an elderly population. *Clin Chem* 1998;44:102-7.
139. Koehler KM, Pareo-Tubbeh HC, Liang HC, Garry PJ. Correlation between vitamin intake estimated with a food-frequency questionnaire and biochemical status in elderly men and women. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1349S-50S.
140. Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Stensvold I, Nordrehaug JE, Kvale G, y cols. Coffee consumption and plasma total homocysteine: The Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 1997;65:136-43.
141. Stolzenberg-Solomon RZ, Miller ER 3rd, Maguire MG, Selhub J, Appel LJ. Association of dietary protein intake and coffee consumption with serum homocysteine concentrations in an older population. *Am J Clin Nutr* 1999;69:467-75.
142. Grubben MJ, Boers GH, Blom HJ, Broekhuizen R, de Jong R, van Rijt L, y cols. Unfiltered coffee increases plasma homocysteine concentrations in healthy volunteers: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 2000;71:480-4.
143. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, y cols. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 1995;274:1526-33.
144. Cravo ML, Gloria LM, Selhub J, Nadeau MR, Camilo ME, Resende MP, y cols. Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status. *Am J Clin Nutr* 1996;63:220-4.
145. Ueland PM, Nygard O, Vollset SE, Refsum H. The Hordaland Homocysteine Studies. *Lipids* 2001;36 Suppl:S33-9.
146. Thirup P, Ekelund S. Day-to-day, postprandial, and orthostatic variation of total plasma homocysteine. *Clin Chem* 1999;45:1280-3.
147. Soria C, Chadeaux B, Coude M, Gaillard O, Kamoun P. Concentrations of total homocysteine in plasma in chronic renal failure. *Clin Chem* 1990;36:2137-8.
148. Arnadottir M, Hultberg B, Nilsson Ehle P, Thysell H. The effect of reduced glomerular filtration rate on plasma total homocysteine concentration. *Scand J Clin Lab Invest* 1996;56:41-6.
149. Salardi S, Cacciari E, Sassi S, Grossi G, Mainetti B, Dalla Casa C, y cols. Homocysteinemia, serum folate and vitamin B12 in very young patients with diabetes mellitus type 1. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13:1621-7.
150. Agullo-Ortuno MT, Albaladejo MD, Parra S, Rodríguez-Manotas M, Fenollar M, Ruiz-Espejo F, y cols. Plasmatic homocysteine concentration and its relationship with complications associated to diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2002;326:105-12.
151. Ozmen B, Ozmen D, Turgan N, Habif S, Mutaf I, Bayindir O. Association between homocysteinemia and renal function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann Clin Lab Sci* 2002;32:279-86.
152. Deicher R, Vierhapper H. Homocysteine: a risk factor for cardiovascular disease in subclinical hypothyroidism? *Thyroid* 2002;12:733-6.
153. Nedrebo BG, Ericsson UB, Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Aakvaag A, y cols. Plasma total homocysteine levels in hyperthyroid and hypothyroid patients. *Metabolism* 1998;47:89-93.
154. Diekman MJ, van der Put NM, Blom HJ, Tijssen JG, Wiersinga WM. Determinants of changes in plasma homocysteine in hyperthyroidism and hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;54:197-204.
155. Catargi B, Parrot-Roulaud F, Cochet C, Ducassou D, Roger P, Tabarin A. Homocysteine, hypothyroidism, and effect of thyroid hormone replacement. *Thyroid* 1999;9:1163-6.
156. Berger PB, Jones JD, Olson LJ, Edwards BS, Frantz RP, Rodeheffer RJ, y cols. Increase in total plasma homocysteine concentration after cardiac transplantation. *Mayo Clin Proc* 1995;70:125-31.
157. Wilcken DE, Gupta VJ, Betts AK. Homocysteine in the plasma of renal transplant recipients: effects of cofactors for methionine metabolism. *Clin Sci (Lond)* 1981;61:743-9.
158. Fernández-Miranda C, Gómez P, Díaz-Rubio P, Estenez J, Carillo JL, Andrés A, Morales JM. Plasma homocysteine levels in renal transplanted patients on cyclosporine or tacrolimus therapy: effect of treatment with folic acid. *Clin Transplant* 2000;14:110-4.
159. Massy ZA, Chadeaux-Vekemans B, Chevalier A, Bader CA, Drueke TB, Legendre C, y cols. Hyperhomocysteinemia: a significant risk factor for cardiovascular disease in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9:1103-8.
160. Arnadottir M, Hultberg B, Wahlberg J, Fellstrom B, Dimeny E. Serum total homocysteine concentration before and after renal transplantation. *Kidney Int* 1998;54:1380-4.

161. Ducloux D, Motte G, Massy ZA. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor after renal transplantation. *Ann Transplant* 2001;6:40-2.
162. Refsum H, Wesenberg F, Ueland PM. Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res* 1991;51:828-35.
163. Refsum H, Helland S, Ueland PM. Fasting plasma homocysteine as a sensitive parameter of antifolate effect: a study of psoriasis patients receiving low-dose methotrexate treatment. *Clin Pharmacol Ther* 1989;46:510-20.
164. Roubenoff R, Dellaripa P, Nadeau M, Abad LW, Muldoon BA, Selhub J, Rosenberg IH. Abnormal homocysteine metabolism in rheumatoid arthritis. *Arthritis Reum* 1997;40:718-22.
165. Hernanz A, Plaza A, Martín-Mola E, De Miguel E. Increased plasma levels of homocysteine and other thiol compounds in rheumatoid arthritis women. *Clin Biochem* 1999;32:65-70.
166. Sutton-Tyrrell K, Bostom A, Selhub J, Zeigler-Johnson C. High homocysteine levels are independently related to isolated systolic hypertension in older adults. *Circulation* 1997;96:1745-9.
167. Bortolotto LA, Safar ME, Billaud E, Lacroix C, Asmar R, London GM, Blacher J. Plasma homocysteine, aortic stiffness, and renal function in hypertensive patients. *Hypertension* 1999;34(4 Pt 2):837-42.
168. Lim U, Cassano PA. Homocysteine and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Epidemiol* 2002;156:1105-13.
169. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattström LE, Ueland PM, y cols. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 1997;277:1775-81.
170. Ueland PM, Refsum H. [Plasma homocysteine, a risk factor for premature vascular disease. Plasma levels in healthy persons; during pathologic conditions and drug therapy] (Artículo en noruego). *Nord Med* 1989;104:293-8.
171. Refsum H, Ueland PM, Kvinnsland S. Acute and long-term effects of high-dose methotrexate treatment on homocysteine in plasma and urine. *Cancer Res* 1986;46:5385-91.
172. Haagsma CJ, Blom HJ, van Riel PLCM, Van't Hof MA, Giesendorf BAJ, Oppernraaij-Emmerzaal D, y cols. Influence of sulphasalazine, methotrexate, and the combination of both on plasma homocysteine concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Am Rheum Dis* 1999;58:79-84.
173. Ono H, Sakamoto A, Eguchi T, Fujita N, Nomura S, Ueda H, y cols. Plasma total homocysteine concentrations in epileptic patients taking anticonvulsants. *Metabolism* 1997;46:959-62.
174. Apeland T, Mansoor MA, Strandjord RE, Kristensen O. Homocysteine concentrations and methionine loading in patients on antiepileptic drugs. *Acta Neurol Scand* 2000;101:217-23.
175. Tonstad S, Knudtzon J, Sivertsen M, Refsum H, Ose L. Efficacy and safety of cholestyramine therapy in peripubertal and prepubertal children with familial hypercholesterolemia. *J Pediatr* 1996;129:42-9.
176. Blankenhorn DH, Malinow MR, Mack WJ. Colestipol plus niacin therapy elevates plasma homocyst(e)ine levels. *Coron Art Dis* 1991;2:357-60.
177. Scott JM, Molloy AM, Kennedy DG, Kennedy S, Weir DG. Effects of the disruption of transmethylation in the central nervous system: an animal model. *Acta Neurol Scand Suppl* 1994;154:27-31.
178. Allain P, Le Bouil A, Cordillet E, Le Quay L, Bagheri H, Montastruc JL. Sulfate and cysteine levels in the plasma of patients with Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 1995;16:527-9.
179. Kang SS, Wong PW, Glickman PB, MacLeod CM, Jaffe IA. Protein-bound homocyst(e)ine in patients with rheumatoid arthritis undergoing D-penicillamine treatment. *J Clin Pharmacol* 1986;26:712-5.
180. Wiklund O, Fager G, Andersson A, Lundstam U, Masson P, Hultberg B. N-acetylcysteine treatment lowers plasma homocysteine but not serum lipoprotein(a) levels. *Atherosclerosis* 1996;119:99-106.
181. Chadeaux B, Ceballos I, Hamet M, Coude M, Poissonnier M, Kamoun P, y cols. Is absence of atheroma in Down syndrome due to decreased homocysteine levels? [carta]. *Lancet* 1988;ii:741.
182. Pogribna M, Melnyk S, Pogribny I, Chango A, Yi P, James SJ. Homocysteine metabolism in children with Down syndrome: in vitro modulation. *Am J Hum Genet* 2001;69:88-95.
183. Kraus JP, Janosik M, Kozich V, Mandell R, Shih V, Sperandio MP, y cols. Cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria. *Hum Mutat* 1999;13:362-75.
184. Boers GHJ, Fowler B, Smals AGH, Trijbels FJM, Leermarkers AI. Improved identification of heterozygotes for homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency by the combination of methionine loading and enzyme determination in cultured fibroblasts. *Hum Genet* 1985;69:164-9.
185. Boers GH, Smals AG, Trijbels FJ, Fowler B, Bakkeren JA, Schoonderwaldt HC, y cols. Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. *N Engl J Med* 1985;313:709-15.
186. McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nature Med* 1996;2:386-9.
187. Sibani S, Christensen B, O'Ferrall E, Saadi I, Hiou-Tim F, Rosenblatt DS, Rozen R. Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. *Hum Mutat* 2000;15:280-7.
188. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93:7-9.
189. Rosenblatt DS, Cooper BA. Inherited disorders of vitamin B12 utilization. *BioEssays* 1990;12:331-4.
190. Rosenblatt DS, Whitehead VM. Cobalamin and folate deficiency: acquired and hereditary disorders in children. *Semin Hematol* 1999;36:19-34.
191. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998;49:31-62.
192. Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, Ueland PM. Homocysteine and other thiols in plasma and urine: automated determination and sample stability. *Clin Chem* 1993;39:263-71.
193. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A Quantitative Assessment of Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Vascular Disease. Probable Benefits of Increasing Folic Acid Intakes. *JAMA* 1995;274:1049-57.
194. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJ, Eskes TK. Neural tube defects and derangement of homocysteine metabolism. *N Engl J Med* 1991;324:199-200.
195. Andersson A, Isaksson A, Hultberg B. Homocysteine export from erythrocytes and its implications for plasma sampling. *Clin Chem* 1992;38:1311-15.

196. Refsum H, Fiskerstrand T, Guttormsen AB, Ueland PM. Assessment of homocysteine status. *J Inher Metab Dis* 1997;20:286-94.
197. Møller J, Rasmussen K. Homocysteine in plasma: Stabilization of blood samples with fluoride. *Clin Chem* 1995;41:758-9.
198. Willems H, Bos G, Gerrits W, Heijer M, Vloet S, Blom H. Acidic citrate stabilizes blood samples for assay of total homocysteine. *Clin Chem* 1998;44:342-4.
199. Al-Khafaji F, Bowron A, Day AP, Scott J, Stansbie D. Stabilization of blood homocysteine by 3-deazaadenosine. *Ann Clin Biochem* 1998;35:780-782.
200. Hill DM, Johnson LJ, Burns PJ, Neale AM, Harmening DM, Kenney AC. Effects of Temperature on Stability of Blood Homocysteine in Collection Tubes Containing 3-Deazaadenosine. *Clin Chem* 2002;48:2017-2022.
201. Brandl R, Probst R, Blumke M., Neumeier D. Stabilization of homocysteine concentration in whole blood. *Clin Chem* 1998;44:1567-9.
202. Hughes P, Carlson TH, McLaughlin MK, Bankson D. Addition of sodium fluoride to whole blood does not stabilize plasma homocysteine but produces dilution effects on plasma constituents and hematocrit. *Clin Chem* 1998;44:2204-6.
203. Salazar JF, Herbeth B, Leroy P. Stability of blood homocysteine and other thiols: EDTA or acidic citrate? *Clin Chem* 1999;45:2016-19.
204. Martín I, Gibert MJ, Vila M, Pintos C, Obrador A, Malo O. Stabilization of blood homocysteine in an epidemiological setting. *Eur J Cancer Preven* 2001;10:473-6.
205. Shiphandler MT, Moore EG. Rapid, fully automated measurement of plasma homocyst(e)ine with the Abbott IMx® analyzer. *Clin Chem* 1995;41:991-4.
206. Woltersdorf WW, Browron A, Day AP, Scott J, Stansbie D. Abbott Imx homocysteine assay: significant interference by 3-deazaadenosine. *Ann Clin Biochem* 1999;36:533.
207. Dawling S. Stabilizing blood with 3-deazaadenosine interferes in the Abbott FPIA assay for plasma homocyst(e)ine. *Ann Clin Biochem* 1999;36:669-70.
208. Vester B, Rasmussen K. High performance liquid chromatography method for rapid and accurate determination of homocysteine in plasma and serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991;29:549-54.
209. Brattström LE, Israelsson B, Jeppson JO, Hultberg BL. Folic acid – an innocuous means to reduce plasma homocysteine. *Scand J Clin Lab Invest* 1988;48:215-21.
210. Frey González E, Sebastián Gámbaro MA. Cromatografía. En: Fuentes Arderiu X, Castiñeiras Lacambra MJ, Queraltó Compañó JM. *Bioquímica clínica y patología molecular*. 2ª ed. Barcelona: Reverté S.A.; 1998. p. 155-68.
211. Sierra March C. Cromatografía en fase líquida de alta eficacia. En: Fuentes Arderiu X, Castiñeiras Lacambra MJ, Queraltó Compañó JM. *Bioquímica clínica y patología molecular*. 2ª ed. Barcelona: Reverté S.A.; 1998. p. 399-408.
212. Bio-Rad. Homocysteine by HPLC. Instruction manual. Bio-Rad Laboratories; 1997.
213. Bio-Rad Laboratories. Homocysteine by HPLC. Disponible en: URL: <http://www.bio-rad.com/> (acceso 15/04/03).
214. Dias VC, Bamforth FJ, Tesanovic M, Hyndman ME, Parsons HG, Cemborowski GS. Evaluation and intermethod comparison of the Bio-Rad High-Performance Liquid Chromatographic Method for Plasma Total Homocysteine. *Clin Chem* 1998;44:2199-201.
215. Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1987;422:43-52.
216. Narayanan SR, Borchardt RT. Purification of bovine liver S-adenosylhomocysteine hydrolase by affinity chromatography on blue dextran-agarose. *Biochim Biophys Acta* 1988;965:22-8.
217. Schröder G, editora. European Evaluations. IMx Homocysteine. Wiesbaden-Delkenheim (Alemania): Abbott Diagnostics Division; 1998.
218. Leino A. Fully automated measurement of total homocysteine in plasma and serum on the Abbott IMx analyzer. *Clin Chem* 1999;45:569-71.
219. Pfeiffer CM, Twite D, Shih J, Holets-McCormack S, Gunter EW. Method comparison for total plasma homocysteine between the Abbott IMx analyzer and an HPLC assay with internal standardization. *Clin Chem* 1999;45:152-3.
220. Gómez González P, Navarro Marín T, Díaz Rubio P, Fernández Miranda C, Latorre Ibarra A, Vargas Gallego C, Martínez Fernández A. Evaluación de un procedimiento para determinar homocisteína en plasma por inmunoanálisis de fluorescencia polarizada. *Quim Clin* 2000;19:22-6.
221. Zhigetti ML, Chantarangkul V, Tripodi A, Mannucci PM, Cattaneo M. Determination of total homocysteine in plasma: comparison of the Abbott IMX immunoassay with high performance liquid chromatography. *Haematologica* 2002;87:89-94.
222. Pfeiffer CM, Huff DL, Smith SJ, Miller DT, Gunter EW. Comparison of Plasma Total Homocysteine Measurements in 14 Laboratories: An International Study. *Clin Chem* 1999 45:1261-1268.
223. Fraser CG, Hyltoft Petersen P, Libeer JC, Ricos C. Proposals for setting generally applicable quality goals solely based on biology. *Ann Clin Biochem* 1997;34:8-12.
224. Cobbaert C, Arentsen JC, Mulder P, Hoogerbrugge N, Lindemans J. Significance of various parameters derived from biological variability of lipoprotein(a), homocysteine, cysteine, and total antioxidant status. *Clin Chem* 1997;43:1958-64.
225. Rossi E, Beilby JP, McQuillan BM, Hung J. Biological variability and reference intervals for total plasma homocysteine. *Ann Clin Biochem* 1999;36:56-61.
226. SEQC (Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Biología Molecular). Base de datos de variación biológica. Disponible en: URL: <http://www.seqc.es/bd/ANEXOII.pdf> (acceso 18/4/03).
227. Møller J, Rasmussen K, Christensen L. External quality assessment of methylmalonic acid and total homocysteine. *Clin Chem* 1999;45:1536-42.
228. Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R, Robinson K, Savon SR, Secic M, y cols. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. *Clin Chem* 1994;40:873-81.
229. El-Khairy L, Vollset SE, Refsum H, Ueland PM. Predictors of change in plasma total cysteine: longitudinal findings from the Hordaland homocysteine study. *Clin Chem* 2003;49:113-20.

230. Bates CJ, Mansoor MA, Gregory J, Pentiev K, Prentice A. Correlates of plasma homocysteine, cysteine and cysteinylglycine in respondents in the British National Diet and Nutrition Survey of young people aged 4-18 years, and a comparison with the survey of people aged 65 years and over. *Br J Nutr* 2002;87:71-9.
231. Díez Gibert O. Técnicas de biología molecular. En: Fuentes Arderiu X, Castiñeiras Lacambra MJ, Queraltó Compañó JM. *Bioquímica clínica y patología molecular*. 2ª ed. Barcelona: Reverté S.A.; 1998. p. 409-42.
232. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, y cols. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet* 1995;1:111-3.
233. Van Amerongen G, Mathonnet F, Boucly C, Mathieu B, Vinatier I, Peltier JY y cols. An improved method for the detection of the thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Clin Chem* 1998;44:1045-7.
234. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000;151:862-77.



# 13 Caracterización del metabolismo homocisteína-folato en madres de defectos del tubo neural de Mallorca: nuestra casuística

## 13.1 Introducción

En Mallorca, la prevalencia total de los defectos del tubo neural (DTNs) para la década 90-99 fue de 1,32‰ (capítulo 8). Para este mismo periodo, según datos del EUROCAT (European Registration of Congenital Anomalies and Twins), nuestras cifras fueron similares a las del registro de Asturias y aparentemente superiores a las de los registros del País Vasco y de Barcelona (capítulos 7 y 8). Los registros del EUROCAT con mayor prevalencia total durante el lapso 1990-99 son los de Mainz (Alemania) con 1,84‰, Glasgow (Escocia) con 1,81‰ y Asturias con 1,31‰<sup>1</sup>.

Afortunadamente, dos terceras partes de estas malformaciones se pueden evitar mediante suplementos periconcepcionales de ácido fólico. La eficacia de esta medida de prevención primaria se ha establecido mediante ensayos clínicos, multicéntricos y multinacionales<sup>2,3</sup> que nos han aportado evidencias de gran calidad (sección 10.2.3). Lamentablemente, la proporción de suplementos tomados correctamente en nuestro entorno sigue siendo baja<sup>4,5</sup> (capítulo 11).

Los estudios sobre las concentraciones sanguíneas de folatos y de vitamina B<sub>12</sub> en las madres de los fetos afectados<sup>6-26</sup> nos han proporcionado resultados discordantes y, a menudo, no significativos, probablemente a causa del exiguo tamaño de las muestras y/o escasa magnitud de las diferencias entre casos y controles (sección 10.4.1). Aun con todo, Daly y cols. pudieron establecer una relación continua del tipo dosis-respuesta entre las concentraciones de folato y el riesgo de portar un feto con DTN<sup>27</sup>. Por otra parte, la cuantificación de folatos y de vitamina B<sub>12</sub> en sangre cuenta con numerosos inconvenientes como faltas de sensibilidad, especificidad, reproducibilidad interlaboratorios y un buen patrón oro de referencia<sup>28-32</sup> (capítulo 12).

La homocisteína (Hcy) es un aminotiol cuyo metabolismo se ve influido no sólo por el status de folatos, cobalamina y piridoxina<sup>33</sup>, sino también por la ingesta de metionina y por la agresión oxidativa (capítulo 9). De lo anterior se deriva la utilidad de la determinación de la Hcy total (tHcy) (oxidada y reducida) como determinación complementaria a la cuantificación de las vitaminas mencionadas con el fin de detectar sus deficiencias<sup>34-9</sup> (capítulo 12). De hecho, las reservas de folatos y cobalamina se caracterizan mejor tras el uso juicioso de varias magnitudes analíticas<sup>40-1</sup>.

En numerosos trabajos, se ha estudiado principalmente la remetilación y se han objetivado niveles de tHcy significativamente superiores en madres de DTNs que en controles, pero las diferencias entre las concentraciones de ambos grupos han

sido exiguas<sup>19,21,24</sup>. Las investigaciones que incluyen metabolitos de la transulfuración son más escasas<sup>24</sup>.

La mutación puntual C677T, responsable de la variedad termolábil de la enzima metilén-tetrahydrofolato reductasa (EC 1.7.99.5)<sup>42</sup>, ha sido la primera que se ha vinculado a los DTNs<sup>43</sup>. Bioquímicamente, se manifiesta en forma de niveles de tHcy ligeramente elevados, principalmente si los niveles de folatos son bajos<sup>44</sup>. En un trabajo previo hemos documentado, para nuestra población entre 15 y 65 años, unas prevalencias del genotipo T/T (homocigoto para la mutación C677T) del 18,5% y del 35,9% para el alelo T<sup>45</sup>.

El presente trabajo pretende estudiar en nuestro entorno las variables relacionadas con los DTNs que se han comentado previamente, entonces, nuestros objetivos son la valoración del metabolismo de la Hcy con relación al folato, la vitamina B<sub>12</sub>, el polimorfismo C677T y la transulfuración. De acuerdo con la información de la que disponemos, éste constituye el primer estudio de estas características efectuado en nuestro país.

## 13.2 Material y métodos

### 13.2.1 Participantes

El Comité de Ética de nuestro centro aprobó la realización de un estudio transversal, cuyas participantes se reclutaron entre mujeres presuntamente sanas, de edad fértil que habían parido o finalizado la lactancia al menos dos meses antes. Los casos se identificaron entre mujeres sometidas a interrupción gestacional en nuestro centro por feto con DTN, a partir de las historias clínicas de los nacidos con la mencionada anomalía, y mediante la información proporcionada por la Asociación Balear de Espina Bífida. Los controles se localizaron entre mujeres atendidas en una consulta de ginecología de un Centro de Atención Primaria y puérperas de nuestro hospital. Se excluyeron las participantes potenciales trasplantadas, toxicómanas, epilépticas, con endocrinopatías, procesos oncológicos, artritis reumatoide, psoriasis, malabsorción, anemia megaloblástica, nefropatía o hepatopatía y las consumidoras de fármacos antifolato o polivitamínicos en los dos meses previos. Al final, se identificaron 151 casos y 524 controles potenciales que se abordaron durante la visita médica o telefónicamente. De entre las mujeres con las que se pudo contactar, 53 casos cumplieron los criterios de inclusión y aceptaron participar, entonces, los controles se fueron reclutando hasta obtener aproximadamente tres para cada caso. Los 53 casos eran madres de DTNs no vinculados ni a síndromes génicos, ni cromosómicos, ni a secuencias, ni a asociaciones de alta frecuencia; en total eran 26 acráneos, 26 mielomeningoceles y un encefalocele. Los 184 controles tenían al menos dos hijos sanos y ningún antecedente de hijo malformado, aborto espontáneo o complicación obstétrica, además nunca habían tomado suplementos periconcepcionales de ácido fólico. A las participantes se les proporcionó información escrita de los motivos y de la finalidad del estudio, y todas otorgaron su consentimiento oral.

Se obtuvo información sobre variables sociodemográficas y otras variables que

podían afectar las concentraciones de tHcy<sup>46-7</sup>; y se extrajeron muestras de sangre venosa en ayunas que se guardaron en tubos Vacutainer™ (Beckton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). Se valoraron las concentraciones de ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> en suero; tHcy y cisteína total (tCys) en plasma; y el polimorfismo C677T. La transulfuración de la Hcy se valoró mediante el cociente tCys/tHcy<sup>48</sup>. Además, se realizó un perfil analítico rutinario, con hemograma, estudio bioquímico hepatorenal y proteína C reactiva que fue normal en todas las participantes. También se valoró la fase del ciclo menstrual con la ayuda de las concentraciones de progesterona, puesto que hay datos en la literatura sobre su posible interferencia en la cuantificación de la tHcy<sup>49-50</sup>.

### 13.2.2 Métodos analíticos

Las muestras para las determinaciones de tHcy y tCys se recogieron en tubos con EDTA a los que previamente se les había añadido 3-deazaadenosina (D8296, Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) a una concentración final de 50 µmol/L en sangre total. Este estabilizador nos permitió diferir la centrifugación de las muestras hasta cuatro horas postextracción<sup>51</sup>. El plasma obtenido se dividió en dos partes alícuotas y se guardó a -80°C hasta el momento de su procesamiento. La primera se utilizó para la medición de la tHcy mediante el método de inmunofluorescencia polarizada (FPIA) Abbott IMx™ (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EE.UU.)<sup>52</sup>. Los coeficientes de variación (CVs) intraserials para los controles con concentraciones bajas, medias y altas dispensados con el kit fueron 1,5%, 1,3% y 1,6%; los CVs interserials fueron 4,1%, 3,5% y 3,3% respectivamente. La segunda parte alícuota se usó para la determinación de tHcy y tCys mediante HPLC (high performance liquid chromatography) con un kit de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) que usa un sistema isocrático. Se mezclaron 50 µL de muestra, con 100 µL del estándar interno, 50 µL de tri-n-alkilfosfina como agente reductor y 100 µL de ABD-F (ácido 4-amino-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol sulfónico) para derivatizar los aminotioles. Se incubó la mezcla a 50°C durante cinco minutos y después a 4°C durante otros cinco minutos. Se utilizó ácido tricloroacético para hacer precipitar las proteínas plasmáticas y se centrifugó la mezcla a 10 000g durante cinco minutos para separar el sobrenadante. Se inyectaron 20 µL de la solución en un sistema cromatográfico que consta de la columna Novapack C18, la bomba Waters 600-E y el Waters 474 scanning fluorescence detector; las mediciones se efectuaron por medio del Millennium 2010 Chromatography Manager (todo de Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.). Las longitudes de onda necesarias para la detección de los tioles marcados con ABD-F fueron de 385 nm para la excitación y 515 nm para la emisión, respectivamente. El CV interserial para los controles con concentraciones altas de tHcy fue 5,6%.

La vitamina B<sub>12</sub> y el folato séricos se cuantificaron a partir de muestras recogidas en tubos con separador de suero mediante un kit de radioinmunoensayo de Simultrac-SNB (ICN, Orangeburg, NY, EE.UU.). El kit tiene CVs interensayo proporcionados por Lyphocheck para concentraciones bajas, medias y altas de folato de 12,1, 9,3 y 11,7% respectivamente.

La mutación puntual C677T de la enzima metilén-tetrahidrofolato reductasa se

estudió en muestras recogidas en tubos de EDTA. La técnica utilizada siguió el método original de Frosst y cols.<sup>53</sup>. El ácido desoxirribonucleico (ADN) se extrajo mediante el kit Wizard™ genomic DNA (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Se utilizó el kit PCR core System I kit (Promega) y se añadieron dos cebadores (Genset Oligos, Genset, París, Francia) que produjeron fragmentos de 198 pares de bases. Las secuencias de los cebadores sentido y antisentido fueron: 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' y 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3' respectivamente. Se realizaron 35 ciclos (95°C durante 60 segundos, 62°C durante 90 segundos, 72°C durante 60 segundos) en el termociclador OmniGene TR3 CM 220 (Hybaid Limited, Middlesex, Reino Unido). Los fragmentos se cortaron con la enzima de restricción HinfI (Promega) que reconoce la sustitución C-T, digiriendo así los alelos mutados. Como resultado de lo anterior, se obtienen dos fragmentos de 175 y 23 pares de bases si la mutación está presente. Los fragmentos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y se tiñeron con bromuro de etidio.

### 13.2.3 Métodos estadísticos

El análisis estadístico se realizó con ayuda de los programas SPSS™ (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.) y el Confidence Interval Analysis 2.0.0 (BMJ Books, Bristol, Reino Unido). Se estudiaron las diferencias entre proporciones mediante el test de  $\chi^2$ , aunque si los efectivos esperados eran menores de cinco se recurrió al test exacto de Fisher. El test de Mann-Whitney valoró las diferencias entre variables continuas, dado que ninguna de ellas seguía una distribución normal. El coeficiente de Pearson evaluó la correlación lineal. La ecuación no paramétrica de Passing-Bablok relacionó mediciones de la misma magnitud bioquímica obtenidas con distintos métodos analíticos. El nivel de significación elegido fue del 5% ( $p < 0,05$ ) para dos colas.

## 13.3 Resultados

En la tabla 13.1 se aprecia que los valores para las distintas variables que podían influir sobre las concentraciones de tHcy (índice de Quetelet, colesterolemia, hábitos tabáquico y enólico, consumo de café, actividad física, consumo de alimentos ricos en folatos, condición socioeconómica, ciclo menstrual) fueron similares en ambos grupos, salvo la edad que fue ligeramente superior en los controles ( $p = 0,017$ ), la actividad física (mayor en los controles) ( $p < 0,001$ ) y la tensión arterial diastólica (más alta en los casos) ( $p = 0,049$ ). Dos de los casos (4%) y dos de los controles (1%) declararon consumir vegetales una o ninguna vez a la semana, siendo las proteínas de su dieta predominantemente animales ( $p = 0,217$ ).

**Tabla 13.1.- Características de los casos y los controles.**

Variable (unidad)		Casos (n=53) Mediana (límite inferior-límite superior)	Controles (n=184) Mediana (límite inferior-límite superior)	p
<i>Edad (años)</i>		35 (25-49)	39 (22-50)	<b>0,017</b>
<i>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</i>		25,2 (20,2-37,2)	24,2 (17,9-41,3)	0,199
<i>Colesterol sérico (mg/dL)</i>		201,5 (120,0-348,0)	197,0 (134,0-318,0)	0,541
		<b>No. (%)</b>	<b>No. (%)</b>	
<i>Hábito tabáquico (cigarrillos/día)</i>	0	35 (66%)	112 (61%)	0,410
	1-19	9 (17%)	47 (25%)	
	≥20	9 (17%)	25 (14%)	
<i>Alcohol (g/día)</i>	0	46 (87%)	158 (86%)	0,864
	1-48	7 (13%)	26 (14%)	
<i>Consumo de café (tazas/día)</i>	<i>Ninguna</i>	25 (47%)	60 (33%)	0,116
	1-2	21 (40%)	101 (55%)	
	> 2	7 (13%)	23 (12%)	
<i>Actividad física<sup>1</sup></i>	<i>Leve</i>	24 (45%)	29 (16%)	<b>&lt;0,001</b>
	<i>Moderada</i>	24 (45%)	143 (78%)	
	<i>Activa</i>	5 (10%)	12 (6%)	
<i>Tensión arterial diastólica (mmHg)</i>	<70	12 (23%)	70 (38%)	<b>0,049</b>
	70-84	31 (58%)	96 (52%)	
	≥85	10 (19%)	18 (10%)	
<i>Consumo de alimentos ricos en folatos<sup>2</sup></i>	0-3 días/semana	23 (43%)	106 (58%)	0,067
	4-7 días/semana	30 (57%)	78 (42%)	
<i>Condición socioeconómica<sup>3</sup></i>	<i>Grupo A</i>	8 (15%)	25 (14%)	0,386
	<i>Grupo B</i>	14 (26%)	34 (18%)	
	<i>Grupo C</i>	31 (59%)	125 (68%)	
<i>Ciclo menstrual</i>	<i>Fase lútea</i>	19 (36%)	60 (33%)	0,756
	<i>Fase proliferativa</i>	22 (41%)	85 (46%)	
	<i>Anticoncepción oral</i>	12 (23%)	39 (21%)	

n (número de participantes), BMI (body mass index o índice de masa corporal).

<sup>1</sup> Actividad física leve (sedentarismo, actividad inferior a las otras dos categorías), moderada (deambulación o bicicleta durante cuatro o más horas semanales), activa (cuatro o más horas semanales de entrenamiento deportivo).

<sup>2</sup> Valorados según consumo diario de una ración de coliflor, coles de Bruselas o espinacas y/o de dos o más raciones de guisantes, judías verdes, aguacate, patata, lechuga, o naranja.

<sup>3</sup> La condición socioeconómica es la del miembro de la pareja que la tiene más alta. Grupo A (profesionales, técnicos y directivos), B (administrativos, comerciantes, vendedores y estudiantes), C (sector servicios, trabajadores manuales, pensionistas y rentistas).

Los valores de p significativos se han destacado en negrita.

La tabla 13.2 muestra los resultados para las magnitudes bioquímicas escrutadas en casos y controles. Las concentraciones de tHcy medidas tanto con FPIA como con HPLC fueron significativamente inferiores en los casos (p=0,001), aunque los valores de las medianas están dentro de los intervalos de referencia para ambos grupos y los valores máximos (16,9 μmol/L para los casos y 21,1 μmol/L para los controles si el método era la FPIA frente a 14,5 μmol/L y 28,0 μmol/L si el método era la HPLC) sólo son indicativos de hiperhomocisteinemia leve (sección 12.3.3.22 y tabla 12.6). La ecuación obtenida al comparar 237 pares de concentraciones de tHcy

medidas mediante FPIA (y) y HPLC (x) fue  $y=1,0x+0,9$  y los valores de los intervalos de confianza del 95% fueron de 0,9-1,1 para la pendiente y de 0,5-1,2 para el residual.

**Tabla 13.2.- Concentraciones de aminoácidos y vitaminas en casos y controles.**

Magnitud bioquímica (unidad)	Casos (n=53) Mediana	Controles (n=184) Mediana	Medianas de las diferencias (IC 95%)	p
tHcy ( $\mu\text{mol/L}$ ) (FPIA)	6,6	7,4	<b>-0,8 (-1,4--0,2)</b>	<b>0,001</b>
tHcy ( $\mu\text{mol/L}$ ) (HPLC)	5,3	6,6	<b>-1,0 (-1,7--0,5)</b>	<b>0,001</b>
tCys ( $\mu\text{mol/L}$ )	183,3	181,0	3,4 (-5,2--12,1)	0,441
tCys/tHcy	34,2	27,1	<b>6,1 (3,3-8,8)</b>	<b>&lt;0,001</b>
Folato sérico (ng/mL)	3,8	5,4	<b>-1,3 (-2,2--0,6)</b>	<b>0,001</b>
Vitamina B <sub>12</sub> sérica (pg/mL)	445,0	476,0	-26,0 (-96,0-46,0)	0,453

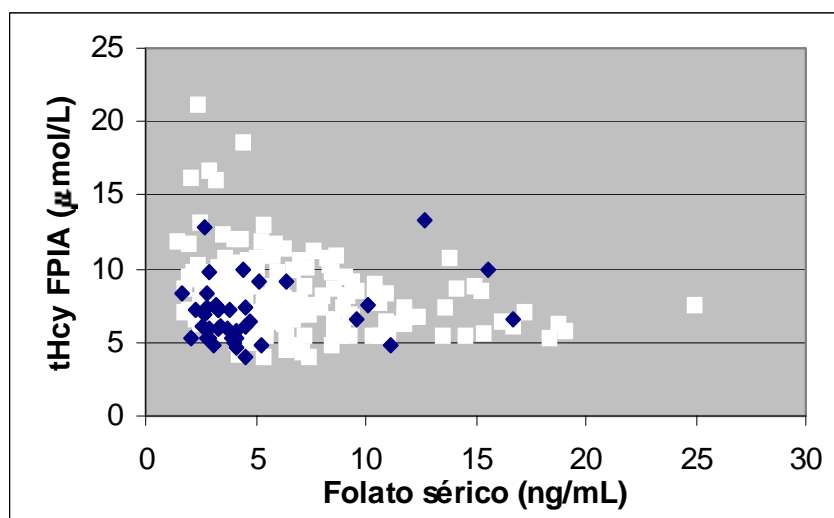
n (número de participantes), tHcy (homocisteína total), FPIA (inmunofluorescencia polarizada), HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), tCys (cisteína total). Los valores de p significativos se han destacado en negrita.

Con respecto a la tCys, no se objetivaron diferencias entre ambos grupos, y sus medianas fueron muy similares (183,3  $\mu\text{mol/L}$  para los casos frente a 181,0  $\mu\text{mol/L}$  para los controles) ( $p=0,441$ ). Al contrario, el cociente tCys/tHcy fue significativamente superior en los casos ( $p<0,001$ ) y la mediana de la diferencia entre los valores de esta magnitud para casos y controles fue de 6,1. Además, los valores extremos para los casos fueron 13,8-86,1 para los casos y 7,0-57,0 para los controles.

Los niveles de folatos séricos (ng/mL) fueron significativamente inferiores para los casos (3,8 (1,7-6,7) (mediana (valores extremos)) que para los controles (5,4 (1,5-25,0)) ( $p=0,001$ ), sin embargo no hallamos diferencias estadísticamente significativas con relación a las concentraciones de cobalamina (445 pg/mL para los casos frente a 476 pg/mL para los controles) ( $p=0,453$ ). Para los casos, los valores del coeficiente de correlación de Pearson entre el folato sérico y la tHcy tanto medida con HPLC como con FPIA fueron bajos (HPLC:  $r=-0,13$ ; FPIA:  $r=0,23$ ) y sin significación estadística (HPLC:  $p=0,46$ ; FPIA:  $p=0,13$ ), mientras que para los controles, las correlaciones alcanzaron valores superiores y significativos (HPLC:  $r=-0,25$ ,  $p=0,01$ ; FPIA:  $r=-0,24$ ,  $p=0,01$ ), aunque las mencionadas cifras sólo indican correlación débil (figura 13.1).

La prevalencia de los distintos genotipos y alelos correspondientes al polimorfismo C677T se representan en las tablas 13.3 y 13.4. Las proporciones son muy parecidas en casos y controles, esto es, 6% de genotipos T/T en casos y 7% en controles ( $p=0,246$ ) mientras que el 20% de los alelos T pertenecen a los casos y el 27% a los controles ( $p=0,154$ ). La odds ratio atribuida al genotipo T/T frente a los genotipos C/T y C/C agrupados de ser portadora de un hijo con DTN es del 0,86 (intervalo de confianza del 95% 0,18-3,45).

**Figura 13.1.- Correlación entre el folato sérico y la homocisteína total (FPIA) en casos y controles.**



FPIA (inmunofluorescencia polarizada). Casos (rombos negros;  $r=0,23$ ;  $p=0,13$ ), controles (cuadrados blancos;  $r=-0,24$ ;  $p=0,01$ ).

La presencia del alelo C677T en homocigosis tiene un efecto hiperhomocisteinémico que es significativo si utilizamos los valores de tHcy obtenidos por medio de HPLC ( $p=0,034$ ), y se acentúa al incluir a las participantes con folatemia en suero inferior a la mediana de los controles (5,4 ng/mL) ( $p=0,005$  para la HPLC) (tabla 13.5).

**Tabla 13.3.- Genotipos C677T en casos y controles.**

	Genotipo (% , IC 95% , n)		
	C/C	C/T	T/T
<b>Casos (n=53)</b>	66 (52-78) (35)	28(17-42) (15)	6 (1-17) (3)
<b>Controles (n=184)</b>	53 (46-60) (98)	40 (33-48) (74)	7 (3-11) (12)

( $\chi^2=2,80$ ;  $p=0,246$ )

IC (intervalo de confianza), n (número de participantes), C/C (homocigotos "wild type"), C/T (heterocigotos C677T), T/T (homocigotos C677T).

**Tabla 13.4.- Alelos C677T en casos y controles.**

	<b>C (% , n)</b>	<b>T (% , n)</b>
<b>Casos (n=106)</b>	80 (85)	20 (21)
<b>Controles (n=368)</b>	73 (270)	27 (98)

$$(\chi^2=2,03; p=0,154)$$

n (número de alelos), C (alelo “wild type”), T (alelo C677T).

**Tabla 13.5. tHcy (μmol/L) según el genotipo C677T.**

Concentraciones de tHcy (μmol/L)		Medianas (límites inferior-superior)		p
		C/C y C/T	T/T	
Todas las participantes	<i>Método analítico</i>	<b>n=222</b>	<b>n=15</b>	
	<i>FPIA</i>	6,3 (2,4-28,0)	7,4 (4,5-14,1)	0,103
	<i>HPLC</i>	7,2 (4,0-21,1)	8,3 (5,5-16,2)	<b>0,034</b>
Sólo participantes con folatemia inferior a la mediana de los controles*	<i>Método analítico</i>	<b>n=113</b>	<b>n=9</b>	
	<i>FPIA</i>	6,4 (2,4-28,0)	7,5 (5,0-14,1)	0,063
	<i>HPLC</i>	7,2 (4,0-21,1)	8,9 (7,1-16,2)	<b>0,005</b>

n (número de participantes), FPIA (inmunofluorescencia polarizada), HPLC (cromatografía líquida de alta resolución).

\* Casos y controles con concentración de folato sérico inferior a 5,4 ng/mL (mediana de los controles). Los valores de p significativos se han destacado en negrita.

## 13.4 Discusión y conclusiones

A diferencia de otros trabajos, hemos objetivado unos valores significativamente más bajos de tHcy para los casos. Los mismos se han visto corroborados por el uso de dos métodos distintos para medir la tHcy. La FPIA simplifica mucho el análisis de las muestras y se va consolidando como alternativa al método de referencia, la HPLC<sup>45,54-5</sup>. Por otra parte, la diferencia entre los valores de tHcy no es atribuible a las diferencias entre las variables expuestas en la tabla 13.1. Aunque la edad es significativamente superior en los controles, la diferencia es mínima, por lo que es muy improbable que cause los cambios observados. Los casos realizaban menor actividad física y tenían la tensión arterial diastólica más alta, y ello, en todo caso, tendría que favorecer el ascenso de la tHcy de acuerdo con los resultados del estudio Hordaland<sup>47,56</sup> y no el descenso. Además, la selección de los controles fue muy rigurosa. La elección de mujeres con dos o más hijos sanos, sin ningún aborto ni otro antecedente obstétrico desfavorable, y que nunca habían tomado suplementos periconcepcionales con ácido fólico pretendía potenciar las diferencias entre este grupo y las madres de los DTNs, puesto que la hiperhomocisteinemia también se relaciona con problemas obstétricos<sup>57-9</sup>. En definitiva, nuestros criterios de selección fueron más estrictos que los utilizados por otros autores<sup>19,21,24</sup>.

Cabe destacar la gran diferencia existente en los valores de la ratio tCys/tHcy<sup>48</sup> entre casos y controles. Su incremento en los casos indica un desvío de la Hcy hacia la formación de cisteína. Los niveles de tHcy inferiores de los casos son compatibles con un incremento de la actividad de la cistationina β-sintetasa (CBS; EC 4.2.1.22)



aislado o asociado a otras disfunciones enzimáticas. La disminución de la tHcy sería el resultado de la elevada afinidad de la CBS por la Hcy, lo cual la hace muy sensible a los cambios de concentración de su sustrato<sup>60</sup>. Como ya hemos comentado en el capítulo 9, la CBS se activa por el aumento de S-adenosil-metionina (SAME)<sup>61</sup> y por el estrés oxidativo<sup>60</sup>. La mayor disponibilidad de SAME obedece a la mayor presencia de metionina, que procede básicamente de las proteínas de la dieta; y sólo el 4% de nuestros casos afirmaron tener una dieta rica en proteínas animales, por lo tanto, el estrés oxidativo nos parece la hipótesis más probable. En presencia de condiciones oxidativas, la transulfuración aumenta y las reacciones de transmetilación disminuyen (inhibición de la metionina sintetasa (EC 2.1.1.13)<sup>62</sup> y de las isoenzimas I y III de la metionina adenosil-transferasa (EC 2.5.1.6))<sup>63-4</sup>. La clave del incremento de la transulfuración en condiciones oxidativas reside en la génesis de glutatión, tripéptido que precisa la cisteína para su formación. Recordamos que esta molécula es fundamental en la defensa antioxidante de los mamíferos<sup>65</sup>. La cuantificación de los coenzimas intraeritrocitarios de los folatos, y de los sustratos y productos de las enzimas implicadas en el metabolismo de la Hcy contribuiría a respaldar o a refutar nuestra hipótesis. Pero si ésta se confirmara, estaríamos en la línea de los trabajos de Kirke y cols.<sup>17</sup>, Steegers-Theunissen y cols.<sup>19</sup>, Mills y cols.<sup>21</sup> o de Lucock y cols.<sup>24</sup> que atribuyen los DTNs a un trastorno de la remetilación de la Hcy de origen materno, disfunción enzimática que también acompaña a la agresión oxidativa. En resumen, el estrés oxidativo interferiría en la remetilación, reduciendo la disponibilidad de tetrahidrofolato y también de SAME lo cual repercutiría en la síntesis del ADN y en su ulterior metilación.

La concentración de folato sérico (metil-tetrahydrofolato) inferior en los casos reproduce los resultados de otros trabajos<sup>13,18</sup>. No creemos que este hallazgo se deba a diferencias en la ingesta, ya que aparentemente el consumo de alimentos ricos en folatos era similar, o incluso superior, en las madres de los DTNs. La malabsorción selectiva de folatos podría ser la causa, pero ello es hasta el momento sólo una hipótesis plausible según la investigación de Boddie y cols.<sup>66</sup> que necesita validarse en estudios más amplios. La depleción relativa de metil-tetrahydrofolato perturba la síntesis de purinas y pirimidinas, así como la remetilación, al disminuir la disponibilidad de metionina, aunque ello puede corregirse mediante suplementos de ácido fólico. La falta de correlación entre las concentraciones de folato sérico y tHcy en los casos apunta hacia la hipoactividad de la metionina sintetasa, que no causa hiperhomocisteinemia por permanecer la vía de la transulfuración indemne<sup>33</sup>. De nuevo, el estrés oxidativo podría ser la clave de este hallazgo.

La ausencia de diferencias en las concentraciones de vitamina B<sub>12</sub> entre casos y controles se ha documentado en otros trabajos que no han encontrado relación entre esta vitamina y las anomalías congénitas que nos ocupan<sup>13,18</sup>.

Como la frecuencia del polimorfismo C677T es similar tanto en casos como en controles, no hemos detectado asociación significativa alguna entre el polimorfismo C677T y los DTNs, pero nuestros resultados no son definitivos a causa de la amplitud del intervalo de confianza. Recientemente Gutiérrez Revilla y cols. han informado de una odds ratio del genotipo T/T frente a los otros dos restantes de tener un hijo con un DTN de 0,67 (intervalo de confianza del 95% 0,14-2,61) entre madres de pacientes y sus controles atendidos en el Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, resultados muy similares a los nuestros,

pero también con un intervalo de confianza lo suficientemente amplio como para obligarnos a ser prudentes en nuestras conclusiones<sup>67</sup>. Por otra parte, en este trabajo la distribución de las frecuencias de los alelos y genotipos según la mutación puntual C677T no se corresponde con la documentada para la población general femenina mallorquina<sup>45</sup>. Atribuimos nuestros resultados a que nuestras participantes no son representativas de la población general, puesto que están en edad fértil (no son mujeres ni menopáusicas ni postmenopáusicas) y son madres (no hay mujeres de menos de 22 años), lo que acota el tramo de edad de las mismas. Nuestra situación se asemeja a la de la población italiana, en la que la alta frecuencia de los homocigotos T/T no se traduce en cifras de prevalencia total extremadamente altas, sin embargo, sí que se ha documentado una mayor frecuencia del genotipo T/T entre los afectados italianos de espina bífida<sup>68</sup>. Por último, el único efecto que hemos podido reproducir para el genotipo T/T es la hiperhomocisteinemia leve tanto en casos como en controles, que se exagera con concentraciones bajas de folatos, lo cual reproduce los hallazgos de Jacques y cols.<sup>44</sup>.

En definitiva, nuestros resultados apoyan un desequilibrio entre la remetilación y la transulfuración. La profundización en el estudio de las circunstancias asociadas mediante la valoración de los aminoácidos implicados en el metabolismo de la Hcy, las coenzimas del folato, la metilación del ADN o el estrés oxidativo constituyen líneas de investigación novedosas que pueden contribuir al esclarecimiento de la patogenia de estas anomalías.

## 13.5 Bibliografía

1. EUROCAT. Report 8 Customised Tabulations. Disponible en: URL: <http://www.eurocat.ulster.ac.uk/pubdata/report8tab.html> (acceso 3/3/03).
2. MRC Vitamin Study Group. Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991;338:131-7.
3. Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992;327:1832-5.
4. Gibert MJ, Juncosa N, Martín I. Prevención primaria de los defectos del tubo neural en la población atendida en un hospital de referencia. *Prog Obstet Ginecol* 2000;43:13-20.
5. Gibert MJ, Martín I, Ramos M. Uso de folatos para la prevención de los defectos del tubo neural en la población atendida en un hospital de referencia [carta]. *Med Clin (Barc)*. En prensa 2003.
6. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 1976;51:944-50.
7. Bower C, Stanley FJ. Dietary folate as a risk factor for neural-tube defects: evidence from a case-control study in Western Australia. *Med J Aust* 1989;150:613-9.
8. Emery AE, Timson J, Watson-Williams EJ. Pathogenesis of spina bífida. *Lancet* 1969;2:909-10.
9. Hall MH. Folate and the fetus [carta]. *Lancet* 1977;1:648-9.
10. Schorah CJ, Smithells RW, Scott J. Vitamin B12 and anencephaly. *Lancet* 1980;i:880.
11. Laurence KM, James N, Miller MH, Tennant GB, Campbell H. Increased risk of recurrence of pregnancies complicated by fetal neural tube defects in mothers receiving poor diets, and possible benefit of dietary counselling. *Br Med J* 1980;281:1592-4.
12. Molloy AM, Kirke P, Hillary I, Weir DG, Scott JM. Maternal serum folate and vitamin B<sub>12</sub> concentrations in pregnancies associated with neural tube defects. *Arch Dis Child* 1985;60:660-5.
13. Yates JR, Ferguson-Smith MA, Shenkin A, Guzmán-Rodríguez R, White M, Clark BJ. Is disordered folate metabolism the basis for the genetic predisposition to neural tube defects? *Clin Genet* 1987;31:279-87.
14. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJ, Eskes TK. Neural tube defects and derangement of homocysteine metabolism. *N Engl J Med* 1991;324:199-200.
15. Economides DL, Ferguson J, Mackenzie IZ, Darley J, Ware II, Holmes-Siedle M. Folate and vitamin B12 concentrations in maternal and fetal blood, and amniotic fluid in second trimester pregnancies complicated by neural tube defects. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99:23-5.
16. Mills JL, Tuomilehto J, Yu KF, Colman N, Blaner WS, Koskela P, Rundle WE, Forman M, Toivanen L, Rhoads GG. Maternal vitamin levels during pregnancies producing infants with neural tube defects. *J Pediatr* 1992;120:863-71.
17. Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DG, Scott JM. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Q J Med* 1993;86:703-8.
18. Wild J, Schorah CJ, Sheldon TA, Smithells RW. Investigation of factors influencing folate status in women who have

- had a neural tube defect-affected infant. *Br J Obstet Gynaecol* 1993;100:546-9.
19. Steegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Trijbels FJM, Finkesstein JD, Blom HJ, Thomas CMG, y cols. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects?. *Metabolism* 1994;43:1475-80.
  20. Adams MJ Jr, Khoury MJ, Scanlon KS, Stevenson RE, Knight GJ, Haddow JE, y cols. Elevated midtrimester serum methylmalonic acid levels as a risk factor for neural tube defects. *Teratology* 1995;51:311-7.
  21. Mills JL, Mc Partlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, Scott JM. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 1995;345:149-51.
  22. Wald NJ, Hackshaw AK, Stone R, Sourial NA. Blood folic acid and vitamin B<sub>12</sub> in relation to neural tube defects. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:319-24.
  23. van der Put NM, Thomas CM, Eskes TK, Trijbels FJ, Steegers-Theunissen RP, Mariman EC y cols. Altered folate and vitamin B12 metabolism in families with spina bifida offspring. *QJM*. 1997;90:505-10.
  24. Lucock MD, Daskalakis I, Lumb CH, Schorah CJ, Levene MI. Impaired regeneration of monoglutamyl tetrahydrofolate leads to cellular folate depletion in mothers affected by a spina bifida pregnancy. *Mol Genet Metabol* 1998;65:18-30.
  25. Ubbink JB, Christianson A, Bester MJ, Van Allen MI, Venter PA, Delport R, y cols. 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* 1999;48:269-74.
  26. Afman LA, Van Der Put NM, Thomas CM, Trijbels JM, Blom HJ. Reduced vitamin B12 binding by transcobalamin II increases the risk of neural tube defects. *QJM* 2001;94:159-66.
  27. Daly LE, Kirke PN, Molloy A, Weir DG, Scott JM. Folate levels and neural tube defects. *JAMA* 1995;274:1698-702.
  28. Phillips DR, Wright AJ. Studies on the response of *Lactobacillus casei* to different folate monoglutamates. *Br J Nutr* 1982;47:183-9.
  29. Brown RD, Jun R, Hughes W, Watman R, Arnold B, Kronenberg H. Red cell folate assays: some answers to current problems with radioassay variability. *Pathology* 1990;22:82-7.
  30. Jaffe JP, Schilling RF. Erythrocyte folate levels: a clinical study. *Am J Hematol* 1991;36:116-21.
  31. Van den Berg H, Finglas PM, Bates C. FLAIR intercomparisons on serum and red cell folate. *Int J Vitam Nutr Res* 1994;64:288-93.
  32. Haltmayer M, Mueller T, Poelz W. Erythrocyte mean cellular volume and its relation to serum homocysteine, vitamin B<sub>12</sub> and folate. *Acta Med Austriaca* 2002;29:57-60.
  33. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998;157 [Suppl 2]:S40-S44.
  34. Kang SS, Wong PWK, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism* 1987;36:458-62.
  35. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest* 1988;81:466-74.
  36. Miller JW, Ribaya-Mercado JD, Russell RM, Shepard DC, Morrow FD, Cochary EF, y cols. Effect of vitamin B-6 deficiency on fasting plasma homocysteine concentrations. *Am J Clin Nutr* 1992;55:1154-60.
  37. Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993;270:2693-8.
  38. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993;39:1764-79.
  39. Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R, Robinson K, Savon SR, Secic M, y cols. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. *Clin Chem* 1994;40:873-81.
  40. Zittoun J, Zittoun R. Modern clinical testing strategies in cobalamin and folate deficiency. *Semin Hematol* 1999;36:35-46.
  41. Klee GG. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B<sub>12</sub> and folate. *Clin Chem* 2000;46(8 Pt 2):1277-83.
  42. Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988;43:414-21.
  43. van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van den Heuvel LP y cols. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995;346:1070-1.
  44. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, y cols. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93:7-9.
  45. Martín I, Obrador A, Gibert MJ, Hernanz A, Fuster A, Pintos C, y cols. Folate status and a new repletion cut-off value in a group of healthy Majorcan women. *Clin Nutr* 2003;22:53-8.
  46. Miner SES, Evrovski J, Cole DEC. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem* 1997;30:189-201.
  47. Ueland PM, Nygard O, Vollset SE, Refsum H. The Hordaland Homocysteine Studies. *Lipids* 2001;36 Suppl:S33-9.
  48. Hortin GL, Sullivan P, Csako G. Relationships among plasma homocysteine, cysteine and albumin concentrations: Potential utility of assessing the cysteine/homocysteine ratio. *Clin Chem* 2001;47:1121-4.
  49. Tallova J, Tomandl J, Bicikova M, Hill M. Changes of plasma total homocysteine levels during the menstrual cycle. *Eur J Clin Invest* 1999;29:1041-4.
  50. Tallova J, Bicikova M, Hill M, Tomandl J, Valentova D. Homocysteine during the menstrual cycle in depressive women. *Eur J Clin Invest* 2003;33:268-73.
  51. Martín I, Gibert MJ, Vila M, Pintos C, Obrador A, Malo O. Stabilization of blood homocysteine in an epidemiological setting. *Eur J Cancer Prev* 2001;10:473-6.
  52. Shipchandler MT, Moore EG. Rapid, fully automated measurement of plasma homocyst(e)ine with the Abbott IMx analyzer. *Clin Chem* 1995;41:991-4.
  53. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, y cols. A candidate gene risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
  54. Gómez González P, Navarro Marín T, Díaz-Rubio P, Fernández-Miranda C, Latorre Ibarra A, Vargas Gallego C, Martínez Fernández A. Evaluación de un procedimiento para determinar homocisteína en plasma por inmunoanálisis de fluorescencia polarizada. *Química Clínica* 2000;19:22-6.

55. Tripodi A, Chantarangkul V, Lombardi R, Lecchi A, Mannucci PM, Cattaneo M. Multicenter study of homocysteine measurement--performance characteristics of different methods, influence of standards on interlaboratory agreement of results. *Thromb Haemost* 2001;85:291-5.
56. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, Ueland PM, Kvale G. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 1995;274:1526-33.
57. Dekker GA, de Vries JIP, Doelitzsch PM, Huijgens PC, von Blomberg BME, Jakobs C, van Geijn HP. Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:1042-8.
58. De Vries JI, Dekker GA, Huijgens PC, Jakobs C, Blomberg BM, van Geijn HP. Hyperhomocysteinaemia and protein S deficiency in complicated pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1997;104:1248-54.
59. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessin HK, Monsen ALB, Ueland PM. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 2000;71:962-8.
60. Taoka S, Ohja S, Shan X, Kruger WD, Banerjee R. Evidence for heme-mediated redox regulation of human cystathionine  $\beta$ -synthase activity. *J Biol Chem* 1998;273:25179-84.
61. Finkelstein JD, Kyle WE, Martin JJ, Pick AM. Activation of cystathionine synthase by adenosylmethionine and adenosylethionine. *Biochem Biophys Res Commun* 1975;66:81-7.
62. Chen Z, Chakraborty S, Banerjee R. Demonstration that mammalian methionine synthases are predominantly cobalamin-loaded. *J Biol Chem* 1995;270:19246-9.
63. Sánchez-Góngora E, Ruiz F, Mingorance J, An W, Corrales JM, Mato JM. Interaction of liver methionine adenosyltransferase with hydroxyl radical. *FASEB J* 1997;11:1013-19.
64. Ruiz F, Corrales FJ, Miqueo C, Mato JM. Nitric oxide inactivates rat hepatic methionine adenosyltransferase in vivo by S-nitrosylation. *Hepatology* 1998;28:1051-7.
65. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999;19:217-46.
66. Boddie AM, Dedlow ER, Nackashi JA, Opalko FJ, Kauwell GP, Gregory JF 3rd, Bailey LB. Folate absorption in women with a history of neural tube defect-affected pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2000 Jul;72:154-8.
67. Gutiérrez Revilla JI, Pérez Hernández F, Calvo Martín MT, Tamparillas Salvador M, Gracia Romero J. Implicación de los polimorfismos C677T y A1298C del gen MTHFR en el desarrollo de los defectos del tubo neural en la población española. *Med Clin (Barc)* 2003;120:441-5.
68. de Franchis R, Buoninconti A, Mandato C, Pepe A, Sperandeo MP, Del Gado R, y cols. The C677T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene is a moderate risk factor for spina bifida in Italy. *J Med Genet* 1988;35:1009-13.

# 14 Conclusiones finales

Las principales *conclusiones* derivadas de las investigaciones originales presentadas en esta tesis son:

1. La prevalencia total de defectos del tubo neural (DTNs) en la isla de Mallorca para la década 1990-99 es de 1,32‰, cifra muy similar a la del registro de base poblacional de Asturias que, a su vez, es el tercero del EUROCAT (European Registration of Congenital Anomalies and Twins) con mayor prevalencia total después de Mainz (Alemania) y Glasgow (Reino Unido).
2. El diagnóstico prenatal de los DTNs se ha perfeccionado progresivamente a partir de 1980 (mayor proporción de detecciones prenatales, mayor precocidad). Al igual que en otras poblaciones europeas, la detección prenatal de anencefalias supera a la de espinas bífidas. La sensibilidad de la ecografía mejora si va dirigida por alfafetoproteína en suero materno, hallazgo que es coherente con los informados por los registros del EUROCAT. La implantación del cribado bioquímico en el segundo trimestre gestacional se ha traducido en un incremento significativo de proporción de interrupciones voluntarias de embarazo de espinas bífidas para el sexenio 94-99 frente al cuatrienio 90-93. El aborto inducido es una maniobra aceptada en nuestro medio para el manejo de todas las modalidades de DTNs y nos sitúa en unos niveles medios-altos con respecto a los registros integrados en el EUROCAT.
3. Las características clínico-epidemiológicas de los DTNs de nuestra casuística reproducen las documentadas en la bibliografía médica, esto es, los puntos de cierre afectados más frecuentemente son el 2 con/sin afectación del 4 y el 1 y/o 5; el síndrome de Meckel-Gruber es el más prevalente entre los DTNs sindrómicos; la trisomía 18 es la aneuploidía más habitualmente asociada a estas anomalías; la afectación del sexo femenino es predominante; los DTNs son más comunes entre embarazos múltiples; y los defectos asociados suelen ser cardiopatías, nefropatías y anomalías digestivas. Por otra parte, no hemos constatado diferencias con respecto a la condición socioeconómica de los progenitores de los DTNs al compararlos con la de los progenitores de los nacidos vivos en Mallorca durante lapsos temporales equivalentes.
4. Aunque hemos objetivado un incremento en cantidad y calidad del consumo de folatos por parte de nuestras gestantes en los últimos años, esta mejora no ha sido suficiente como para repercutir sobre nuestras cifras de prevalencia total de DTNs. Nuestras proporciones de prevenciones primarias periconcepcionales correctas (3% en 1998 y 13% en 2002) son muy inferiores a las de otros países occidentales. La nacionalidad/etnia y la realización de la consulta preconcepcional son variables explicativas independientes del uso periconcepcional de folatos en nuestro estudio del año 2002 según la regresión logística.
5. La comparación entre las madres de DTNs en edad fértil (casos) y sus controles ha mostrado las siguientes diferencias estadísticamente significativas: concentraciones de homocisteína total menores para los casos aunque la mediana de la diferencia fue escasa (en torno a 1  $\mu\text{mol/L}$ ), cocientes entre la cisteína y la homocisteína totales (índice de transulfuración) superiores y niveles de folato sérico

inferiores entre los casos. Los hallazgos mencionados con respecto a los aminoácidos se interpretan como consecuencia de la hiperactividad de la cistationina  $\beta$ -sintetasa. Por otra parte, no hemos identificado cambios significativos con respecto a las concentraciones de cobalamina y a la presencia del polimorfismo C677T.



El trabajo desarrollado en esta tesis desvela una serie de cuestiones interesantes y apunta a diversas *perspectivas de futuro* en el enfoque preventivo y en la investigación de la etiología de las anomalías que nos ocupan:

- La instauración de registros de malformaciones es imperativa en cualquier sociedad desarrollada cuyos gobernantes aspiren a optimizar y racionalizar los recursos sanitarios que se ofrecen a los ciudadanos. Los datos epidemiológicos relativos a los DTNs y a otras malformaciones presentados en esta tesis son los primeros que se han publicado en la literatura científica referentes a Mallorca. Esperamos que esta iniciativa fomente la creación a medio plazo de un registro balear oficial de defectos congénitos.
- El traslado del cribado bioquímico de aneuploidías al primer trimestre no se puede acometer en nuestro medio de forma indiscriminada, esto es, sin una planificación poblacional, juiciosa y realista de la atención a nuestras gestantes que asegure el acceso a los profesionales de la ecografía con las mejores cifras de detección de DTNs. La omisión de estas premisas puede hacer peligrar los logros alcanzados en el campo del diagnóstico prenatal de la espina bífida durante la última década.
- Las recomendaciones sobre el uso de folatos para la prevención primaria de los DTNs emitidas por la Dirección General de Salud Pública del Ministerio de Sanidad y Consumo evidencian limitaciones teóricas (sólo van dirigidas a las mujeres que planifican un embarazo) y prácticas (el cumplimiento de esta recomendación en nuestro entorno es claramente insuficiente). En este contexto, creemos necesario reclamar una mayor implicación de los responsables de salud pública en la realización de campañas poblacionales sobre uso de folatos en las gestantes potenciales, el fomento de la consulta preconcepcional y el enriquecimiento de alimentos de uso común con folatos.
- Posiblemente se pueda avanzar en el esclarecimiento de la etiología de los DTNs si afrontamos el estudio de las madres de los fetos afectados desde varias perspectivas: cuantificación de los múltiples metabolitos que participan en los ciclos del folato y de la homocisteína, estudio de la absorción del folato y de las concentraciones de sus coenzimas, investigación de la metilación del ácido desoxirribonucleico, valoración de la agresión oxidativa, escrutinio de marcadores genéticos, etc. Deseamos progresar en la investigación de estos aspectos, si es posible, dentro de un marco cooperativo multicéntrico, con la asesoría científico-técnica pertinente, y con la infraestructura y recursos humanos que proyecta ofrecer nuestra Conselleria de

Salut i Consum a los profesionales médicos. En esta línea, hemos iniciado la recogida de muestras de ácido desoxirribonucleico de madres de hijos con defectos congénitos y sus correspondientes controles con el fin de estudiar el riesgo asociado a distintos marcadores genéticos.





# Currículum vitae de la autora

María José Gibert Castañer nació en Palma de Mallorca el 9 de noviembre de 1967. Realizó sus estudios de Medicina en la Universidad de Zaragoza durante los cursos 1985-91. En 1992 inició la residencia en Medicina Familiar y Comunitaria en el Hospital Universitario Son Dureta, sin embargo, sólo completó el primer año. Al año siguiente, comenzó su formación como Médico Interno Residente en Obstetricia y Ginecología en el mismo hospital.

Simultaneó su actividad laboral con la formación postgrado dirigida hacia la investigación clínica. En 1991-92 realizó el curso de la Universitat Autònoma de Barcelona titulado “Métodos estadísticos en Ciencias de la Salud” que concluyó con la calificación de notable. En 1995 se inició en el manejo del programa estadístico SPSS por medio de un curso impartido en el Hospital Son Dureta. En 1999 siguió otro curso en el mismo centro sobre “Metodología en Investigación Clínica”.

Durante los cursos 1994-95 y 1995-96 realizó los cursos de Doctorado en la Universitat Autònoma de Barcelona, y en junio de 1996 obtuvo el reconocimiento la suficiencia investigadora para la presentación de la tesis doctoral.

Desde 1998 investiga los defectos del tubo neural, y participa en el equipo liderado por la Dra. Inmaculada Martín Navas (Análisis Clínicos, Hospital Son Dureta), al que le fue concedida una beca del Fondo de Investigaciones Sanitarias para la culminación del proyecto titulado “Posibles etiopatogenias de los defectos del cierre del tubo neural en la población mallorquina. Utilidad de la homocisteína como marcador de riesgo y en la monitorización de terapias preventivas.” (número de expediente 99/0537). La colaboración de la autora de esta tesis se concretó en revisión de la bibliografía, captación de participantes, realización de entrevistas, recogida de información epidemiológica sobre defectos congénitos, análisis estadístico de los datos obtenidos y puesta a punto de publicaciones. En octubre de 1999 presentó en la Universitat Autònoma de Barcelona el proyecto de esta tesis doctoral.

En el año 2000 perfeccionó su formación sobre el tema de esta tesis por medio de la realización del Curs d'Especialista Universitari en Tècniques de Biomedicina Molecular, organizado por el Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut de la Universitat de les Illes Balears.

Hasta la fecha, la actividad laboral de la autora se ha desarrollado únicamente en el Hospital Universitario Son Dureta. Tras la conclusión de su periodo de formación como residente, inició su ejercicio como Facultativo Especialista de Área en marzo de 1997 en el Centro de Salud Emili Darder, donde llevaba a cabo actividades generales de su especialidad. Entre octubre de 2000 y julio de 2002 prestó sus servicios en las áreas de Atención Prenatal, Partorio y Urgencias Obstétrico-ginecológicas. En la actualidad también desempeña sus funciones en la consulta de Diagnóstico Prenatal, donde se encarga de la realización de técnicas invasivas, y del consejo prenatal sobre defectos congénitos.

Hasta el momento, la doctoranda es coautora de un capítulo de un libro y de 15 artículos publicados en revistas científicas, dos de ellas de ámbito internacional.