

Ausencia de selección genética en la frecuencia de los polimorfismos C677T y A1298C del gen metilentetrahidrofolato reductasa debido a la suplementación con folato en la población española

J.I. Gutiérrez Revilla¹, F. Pérez Hernández², M. Tamparillas Salvador¹, M.T. Calvo Martín¹

Resumen

Los polimorfismos C677T y A1298C en el gen metilentetrahidrofolato reductasa producen una enzima termolábil que está asociada con un incremento del riesgo de tener descendencia con defectos del tubo neural. La suplementación con folato previene la aparición de estos defectos y, como consecuencia, se puede haber producido un incremento de individuos con genotipo heterocigoto u homocigoto para los polimorfismos C677T y A1298C.

Se incluyeron en el estudio 159 controles sanos que fueron estratificados en dos grupos de edad: 0-22 años (n= 88) y 23-42 años (n= 71). El análisis de los polimorfismos estudiados se llevó a cabo mediante la reacción en cadena por la polimerasa y digestión enzimática con Hind I (C677T) y Mbo II (A1298C) de los fragmentos obtenidos.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia del polimorfismo C677T (P= 0,082) entre el grupo de edad de 0-22 años (CC= 41%, CT= 41% y TT= 18%) y el grupo de edad de 23-42 años (24, 64 y 12%, respectivamente). Igualmente, la frecuencia del polimorfismo A1298C fue similar (P= 0,379) en el grupo de 0-22 años (AA= 49%, AC = 44% y CC= 7%) a la encontrada en el grupo de 23-42 años (39, 58 y 3%, respectivamente).

Por tanto, no se puede concluir que se haya producido un incremento de las formas homocigotas o heterocigotas de los polimorfismos en la población española como consecuencia de la suplementación con folato.

Palabras clave: Defectos del tubo neural, metilentetrahidrofolato reductasa, folato, polimorfismo, C677T, A1298C.

Summary. Absence of genetic selection in the frequency of the C677T and A1298C polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene related to folate supplementation in spanish population

The C677T and A1298C polymorphisms for the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) produce a thermolabile enzyme which is associated with an increased risk of having offspring affected by neural tube defects. Folate supplementation prevents the development of such defects and this fact suggests an increased amount of people with the heterozygous or homozygous C677T and A1298C polymorphisms.

The study was carried out with 159 healthy control people, stratified in two age groups, 0-22 years (n= 88) and 23-42 years (n= 71). The analysis of the polymorphisms was performed by the polymerase chain reaction and digestion of the produced fragments with the restriction enzymes Hind I (C677T) and Mbo II (A1298C).

We have not found statistically significant differences (P= 0,082) in the frequency of C677T genotype between the 0-22 year group (CC= 41%, CT= 41% and TT= 18%) and the 23-42 year group (24%, 64% and 12%, respectively). Likewise, the frequency of A1298C genotypes in the 0-22 year group (AA= 49%, AC = 44% and CC= 7%) was similar (P= 0,379) to that found in the 23-42 year group (39%, 58% and 3%, respectively).

Since no statistically significant differences can be found in the frequencies of the polymorphisms studied, we can not conclude that supplementation with folate has produced any increase in the homozygous or heterozygous forms in Spanish population.

Key words: Neural tube defects, methylenetetrahydrofolate reductase, folate, C677T, A1298C.

INTRODUCCIÓN

La etiología de los defectos del tubo neural es multifactorial, con la participación de factores genéticos o medioambientales. Varios estudios observacionales y aleatorios han demostrado que la suplementación con folato disminuye el riesgo de ocurrencia (1-3) y recurrencia de defectos del tubo neural (4-6). Como consecuencia de estas observaciones, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de EE.UU (CDC) junto con otras agencias de salud de EE.UU recomendaron: «Todas las mujeres en edad reproductiva deben comenzar sus embarazos tomando 0,4 mg/día de folato antes de la concepción y continuarlo, al menos, hasta 12 semanas después de la con-

cepción. La cantidad adecuada de folato podrá venir dada por la dieta o mediante suplementación farmacológica» (7-8).

En 1982 se empezó a recomendar, por parte del Sistema Nacional de Salud español, el tratamiento temprano con folato a todas las mujeres en edad fértil con el fin de prevenir la aparición de defectos del tubo neural (9).

Algunos autores (9) han sugerido que la suplementación con folato puede producir un incremento de personas con el genotipo homocigoto o heterocigoto para el polimorfismo C677T, debido al aumento de la frecuencia del alelo mutado. Esta hipótesis se basa en que la suplementación con folato prevendría la aparición de defectos del tubo neural, que aparecerían en el caso de no realizar dicha suplementación (defectos del tubo neural susceptibles de prevención con folato).

El polimorfismo C677T se localiza en el gen metilentetrahidrofolato reductasa, que codifica la enzima metilentetrahidrofolato reductasa. Consiste en un cambio de base, citosina a

¹Servicio de Bioquímica Clínica. Hospital Universitario «Miguel Servet». Zaragoza.

²Farmacéutica de Atención Primaria. Gerencia Santander-Laredo. Santander.

timina, que provoca el cambio del aminoácido alanina (GCC) a valina (GTC) (10-11) y, como consecuencia, la aparición de una variante termolábil.

Entre un 5 a un 15% de la población es homocigota para la mutación C677T del gen metilentetrahidrofolato reductasa (12-16). Esta variante termolábil se asocia con un incremento de las concentraciones séricas de homocisteína (17-19), redistribución de los folatos, aumento del folato intracelular (12,20), disminución de las concentraciones plasmáticas de folato (más bajas de los valores fisiológicos) (12, 21-22) y bajas concentraciones plasmáticas de cisteína. Esta situación conduce a un aumento del riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular y un aumento del riesgo de 3 a 7,2 de tener descendencia afectada de defectos del tubo neural (10-12, 15, 23-25), así como la posible implicación en enfermedades como esquizofrenia, depresión y cáncer (26-27).

Por otra parte, se ha descubierto una nueva mutación en el gen metilentetrahidrofolato reductasa, denominada A1298C, en la que cambia el aminoácido glutamato a alanina (28-30). Como consecuencia de esta mutación, se produce un descenso en la actividad de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa, aunque tanto su forma homocigota como heterocigota no se asocian a un aumento de las concentraciones plasmáticas de homocisteína o disminución de la concentración plasmática de folato, fenómeno que es evidente con la presencia del genotipo homocigoto T677T. Sin embargo, parece que existe una interacción entre estas dos mutaciones. La heterocigosidad combinada para ambas mutaciones se asocia a una reducción en la actividad de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa, aumento de la concentración de homocisteína y reducción de la concentración plasmática de folato (28, 31). Estas características son similares a las encontradas en individuos homocigotos para la mutación C677T, lo que sugiere que esta mutación puede estar relacionada con una proporción de defectos del tubo neural que no son explicados por la presencia del genotipo T677T, pudiendo ser un factor de riesgo adicional (29), aunque existen estudios en los que no se ha podido encontrar dicha relación (30).

En el presente trabajo se ha analizado la posible selección genética del alelo mutado para ambos polimorfismos (C677T y A1298C) como consecuencia de la suplementación periconcepcional con folato.

SUJETOS Y METODOS

Sujetos

Se ha sido estudiado en individuos sanos (159 hombres y mujeres) la evolución de la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos C677T y A1298C con respecto a la edad. Los participantes sanos fueron seleccionados en el Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza mediante criterios clínicos, entre las personas que llegaron a realizar controles periódicos o intervenciones menores, y distribuidas de forma homogénea en función de la edad. La estratificación por edad se realizó en función de la fecha inicial en la que se empezó la recomendación de suplementación periconcepcional con folato a mujeres en edad fértil (1982), como consecuencia aparecen dos grupos de edad de 0 a 22 años (n= 88) y de 23 a 42 años (n= 71). Los individuos mayores de 43 años fueron excluidos del estudio para evitar posibles influencias en la frecuencia genotípica, debido a la posible implicación del gen metilentetrahidrofolato reductasa

en diferentes patologías y hábitos nutricionales. Además, existieron otra serie de factores de exclusión como raza distinta a la caucásica, padecimiento de enfermedades cardiovasculares (infarto de miocardio, trombopatías, etc) y antecedentes familiares de defectos del tubo neural.

Se informó a todos los participantes del objetivo del estudio y se pidió consentimiento escrito para la utilización de los especímenes biológicos. Además, el estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital.

Especímenes

La extracción de sangre se realizó en tubo con anticoagulante (K₃-EDTA) mediante sistema de vacío.

La extracción de DNA se llevó a cabo por métodos convencionales, mientras que para el análisis de los polimorfismos C677T y A1298C se siguieron los métodos descritos por Frosst et al (13) y Van der Put et al (29), respectivamente. El análisis del polimorfismo C677T fue realizado mediante reacción en cadena por la polimerasa del DNA genómico en un termociclador (PTC-100™ Programmable Thermal Controller. MJ Research, Inc.), digestión enzimática y revelado del patrón genómico en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio. La mutación C677T crea una diana de restricción para la enzima *Hinf I*, resultando dos fragmentos de 175 y 23 pares de bases (pb) tras la digestión enzimática del fragmento de 198 pb. Las personas con genotipo CC presentan una sola banda de 198 pb, mientras que aquellas con genotipo CT presentan 3 fragmentos de 198, 175 y 23 pb. Por último, las personas con genotipo homocigoto mutado (TT) muestran un patrón formado por dos bandas de 175 y 23 pb.

Por otro lado, la presencia de la mutación A1298C elimina una diana de restricción para la enzima *Mbo II*, utilizándose el mismo procedimiento de visualización anteriormente descrito. El fragmento amplificado de 163 pb sólo se digiere en individuos portadores del alelo A. Los distintos genotipos se clasificaron en función de la presencia de 5 bandas de 56, 31, 30, 28 y 18 pb (genotipo AA), 6 bandas de 84, 56, 31, 30, 28 y 18 pb (genotipo AC) y 4 bandas de 84, 31, 30 y 18 pb (genotipo CC).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha realizado calculado las frecuencias absolutas y relativas de las distintas variables y su posterior comparación mediante la prueba χ^2 , considerando los valores estadísticamente significativos aquellos que presentasen una $P < 0,05$.

Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS (versión 10.0).

RESULTADOS

En la figura 1 se representa la frecuencia genotípica relativa correspondiente al polimorfismo C677T en los dos grupos de edad estudiados. Las frecuencias genotípicas en el grupo de edad de 0-22 años fueron de CC= 41%, CT= 41% y TT= 18%, mientras que en el grupo de edad de 23-42 años el genotipo CC presentó una frecuencia genotípica del 24%, el genotipo CT del 64% y, finalmente, el genotipo TT del 12%. Se observaron una serie de diferencias entre los dos grupos de edad y, con el fin de establecer si dichas diferencias eran estadísticamente significativas, se aplicó la prueba χ^2 . A partir de los resultados obtenidos (prueba χ^2 , $P = 0,082$) no se pudo establecer que tales diferencias fueran estadísticamente significa-

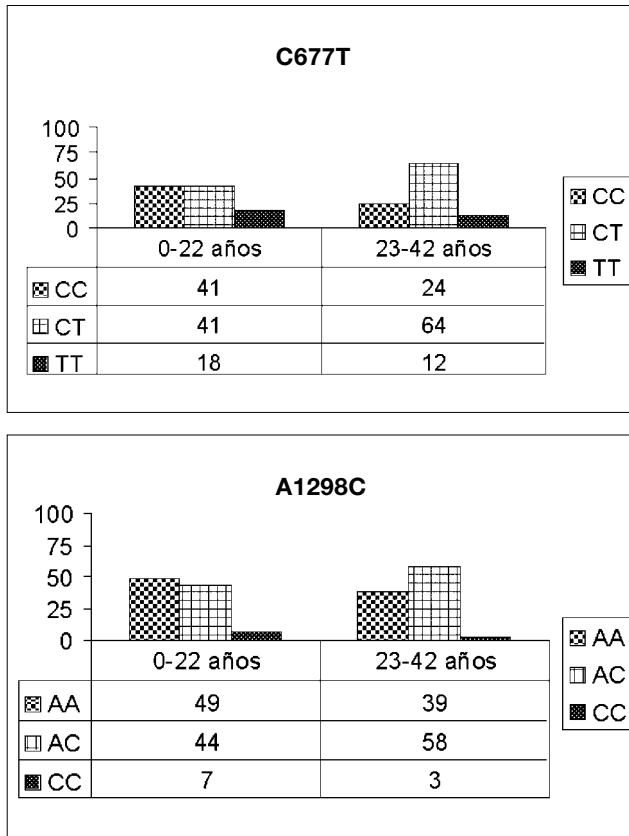


Figura 1 Frecuencia relativa de los distintos genotipos C677T y A1298C en cada grupo de edad.

tivas en cuanto a la frecuencia del polimorfismo C677T en función de los dos grupos de edad.

Como en el caso del polimorfismo C677T, en la figura 1 se observa que la distribución de las frecuencias relativas de los genotipos A1298C no variaban en relación a los dos grupos de edad estudiados (prueba χ^2 , $P=0,379$). La frecuencia genotípica en el grupo de 0-22 años fue del 49% para el genotipo AA, 44% para el genotipo AC y 7% para el genotipo CC, mientras que en el grupo de 23-42 años las frecuencias genotípicas fueron 39, 58 y 3%, respectivamente.

Al estudiar la frecuencia alélica de cada uno de los polimorfismos en función de los grupos de edad, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (C677T $P=0,16$ y A1298C $P=0,89$) (figura 2). Las frecuencias alélicas del polimorfismo C677T dentro del grupo de edad de 0-22 años fueron del 61,4% para el alelo C y 38,6% para el alelo T, mientras que en el grupo de edad de 23-42 años el alelo C presentó una frecuencia alélica del 56,3% y el alelo T del 43,7%. Por otra parte, la frecuencia alélica del polimorfismo A1298C dentro del grupo de edad de 0-22 años fue del 71% para el alelo A y 29% para el alelo C, mientras que en el grupo de edad de 23-42 años el alelo A presentó una frecuencia alélica del 68,3% y el alelo C del 31,7%.

DISCUSION

La suplementación con folato previene la ocurrencia y recurrencia de los defectos del tubo neural que sean susceptibles de ser prevenidos con folato. Algunos autores (9) han sugerido la hipótesis de que se haya producido un incremento en el número

de individuos que presenten el polimorfismo C677T, tanto en su forma heterocigota como homocigota, como consecuencia de dicha suplementación.

En España, la recomendación de suplementación durante el periodo periconcepcional comenzó en 1982 (32). Bajo este contexto, parece razonable pensar que se podría haber producido un aumento de la frecuencia del alelo mutado en las personas nacidas a partir de 1982, en el caso de que se hubiese realizado una correcta suplementación con folato. Tal y como fue establecido por Muñoz-Morán et al. (9), la población sana a estudio fue dividida en dos grupos homogéneos (0-22 años y 23-43 años) en función del inicio de la recomendación de suplementación periconcepcional con folato. A partir de los resultados obtenidos no se ha podido establecer un incremento en la frecuencia del alelo T (polimorfismo C677T), el alelo C (polimorfismo A1298C) o ambos polimorfismos. Estos resultados contradicen los expuestos por Muñoz-Morán et al. (9), que encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de edad estudiados. Sin embargo, una posible explicación podría estar en la falta de influencia de la suplementación con folato debido a una dieta rica en folato per se, una inadecuada utilización de la suplementación con folato o al relativamente pequeño tamaño de muestra empleado, que haga que las diferencias pasen desapercibidas.

Por una parte, la frecuencia genotípica de la mutación 677TT en población sana, varía geográficamente dentro de Europa de un 6-10% en los países del norte a un 13-18% la población mediterránea (28). En el presente estudio, la frecuencia genotípica observada ($P=15,1\%$) es similar a la encontrada por otros autores en Alemania (33), Gran Bretaña (14), Francia (34), Turquía (35), Italia (16) y América (27, 36).

Debido a que la mutación A1298C también afecta a la actividad específica de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa y a las concentraciones de folato y homocisteína, pero en menor medida que la mutación C677T (22), su frecuencia también podría estar influenciada por la adecuada suplementación con folato. En el presente estudio la frecuencia del genotipo C1298C fue bastante baja ($P=6,3\%$), aunque estos resultados no variaron de los obtenidos en otros estudios (29-30).

La relación entre la presencia de los polimorfismos C677T y A1298C en el gen metilentetrahidrofolato reductasa con un aumento del riesgo de descendencia afecta de defectos del tubo neural, se ha encontrado en estudios realizados en países con una gran prevalencia de defectos del tubo neural y principalmente en países del norte de Europa (10-12, 23). Por contra, en países con una prevalencia más baja, este tipo de relaciones no han podido ser establecidas (14, 16, 30, 36). Una posible explicación podría estar en la presencia de factores medioambientales como los hábitos dietéticos, que pueden ser el origen de dichas diferencias. Las dietas ricas en folato de los países mediterráneos, podrían ser suficientes para prevenir la aparición de defectos del tubo neural susceptibles a tratamiento con folato y sólo aparecer aquellos defectos del tubo neural de etiología desconocida. Así mismo, pudiera existir una menor presión selectiva del déficit de folato y un enriquecimiento del genotipo mutado para estos polimorfismos, que explicasen la elevada frecuencia del genotipo mutado T677T en la población mediterránea. Esta hipótesis podría explicar la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de distribución de los genotipos mutados estudiados, ya que pequeñas variaciones pasarían desapercibidas. Si bien estos resultados contradicen los expuestos por Muñoz-

Moran et al (9), podría haber ocurrido que nuestra población estudiada presentase una ingesta de folato suficiente para prevenir la aparición de defectos del tubo neural y que por lo tanto la suplementación adecuada o inadecuada con folato no haya influido en un aumento del genotipo mutado para ambos polimorfismos.

Otra posible explicación de los resultados obtenidos podría ser el resultado de una inadecuada suplementación con folato por parte de la población estudiada. En un estudio previo (37) realizado dentro del mismo ámbito geográfico, se determinó que sólo el 15,4% de las mujeres en edad gestacional, realizaban una correcta suplementación con folato. Ante el bajo porcentaje de embarazos que han llevado a cabo una adecuada prevención de los defectos del tubo neural mediante suplementación con folato, parece posible que las diferencias entre la frecuencia de los dos genotipos mutados no varíe en las dos poblaciones estudiadas.

Además, debido a que los dos polimorfismos C677T y A1298C no explican el total de casos de defectos del tubo neural prevenibles con folato, pueden existir otras mutaciones en el gen metilentetrahidrofolato reductasa o en otros genes relacionados con el metabolismo del folato que puedan justificar su efecto protector.

Correspondencia
José Ignacio Gutiérrez Revilla
Servicio de Bioquímica Clínica
Hospital Universitario «Miguel Servet»
Paseo Isabel La Católica 1 y 3.
50009 Zaragoza
Tel: 976 765555
Fax: 976 765633
e-mail:
joseignaciogutierrez@redfarma.org

BIBLIOGRAFÍA

1. 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. *BMJ* 1981; 282: 1509-1511.
2. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991; 338: 131-137.
3. Romano PS, Waitzman NJ, Scheffer RM, Pi RD. Folic acid fortification of grain: An economic analysis. *Am J Pub Health* 1995; 85: 667-676.
4. Milunsky A, Jick H, Jick SS, Bruell CL, MacLaughlin DS, Rothman KJ et al. Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *JAMA* 1989; 262: 2847-2852.
5. Vergel RG, Sánchez LR, Heredero BL, Rodríguez PL, Martínez AJ. Primary prevention of neural tube defects with folic acid supplementation: Cuban experience. *Prenat Diagn* 1990; 10: 149-152.
6. Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992; 327: 1832-1835.
7. Whitehead R, Bates C. Recommendations on folate intake. *Lancet* 1997; 350: 1642-1643.
8. Locksmith GJ, Duff P. Preventing neural tube defects: The importance of periconceptional folic acid supplements. *Obstet Gynecol* 1998; 91: 1027-1032.
9. Muñoz-Morán E, Dieguez-Lucena JL, Fernández-Arcas N, Pérán-Mesa S, Reyes-Engel A. Genetic selection and folate intake during pregnancy. *Lancet* 1998; 352: 1120-1121.
10. Whitehead AS, Gallagher P, Mills JL, Kirke PN, Burke H, Molloy AM et al. A genetic defect in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. *Q J Med* 1995; 88: 763-766.
11. van der Put NM, van den Heuvel LP, Steegers-Theunissen RP. Decreased methylene tetrahydrofolate reductase activity due to the 677C-T mutation in families with spina bifida offspring. *J Mol Med* 1996; 74: 691-694.
12. Van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van den Heuvel LP et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995; 21: 1070-1071.
13. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-113.
14. Papapetrou C, Lynch SA, Burn S, Edwards WH. Methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects. *Lancet* 1996; 6: 58.
15. Kirke PN, Mills JL, Whitehead AS, Molloy A, Scott JM. Methylenetetrahydrofolate reductase mutation and neural tube defects. *Lancet* 1996; 348: 1037-1038.
16. de Franchis R, Buoninconti A, Mandato C, Pepe A, Sperandeo MP, Del Gado R et al. The C677T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene is a moderate risk factor for spina bifida in Italy. *J Med Genet* 1998; 35: 1009-1013.
17. Engberse AMT, Franken DG, Boers GHJ, Stevens EMB, Trijbels FJM, Blom HJ. Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 142-150.
18. Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LPWJ, Boers GHJ, Frosst P, Stevens EMB, van Oost BA et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 35-41.
19. Harmon DL, Woodside JV, Yarnell JW, McMaster D, Young IS, McCrum EE et al. The common "thermolabile" variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinemia. *Q J Med* 1996; 89: 571-577.
20. Molloy AM, Daly S, Mills JL, Kirke PN, Whitehead AS, Ramsbottom D et al. Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. *Lancet* 1997; 349: 1591-1593.
21. 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: 703-708.
22. Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 1995; 345: 149-151.
23. Ou CY, Stevenson RE, Brown VK, Schwartz CE, Allen WP, Khoury MJ et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. *Am J Med Genet* 1996; 63: 610-614.
24. Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 1996; 94: 2410-2416.
25. Gonzalez Ordóñez AJ, Medina Rodríguez JM, Fernández Álvarez CR, Sánchez García J, Fernández Carreira JM, Álvarez Martínez MV et al. Reducción de niveles altos de homocisteína total con folato y vitamina B en pacientes con tromboembolismo venoso: relación entre la respuesta y el genotipo C677T del la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR). *Med Clin* 2000; 114: 7-12.
26. Chen J, Giovannucci E, Kelsey K. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 4862-4864.
27. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 1098-1102.
28. Steegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Trijbels FJM, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CMG et al. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural tube defects?. *Metabolism* 1994; 43: 1475-1480.
29. van der Put NMJ, Gabreëls F, Stevens EMB, Smeitink JAM, Trijbels FJM, Eskes TKAB et al. A Second Common Mutation in the methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: An Additional Risk Factor for Neural Tube Defects?. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1044-1051.
30. Barber R, Sahlat S, Hendricks K, Joggerst B, Larsen R, Suarez L et al. Investigation of folate pathway gene polymorphisms and the incidence of neural tube defects in a Texas Hispanic population. *Mol Genet Metab* 2000; 70: 45-52.
31. Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H, Tanaka E, Nakajima H, Matsuda Y et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 183-190.
32. Salvador J, Martínez-Frias ML, Rodríguez-Pinilla E. Consumo de medicamentos por la mujer embarazada en España: perfil de una muestra de la población en los años 1976-1986. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, 1989.
33. Koch MC, Stegmann K, Ziegler A, Schröter B, Erment A. Evaluation of the MTHFR C677T allele and the MTHFR gene locus in a German spina bifida population. *Eur J Pediatr* 1998; 157: 487-492.

34. Mornet E, Muller F, Lenvoise-Furet A, Delezoide AL, Col JY, Simon-Bouy B et al. Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects. *Hum Genet* 1997; 100: 512-514.
35. Boduroglu K, Alikasiflogu M, Anar B, Tuncbilek E. 677CT mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene is not a risk factor for neural tube defects in Turkey. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 1998; 78: 235.
36. Jonson WG, Stenroos ES, Heath SC, Chen Y, Carroll R, McKoy VV et al. Distribution of alleles of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T gene polymorphism in familial spina bifida. *Am J Med Genet* 1999; 87: 407-412.
37. Gutiérrez JI, Pérez F, Tamparillas M, Calvo MT. Prevención de los defectos del tubo neural mediante suplementación adecuada con ácido fólico. *Aten Farm* 2003; 5: 84-92.