

# Defecto del tubo neural, prolapso genital neonatal y polimorfismo de la metiltetrahidrofolato reductasa. Presentación de un caso

*Dra. Alisandra Morales de Machín, Lic. Karilé Méndez, Lic. Lisbeth Borjas, Dra. Ana Bracho*

*Instituto de Investigaciones Genéticas. Facultad de Medicina. La Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.*

## RESUMEN

*Se reporta el caso de una recién nacida femenina de 26 días de edad, con mielomeningocele toracolumbar, hidrocefalia y prolapso genital. En el Instituto de Investigaciones Genéticas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, Maracaibo, se analizaron 6 muestras de ácido desoxirribonucleico, correspondientes a afectada, madre, padre y 3 controles. En esta familia se interrelacionan la anomalía congénita y los factores de riesgo genético y ambiental, lo que permitió adecuado asesoramiento genético.*

*Palabras clave: Polimorfismo. Metiltetrahidrofolato reductasa. Prolapso genital. Recién nacido. Defecto de tubo neural.*

## SUMMARY

*We report the case of a female newborn 26 days old with thoracolumbar myelomeningocele, hydrocephalus and genital prolapse. In Genetic Research Institute of the Faculty of Medicine, University of Zulia, Maracaibo, 6 samples of oxyribonucleic acid corresponding to affected mother, father and 3 controls were analyzed. In this family are interrelated congenital anomaly and genetic risk factors and environmental, allowing appropriate genetic counseling.*

*Keywords: Polymorphism. Methylenetetrahydrofolate reductase. Genital prolapse. Newborn. Neural tube defect.*

## INTRODUCCIÓN

Los defectos del tubo neural (DTN) son considerados un grupo heterogéneo de malformaciones que resultan de un fallo en el desarrollo y cierre normal del tubo neural, que se produce durante la cuarta semana del desarrollo embrionario. La anencefalia y la espina bífida son las formas más comunes (1).

En la espina bífida existe un fallo en la fusión de los arcos vertebrales, generalmente en la región lumbar. Hay varios grados de severidad, desde la espina bífida oculta, en la que el defecto se limita al arco óseo, hasta la espina bífida abierta, en la que el defecto óseo se asocia con protrusión de las meninges (meningocele) o con protrusión de las meninges y de elementos neurales a través del defecto (mielomeningocele) (2).

Sin embargo, la mayoría de los DTN ocurren de forma aislada y su patrón de herencia es multifactorial, resulta de complejas interacciones entre ciertos factores medioambientales, tales como hipertermia, consumo de cigarrillo y alcohol, obesidad y diabetes materna. También, exposición embrionaria a medicamentos como antiepilépticos, metotrexato (1-5), a plaguicidas (6-8), a la presencia de anticuerpos contra los receptores de folato (9) y ciertos factores genéticos, existen estudios que involucran a las variantes polimórficas del gen de la enzima metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR), el polimorfismo más frecuentemente estudiado es c.677C>T (2).

Se estima que la frecuencia de DTN a nivel mundial es 0,5 a 2 por 1 000 embarazos (10). En Venezuela, Hernández y col. citan que la incidencia de DTN varía de 0,5 a 2 por 1 000 nacidos vivos (11).

Financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia (Proyecto CC – 0515 – 10).

El prolapso genital neonatal (PGN), es una alteración poco común, se presenta como una masa protruyendo a través de la vulva (12,13). Ocurre al nacimiento o en la época neonatal (14-16).

Cheng y col. citan, que se ha sugerido que el prolapso genital congénito puede ser una manifestación de anomalías congénitas, que representa un defecto en la musculatura del piso pélvico (12).

Mc Glone y col. citan que el 82 % al 86 % de los casos están asociados con anomalías del sistema nervioso central, especialmente espina bífida. Las condiciones que afectan las vías nerviosas espinales bajas o las raíces de los nervios pélvicos, resultan en una parálisis del piso pélvico y el desarrollo del prolapso (17).

El gen de la MTHFR está localizado en la región 1p36.3, tiene 11 exones, codifica la enzima MTHFR, que es clave en el metabolismo del 1er carbono, cataliza la reducción de 5, 10 metilentetrahidrofolato a 5 metiltetrahidrofolato, que es la forma de folato predominantemente circulante y precursor de una cadena de reacciones de metilación de sustancias de interés biológico en la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) (18-20).

En 1995 fue aislada una variación polimórfica en la posición 677 del nucleótido que involucra el cambio de una citosina (C) a timina (T), dando como resultado una sustitución de valina (GTC) por alanina (GCC), en consecuencia, una enzima termolábil. Las personas con esta variante tienen una reducción del 50 % en la actividad enzimática, elevada homocisteína sérica y folato sérico por debajo de lo normal (21,22).

La síntesis y reparación del ADN son dependientes de la concentración del ácido fólico (AF) (23), por tanto, una disminución de los niveles plasmáticos de AF disminuye la disponibilidad del nutriente intracelular, llevando a un déficit en la reparación y síntesis del ADN que disminuye el índice mitótico en los momentos críticos de la gastrulación y la neurulación. Es así como los DTN pueden ser la consecuencia de eventos escalonados que parten de la reparación defectuosa del ADN en el período crítico de la neurulación (24).

El objetivo de este trabajo fue reportar el caso de una recién nacida con defecto del tubo neural más prolapso genital asociado al polimorfismo c.677C>T de la MTHFR, expuesta a plaguicidas.

### Presentación de caso

Recién nacida femenina de 26 días de edad, hospitalizada por mielomeningocele toracolumbar, corregido inmediatamente posterior al nacimiento e

hidrocefalia y PGN (Figuras 1,2). Producto de pareja no consanguínea. Naturales de Maracaibo. Padre de 24 años. Madre de 21 años de edad, menarquía 12 años. Ciclos 4/30 días. Antes y durante el embarazo estuvo en contacto con químicos para fumigar plantas. Ambos trabajan en empresa de riego agroproductiva, su esposo fumiga las plantas. Igesta, embarazo simple de 38 semanas, controlado. Cesárea. Peso al nacer 2 800 g. Talla al nacer 50 cm. Circunferencia cefálica (CC) 33 cm. A los 22 días se le practica derivación ventricular externa por hidrocefalia.

Examen físico: Edad 26 días. CC: 33 cm. Peso 3 300 g. Talla 52 cm. En cabeza se observa derivación. Fontanela anterior: 5 x 6 cm. Hendiduras palpebrales oblicuas, pabellones auriculares inserción normal. Genitales: prolapso genital. En región toraco lumbar, proceso de cicatrización. Neurológico no moviliza extremidades inferiores, sin respuesta a estímulos dolorosos, reflejos osteotendinosos en extremidades inferiores ausentes, no clonus ni Babinsky, prensión plantar ausente, no desencadena marcha automática.

Exámenes realizados: Urocultivo: negativo. Cultivo de secreción de zona de mielomeningocele: *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* abundantes. VDRL no reactivo. HIV no reactivo. Ecograma transfontanelar: hallazgos ecográficos que sugieren hidrocefalia congénita de probable origen obstructivo. Ecograma renal: pielocaliectasia bilateral. Ecocardiograma pediátrico: Estenosis de rama izquierda de arteria pulmonar funcional leve sin connotación patológica. Cariotipo alta resolución: 46, XX en 25 metafases analizadas.

Análisis del polimorfismo c.677C>T del gen de la metiltetrahidrofolato reductasa:

Extracción de 5 mL de sangre periférica anticoagulada con EDTA 500 mM a tres controles, madre, padre y afectada. Extracción de ADN según técnica CTAB/DTAB (25).

Análisis molecular: La identificación de la transición C>T en el nucleótido 677 del gen de la MTHFR se realizó utilizando el método descrito por Frosst y col. (6). La secuencia de los iniciadores utilizados fue la siguiente: 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' y 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3' (26), estos iniciadores están diseñados para generar un producto amplificado de 198 pares de bases (pb), el cual se sometió a digestión con la enzima de restricción *HinfI*, esta enzima reconoce el sitio de restricción creado por la transición C>T en la posición 677. El alelo con la variante polimórfica T se corta (+) en dos fragmentos,

uno de 175 y otro de 23 pb y el alelo normal (C) no se corta (-). El producto digerido se caracterizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, y se visualizó utilizando la tinción de bromuro de etidio.

El genotipo homocigoto CC se definió como la presencia de una sola banda de 198 pb, homocigoto TT cuando se visualizó una banda de 175 pb y heterocigoto CT para el polimorfismo cuando se observaron fragmentos de 198 y 175 pb, la banda de



Figura 1. Imagen de recién nacida con prolapso genital. Vista anterior.



Figura 2. Imagen de recién nacida con prolapso genital. Vista posterior.

23 pb se sale del gel (Figura 3).

Para la realización de este trabajo, se contó con el consentimiento informado de los padres de la paciente estudiada y la aprobación del Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Genéticas de La Universidad del Zulia.

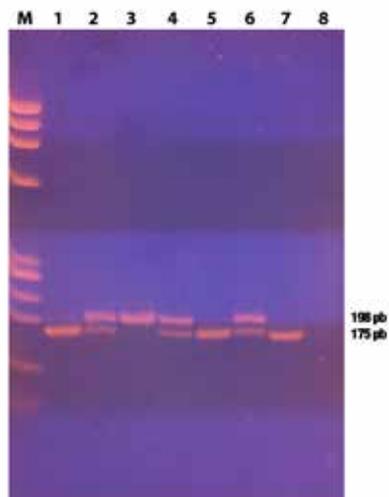


Figura 3. Imagen de gel de agarosa al 2 % del producto de digestión con la enzima *HinfI*.

M: Marcador de peso molecular  $\phi$ 174xHaeIII

1: control positivo homocigoto 677T/677T

2,4: control positivo heterocigoto 677C/677C

3: control positivo homocigoto 677C/677C

5: madre homocigoto 677T/677T

6: padre heterocigoto 677C/677T

7: afectada homocigoto 677T/677T

8: control de sistema: mezcla de reacción sin ADN

## DISCUSIÓN

En su conjunto, los DTN son una de las primeras causas de nacidos muertos, de mortalidad en la primera infancia y de minusvalía en los niños que sobreviven. Una pequeña proporción de los DTN tienen causas específicas conocidas, como las bridas amnióticas, algunos defectos monogénicos de expresión pleiotrópica, algunos trastornos cromosómicos y ciertos teratógenos, es por eso que la presencia de anomalías asociadas a los DTN ayudan a sospechar y diagnosticar los trastornos mencionados. En algunos casos, no es posible la identificación de síndromes reconocibles y probablemente se trate de los DTN aislados (2).

Una amplia variedad de anomalías estructurales pueden acompañar a los DTN sin formar parte

de síndromes reconocibles y algunos autores las consideran defectos secundarios (27). Una de las hipótesis de origen morfoembriológica para explicar la presencia de anomalías asociadas a los DTN, se basa en el concepto de campos del desarrollo, estos se definen como regiones o partes del embrión que responden como una unidad coordinada (espacial, temporal y jerárquica) a las interacciones embrionarias y da como resultado estructuras anatómicas complejas o múltiples (28).

Un defecto de campo de desarrollo se define como el conjunto de estructuras malformadas en el mismo período crítico, relacionadas, causadas por factores etiológicos diversos (29).

Hernández y col. citan que la línea media representa un campo de desarrollo con vulnerabilidad común para todas las estructuras que se encuentran en dicha zona, de esta forma, cualquier alteración durante la morfogénesis de los primordios ubicados en el campo de la línea media, puede traer como consecuencia defectos en una o todas las estructuras que allí se desarrollan. Esta hipótesis explicaría las anomalías en labio, paladar, diafragma, corazón, pared abdominal y genitales asociadas a los DTN (11).

La paciente estudiada, fue producto de I gesta, de embarazo simple a término, controlado, obtenida por cesárea segmentaria. Al nacimiento se identificaron los siguientes signos clínicos: mielomeningocele toracolumbar, prolapso genital, reflejos osteotendinosos en extremidades inferiores ausentes, sin respuesta a estímulos dolorosos, no moviliza extremidades inferiores, ruidos cardíacos rítmicos con soplo grado II. Los estudios de imagen demostraron hidrocefalia de probable origen obstructivo, afectación parenquimatosa renal difusa bilateral, pielocaliectasia bilateral, estenosis de rama izquierda de arteria pulmonar funcional leve sin connotación patológica. En este caso no fue posible la identificación de algún síndrome reconocible.

Los plaguicidas constituyen una amplia familia de compuestos químicos diferentes, muchos de ellos con un potencial efecto negativo sobre la salud de las personas expuestas a los mismos.

La Organización para la alimentación y la agricultura propone la siguiente definición de plaguicidas: "Cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacena-

miento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas sobre sus cuerpos"(30).

Se ha reportado incremento de riesgo de malformaciones congénitas en hijos de mujeres que han trabajado en actividades agrícolas durante un mes antes de la concepción y primer trimestre del embarazo. Los padres que han manipulado directamente plaguicidas también incrementan el riesgo de tener hijos con anomalías congénitas en comparación con los que no han tenido dicha exposición. El aumento del riesgo podría estar principalmente relacionado con malformaciones del sistema nervioso, labio paladar hendido y malformaciones múltiples (6).

Esta paciente estuvo expuesta prenatalmente a plaguicidas debido a que su madre y padre trabajan en empresa de riego agroproductiva.

El polimorfismo c.677C>T localizado en el exón 4 del gen de la enzima MTHFR es responsable de una variante termolábil de dicha enzima y se asocia a una actividad reducida de la misma. A los individuos homocigotos TT y heterocigotos CT se les ha asociado a un mayor riesgo de DTN. Con el fin de investigar esta asociación, se han realizado múltiples estudios caso control en diferentes poblaciones, revelando una gran heterogeneidad en la prevalencia del polimorfismo c.677C>T con importantes variaciones étnicas y geográficas.

Mientras en ciertas poblaciones tales como Italia (31), Chile (32), México (33,34), Colombia (24) se ha observado riesgo incrementado de DTN para el genotipo TT o CT, en otras poblaciones tales como Alemania (35), Francia (36), España (37), Turquía (38,39), este incremento del riesgo no ha sido corroborado.

La diferencia en los resultados es probablemente secundaria a la heterogeneidad poblacional y de diseño metodológico.

Suárez-Obando y col. citan que el riesgo relativo (RR) de desarrollar DTN de un poseedor del polimorfismo c.677C>T varía en razón al poseedor del mismo. Los niños con espina bífida, así como sus padres, poseen el genotipo TT de forma más frecuente que la población general. Si la madre posee dicho genotipo, el RR para su descendencia es de 3,7. Si el padre posee el genotipo TT se estima un RR de 2,2 para desarrollar espina bífida en la descendencia y si un embrión en desarrollo posee el genotipo TT, el riesgo de desarrollar espina bífida es de 2,9 (24).

En nuestra familia estudiada, el genotipo de la

madre es TT, el del padre CT y el de la niña afectada TT.

Para el asesoramiento genético dependemos de la medición de los riesgos reales de recurrencia en grupos de familias con afectados para obtener riesgos promedio de recurrencia estimados empíricamente (2).

En tal sentido, se ha demostrado que en las parejas que han tenido un embarazo o un hijo previo afectado, el riesgo de recurrencia para DTN no sindrómico en una próxima gestación varía entre 3 % y 6 % (40,41) y esto es mayor que el riesgo reportado para la población general (42).

Asimismo, existen otros factores que pueden incrementar el riesgo de recurrencia, tales como, la severidad del defecto, el número de afectados en la familia y su relación de parentesco con el propósito (el riesgo de recurrencia es más alto para los parientes de primer grado tales como padres hermanos e hijos de los miembros afectados de la familia), sexo del afectado (cuando pertenece al sexo con menos probabilidad de sufrir la anomalía) y consanguinidad en la familia. La explicación de todas esas observaciones es que también será mayor la carga de alelos predisponentes para esa enfermedad en la familia (2).

En esta familia se interrelacionan el defecto congénito, la constitución genética y los factores ambientales, lo que permitió adecuado asesoramiento genético sugiriendo antes y durante nuevo embarazo tratamiento con ácido fólico y evitar contacto con plaguicidas y otros teratógenos.

#### Agradecimiento:

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia (Proyecto CC – 0515 – 10).

A mi hijo Enrique Alejandro Machín Morales por toda la ayuda prestada.

#### REFERENCIAS

1. Finnell R, Gould A, Spiegelstein O. Pathobiology and genetics of neural tube defects. *Epilepsia*. 2003;31:14-23.
2. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Genética de las enfermedades comunes con herencia compleja. En: Thompson & Thompson. Genética en medicina. 7ª edición. España: Editorial Elsevier Masson; 2008.p.151-174.
3. Dhaulakhandi D, Rohilla S, Nain K. Neural tube defects: Review of experimental evidence on stem cell therapy and newer treatment options. *Ftal Diagn Ther*. 2010:2872-2878.
4. Chen Z, Karaplis A, Ackerman S. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet*. 2001;10:433-443.
5. Fujinaga M, Baden J. Methionine prevents nitrous oxide-induced teratogenicity in rat embryos grown in culture. *Anesthesiology*. 1994;81:184-189.
6. Garcia A. Efectos teratógenos de la exposición a pesticidas. 1998. [Citado 10 Agosto 2012]. Disponible en: <http://www.vigisalud.gov.py/attachments/efectos-teratogenicos-pesticidas.pdf>
7. Zayas R, Cabrera U. Los tóxicos ambientales y su impacto en la salud de los niños. *Rev Cubana de Pediatr*. 2007. [Citado 9 Mayo 2012]. Disponible en: <http://Scielo.sld.cu/pdf/ped/v79n2/ped06207.pdf>
8. Borja-Aburto V, Bermúdez-Castro O, Lacasaña-Navarro M, Kuri P, Bustamante-Montes M, Torres-Meza V. Dificultades en los métodos de estudio de exposiciones ambientales y defectos del tubo neural. *Salud pública Méx*. 1999;41(2):5124-5131.
9. Gu I, Wu J, Qiu I, Jennings C, Li G. Involvement of DNA mismatch repair in folate deficiency-induced apoptosis small star, filled. *J Nutr Biochem*. 2002;13:355-363.
10. Greene N, Stanier P, Copp A. Genetics of human neural tube defects. *Hum Mol Genet*. 2009;18:113-129.
11. Hernández M, Romero M, Morales A, Angarita M, Silva Ch, Delgado W, et. al. Defectos del tubo neural en productos de abortos espontáneos. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2009;69(1):12-19.
12. Cheng P, Shaw S, Cheuh H, Soong Y. Prenatal diagnosis of fetal genital prolapse. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2005;26:204-206.
13. Ellis J, Boes E. Genital prolapse in the neonate. A case report. *S Afr Med J*. 1986;69:836.
14. Seif A, Nabil D, Nasser A. Use of foley catheter for management of neonatal genital prolapse: Case report and review of the literature. *J Pediatr Surg*. 2006;41:449-452.
15. Akcakus M, Gunes T, Kurtoglu S, Cetin N, Pac A, Okur H. Neonatal uterine prolapse. *Pediatrics International*. 2003;45:349-351.
16. Pirgon O, Atabek M, Suleymanoglu S. Genital prolapse in a newborn following resection of sacrococcygeal teratoma. Case report. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2009;22:96-98.
17. McGlone L, Patole S. neonatal genital prolapse. *J Pediatr Child Health*. 2004;40:156-157.
18. Goyette P, Sumner J, Milos R, Duncan A, Rosenblatt D, Matthews R, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: Isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet*. 1994;7:195-200.
19. OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase; MTHFR; 2000. Disponible en: <http://omim.org/entry/607093>
20. Rosenblatt DS, Fenton WA. Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editores. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*.

- 8ª edición. Nueva York: McGraw Hill; 2000.p.3897-3933.
21. Unfried G, Griesmacher A, Weismüller W, Nagele F, Huber J, Tempfer C. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and idiopathic recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol.* 2002;99:614-619.
  22. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Mathews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995;10(1):111-113.
  23. Patterson D, Graham C, Cherian C, Matherly L. A humanized mouse model for the reduced folate carrier. *Mol Genet Metab.* 2008;93:95-103.
  24. Suárez-Obando F, Ordóñez A, Zarante I. Defectos del tubo neural y ácido fólico: patogenia, metabolismo y desarrollo embriológico. Revisión de la literatura. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 2010;60:49-60.
  25. Gustincich S, Carminci P, Del Sal G, Mamfiolli G, Schneider C. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques.* 1991;11:300-302.
  26. Goyette P, Frosst P, Rosenblatt D, Rozen R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1995;56:1052-1059.
  27. Stevenson R, Seaver L, Collins J, Dean J. Neural tube defects and associated anomalies in South Carolina. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2004;70:554-558.
  28. Martínez-Frías M, Frías J, Opitz J. Errors of morphogenesis and developmental field theory. *Am J Med Genet.* 1998;76:291-296.
  29. Guízar – Vázquez J. Defectos en los campos de desarrollo blastogénico. En: *Genética Clínica. Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias.* 3ª edición. Editorial El Manual Moderno S.A de C.V. 2001.p.313-322.
  30. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Roma; 2003. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/Y4544S/Y4544S00.HTM>
  31. 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(12):1009-1013.
  32. Nitsche F, Alliende M, Santos J, Pérez F, Santa María L, Hertrampf D, Cortés F. Frecuencia del polimorfismo C677T de la 5.10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en mujeres chilenas madres de afectados con espina bífida y en controles normales. *Rev Méd Chile.* 2003;131:1399-1404.
  33. Martínez L, Delgado I, Valdéz R, Ortíz R, Rojas A, Limón C, et al. Folate levels and N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup> Methylenetetrahydrofolate Reductase Genotype (MTHFR) in mothers of offspring with neural tube defects: A case-control study. *Archives of Medical Research.* 2001;32: 277-282.
  34. Blanco J, Lacasaña M, García R, Borja V, Hernández C, Aguilar C. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and the risk of anencephaly in Mexico. *Mol Hum Reprod.* 2007;13(6):419-424.
  35. Stegmann K, Ziegler A, Ngo E, Kohlschmidt N, Schröter B, Ermert A, et al. Linkage disequilibrium of MTHFR genotypes 677C/T-1298A/C in the German population and association studies in probands with neural tube defects (NTD). *Am J Med Genet.* 1999;87:23-29.
  36. Mornet E, Muller F, Leavoisé A, Delezoide A, Col J, Simón B, et al. Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects. *Hum Genet.* 1997;100:513-514.
  37. Gutierrez J, Pérez F, Calvo M, Tamparillas M, Gracia 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(12):441-445.
  38. Erdogan MO, Yildiz SH, Solak M, Eser O, Cosar E, Eser B, et al. C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene does not affect folic acid, vitamin B12, and homocysteine serum levels in Turkish children with neural tube defects. *Genet Mol Res.* 2010;9(2):1197-1203.
  39. Eser B, Cosar M, Eser O, Erdogan MO, Aslan A, Yildiz H, et al. 677C>T and 1298A>C polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase gene and biochemical parameters in Turkish population with spina bifida occulta. *Turk Neurosurg.* 2010;20(1):9-15.
  40. Papp C, Adám Z, Tóth-Pál E, Török O, Váradi V, Papp Z. Risk of recurrence of craniospinal anomalies. *J Matern Fetal Med.* 1997;6:53-57.
  41. Joó J, Beke A, Papp Z, Csaba A, Rab A, Papp C. Risk of recurrence in major central nervous system malformations between 1976 and 2005. *Prenat Diagn.* 2007b;27:1028-1032.
  42. Mitchell L, Adzick N, Melchionne J, Pasquariello P, Sutton L, Whithead A. Spina bifida. *Lancet.* 2004;364:1885-1895.