Relación entre los Niveles de Ácido Fólico, Vitamina B12 y Homocisteína Materna y los Defectos de Tubo Neural y Labio Hendido

Relation Between Levels of Folic acid, Vitamin B12 and Maternal Homocysteine with Neural Tube Defects and Cleft Lip

*Chávez-Corral, D. V.; **Velazco-Campos, M. R.; ***Sanin, L. H.;
****Levario-Carrillo, M.; **Aguirre-Rodríguez, A. A. & **Martínez, L. E.

CHÁVEZ-CORRAL, D. V.; VELAZCO-CAMPOS, M. R.; SANIN, L. H.; LEVARIO-CARRILLO, M.; AGUIRRE-RODRÍGUEZ, A. A. & MARTÍNEZ, L. E. Relación entre los niveles de ácido fólico, vitamina B12 y homocisteína maternos y los defectos de tubo neural y labio hendido. *Int. J. Morphol.*, 26(4):905-914, 2008.

RESUMEN: El objetivo del trabajo fue determinar la asociación entre los niveles de ácido fólico, vitamina B₁₂ (Vit B₁₂) y homocisteína (Hci) maternos, con defectos del tubo neural (DTN) y labio hendido (LH) con y sin paladar hendido (c/s PH). Se realizó un estudio tipo casos y controles. Casos, con diagnóstico de DTN y LH c/s PH (n=36) y cuatro controles hospitalarios por caso (n=141). Se incluyeron recién nacidos (RN) y lactantes hasta 12 meses de edad. Las variables de pareamiento fueron: edad del RN o lactante, etnia y hospital. Un 23% de etnia Tarahumara y 77% mestizos. Se determinó ácido fólico intraeritrocitario (AFI), plasmático (AFP) y Vit B₁₂ por radioinmunoensayo, la Hci por inmunoensayo de fluorescencia polarizada. Se consideró deficiencia si el AFI fue <160 ng/mL, AFP <3.5 ng/mL y la Vit B12 <200 pg/mL e hiperhomocisteinemia, si Hci >15 µmol/L. El análisis estadístico se realizó a través de regresión logística condicionada. Se identificó deficiencia de AFI en el 22% de las mujeres cuyos recién nacidos o lactantes presentaron algún tipo de defecto congénito y en el 12% de los controles. La relación entre AFI y DTN, LH c/s PH ajustada por edad materna, exposición a plaguicidas y zona de residencia fue RM 2,96 (IC 95% 0,92-9,46). No se encontraron diferencias en los niveles de Hci ni de Vit B₁₂. Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que RN cuyas madres cursan con una deficiencia de AFI tienen mayor riesgo de presentar DTN y LH c/s PH.

PALABRAS CLAVE: Defectos tubo neural; Labio hendido; Paladar hendido; Ácido fólico; Homocisteína; Vitamina B12.

INTRODUCCIÓN

Los defectos del tubo neural (DTN) y labio hendido (LH) con y sin paladar hendido (c/s PH), se han identificado entre los más comunes al nacimiento. Sin embargo, es escaso el conocimiento relacionado con los mecanismos de desarrollo de los mismos y sus costos sociales, económicos y afectivos son muy altos (Bender, 2000).

Estudios epidemiológicos en diferentes poblaciones muestran una frecuencia de hendiduras orofaciales de 1 a 2/1000 nacimientos (Carinci *et al.*, 2005; Sanborns, 2007), en relación a DTN se menciona una prevalencia de 2,8/1000 (Frey & Hauser, 2003) y, se reporta como la más alta en Norteamérica, la de la provincia de New Foulard y Labrador con 3,2/1000 nacimientos (House, 2006).

En México, sigue siendo difícil estimar con precisión la frecuencia de DTN, aunque se reporta como una de las más altas del mundo, superada sólo por las cifras del norte de China (Martínez-Villarreal *et al.*, 2001). El sistema de vigilancia epidemiológica de los DTN, se estableció a partir de la necesidad de información en algunas regiones de la República Mexicana, pero no abarca la totalidad del país (Secretaría de Salud, 2005), aún con estos problemas de registro, en Chihuahua la tasa de mortalidad por DTN ha sido superior (7,6/10000) a la media nacional de 5,8/10000 nacidos vivos (Ramírez-Espitia & Benavides, 2003). Esto último, aunque nos demuestra una frecuencia mayor, no permite una comparación internacional, ya que estas cifras hablan de mortalidad y no incluyen el total de nacimientos, es

* Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Chihuahua, México.

** Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, NL., México.

*** Facultad de Enfermería y Nutriología, Universidad Autónoma de Chihuahua, México.

**** Unidad de Investigación Médica en Epidemiología Clínica, Instituto Mexicano del Seguro Social, Chihuahua, Chihuahua, México.

Este proyecto fue apoyado por PROMEP. Número: UACHIH-115.

decir, no hay uniformidad de criterios en la medición de la frecuencia que nos permita una comparación más precisa.

El origen de los DTN y LH c/s PH puede ser similar ya son defectos de la línea media (Czeizel *et al.*, 1999; Padmanabhan, 2006) y se han relacionado con daños genéticos o mutagénesis antes o después de la concepción, dando como resultado alteraciones en la morfogénesis (Borja-Aburto, 1991; van Rooij *et al.*, 2003; van der Put *et al.*, 2001; Silbergeld & Patrick, 2005). Se han asociado, asimismo, a una variedad de factores nutricionales, sociales y ambientales (Hendricks *et al.*, 1999), entre los que sobresalen: el nivel socioeconómico bajo (Bender; Czeizel *et al.*), hipertermia (Graham *et al.*, 1998; Moretti *et al.*, 2005), diabetes mellitus pregestacional (Hernandez-Valencia & Carrillo-Pacheco, 2002; Krapels *et al.*, 2004), deficiencia materna de folatos durante el periodo periconcepcional (Bender; Czeizel *et al.*; Fleming, 2001) y uso de anticonvulsivantes (Bender; Hernandez-Diaz *et al.*, 2000) o de plaguicidas (Sanborns). Los DTN se han identificado con mayor frecuencia en personas de origen hispano (Silbergeld & Patrick) y los defectos de LH c/s PH se han asociado a tabaquismo (Lammer, 2004) y alcoholismo maternos (Bender).

Profundizando en estos factores, encontramos que se ha observado un déficit nutricional de folatos en el periodo periconcepcional y polimorfismo 677C>T del gen de la enzima N5, N10 metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (van Rooij *et al.* 2003; Hernandez-Valencia & Carrillo-Pacheco) en casos de DTN y LH c/s PH. Estos factores, tienen en común su participación en la biosíntesis de metionina a partir de homocisteína (Hci) (Martínez-Villarreal *et al.*). La enzima MTHFR cataliza la reducción del cofactor N5, N10 metilentetrahidrofolato a N5-metilentetrahidrofolato, forma principal de folato circulante y donadora de carbonos para la conversión de Hci a metionina (Zhu *et al.*, 2006) y cuya única fuente es el ácido fólico (AF) exógeno. Los polimorfismos se deben a mutaciones en el gen de la enzima MTHFR (677C>T), entre las cuales se menciona especialmente aquella que surge por la sustitución de alanina por valina. Esta mutación ocasiona aumento de la termolabilidad y decremento de la actividad de la enzima (Frosst *et al.*, 1995).

Los folatos tienen pues, efectos fisiológicos importantes ya que son cofactor de las enzimas que sintetizan ADN y ARN. Durante las primeras etapas de desarrollo fetal, la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas son esenciales y, por consiguiente, las necesidades de folatos de la madre aumentan rápidamente en ese periodo. Cuando el folato resulta insuficiente, la producción de ácidos nucleicos se inhibe y las células no logran fabricar suficiente ADN para la mitosis. Además, la inhibición del ciclo de metilación se traduce en

incapacidad para metilar proteínas, lípidos y mielina (Shaw *et al.*, 2006).

Los estudios clínicos y epidemiológicos que han evaluado el impacto de la suplementación con AF periconcepcional, aún son controversiales (Eichholzer *et al.*, 2006), ya que algunos han demostrado las bondades de su uso para prevenir la ocurrencia y recurrencia de DTN (House *et al.*; Hernandez-Valencia & Carrillo-Pacheco; Rouget *et al.*, 2005; van Rooij *et al.*, 2004; Ray *et al.*, 2003). Pero otros no han identificado asociación (Ubbink *et al.*, 1999; Shaw *et al.*, 1995; Hayes *et al.*, 1996). Hay variabilidad en la forma de medición de la exposición, ya que algunos han hecho mediciones directas en sangre y otros, a través de cuestionarios.

Los estudios realizados en México sobre la relación entre folatos y la frecuencia de DTN y LH c/s PH son escasos (Rodríguez-Moran *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2001). En el trabajo de Rodríguez *et al.*, identificaron una posible asociación entre la deficiencia de folatos y DTN, sin embargo la determinación de los niveles de folatos no fue realizada mediante la evaluación de ácido fólico intraeritrocitario (AFI) (Hayes *et al.*). El trabajo de Martínez *et al.*, presenta una asociación significativa entre folatos y DTN pero sin incluir LH c/s PH (Rodríguez-Moran *et al.*).

Es por ello que con el fin de contribuir a dilucidar la controversia existente para la asociación entre los niveles de ácido fólico, vitamina B₁₂ (vit B₁₂) y Hci maternos, con DTN y LH c/s PH se realizó el presente trabajo, en la población que acude a centros hospitalarios de segundo nivel en la ciudad de Chihuahua, México.

SUJETOS Y MÉTODO

Se realizó un estudio tipo casos y controles, en cinco hospitales de la ciudad de Chihuahua (dos hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social, Hospital General, Hospital Infantil del Estado y Hospital Central), centros hospitalarios que atienden aproximadamente al 90% de la población. El periodo de estudio comprendió del 1 de agosto de 2001 al 1 de agosto de 2002. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de cada centro hospitalario participante. Las madres de los grupos de estudio residieron durante el embarazo en el estado de Chihuahua.

Se invitó a las madres a participar explicándoles el motivo del estudio así como las etapas del mismo (entrevista, determinaciones sanguíneas y evaluación del RN o lactante) mediante una carta de consentimiento informado. Posteriormente, los entrevistadores obtuvieron los siguientes

tes datos de los padres: residencia (urbana o rural), edad (años), etnia (Tarahumara o mestizos, de acuerdo al fenotipo materno), escolaridad, antecedentes de defectos congénitos (en 2° y 3er grado), exposición a Rx, durante el periodo periconcepcional, uso de plaguicidas durante la gestación por parte de la madre y el padre, tabaquismo (durante el embarazo) y empleo. De la madre se obtuvo información sobre la ingesta de AF y vitaminas antes y después del embarazo, peso, talla, control prenatal, antecedentes, ginecoobstétricos, patologías, fiebre (durante el embarazo), uso de anticonceptivos, medicamentos y uso de aguas termales.

Se excluyó al recién nacido (RN) o lactante cuya madre cursara con antecedentes de diabetes mellitus pregestacional, diagnóstico de epilepsia o neoplasias. También se excluyeron recién nacidos clasificados como “casos sindrómicos” y, aquéllos con hermanos con antecedente de cualquier defecto congénito o cuya madre cursara con diagnóstico de embarazo al momento del estudio.

Casos: RN identificados al momento del nacimiento y lactantes hasta los 12 meses de edad, en el momento que acudieron a consulta externa del segundo nivel de atención, con diagnóstico de DTN (CIE Q00-Q07 10ª. edición) y LH c/s PH (CIE Q35-Q37 10ª. edición) sin otras alteraciones congénitas externas.

Se estudiaron 36 casos, 20 con DTN (4 encefalocelos, 12 mielomeningoceles y 4 meningoceles) y 16 con LH c/s PH (10 con labio y paladar hendido, 5 con paladar hendido y 1 con labio hendido). Los motivos para no incluir a los casos fueron: cromosomopatías (n=1), extrofia cardiaca (n=1), madres con diagnóstico de epilepsia (n=2), aquellos en los cuales no fue posible obtener información debido a que las madres fueron dadas de alta de forma prematura o residían en comunidades foráneas (n=17) y, los que no aceptaron participar en el estudio (n=2).

Controles: todo recién RN o lactante sin alteraciones congénitas externas, se parearon: por edad del RN o lactante, etnia y que hubieran nacido o que acudieran a consulta en el mismo hospital que los casos, en el periodo de estudio. Se registraron cuatro controles por cada caso (n= 141); fueron excluidos tres pacientes por presentar otras anomalías congénitas, dos de ellos lactantes y un RN. Además, dos tuvieron datos incompletos en las determinaciones sanguíneas por muestra insuficiente. Los motivos por los cuales acudieron al hospital los controles fueron: 84 RN y 15 lactantes normales, 30 por enfermedades infecciosas y 12 por otras causas.

La muestra fue conformada por RN (n= 125) y lactantes (n= 55) y sus madres. La tasa de no aceptación en los casos, fue del 5,2% y en los controles de 24,6%.

Determinaciones sanguíneas: La toma de sangre materna se realizó en ayuno de por lo menos 4 horas (Czeizel, 1995). Se tomaron 8 mL de sangre venosa periférica, en tubos vacutainer con ácido etilen diamino tetra acético (EDTA) como anticoagulante. La muestra se dividió en dos tubos, uno para la determinación de ácido fólico plasmático (AFP), AFI y Vit B₁₂ y el otro para Hci.

Determinación de folatos y vitamina B₁₂: Se tomó una alícuota de 0,1 mL de sangre total y se diluyó en 2 mL de ácido ascórbico al 1%, para hemolizar las células sanguíneas y cuantificar el AFI. Durante todo el proceso, las muestras se mantuvieron protegidas de la luz. El plasma sanguíneo fue almacenado en tubos de plástico y congelado a -30°C. La medición de folatos y Vit B₁₂ se realizó por radioinmunoensayo, utilizando el kit Dualcount AF/Vit B₁₂ (Diagnostic Product Co. Los Ángeles, CA, USA), fueron determinados, siguiendo parámetros hematológicos ya reportados por Martínez *et al.*

Los puntos de corte para definir deficiencia fueron: AFI <160 ng/mL, AFP <3,5 ng/mL y Vit B₁₂ <200 pg/mL.

Los valores de AFP y Vit B₁₂ fueron tomados directamente de la curva estándar. Para la obtención del resultado de AFI, se multiplicó el valor intracelular obtenido por 100 y se dividió entre el hematocrito de cada muestra.

El coeficiente de variación (CV) inter-ensayo e intraensayo en la determinación de los folatos fue de 5,4% y 10,1% y para la Vit B₁₂ de 5,4% y 11,9, respectivamente.

Determinación de homocisteína: la sangre se centrifugó a 4300 rpm, durante 10 minutos, a 4° C; se separó el plasma y se colocó en un tubo de plástico; se congeló a -20° C hasta su procesamiento. Se utilizaron 150mL de plasma y se realizó la determinación por inmunoensayo de fluorescencia polarizada (FPIA, Abbott Park, IL). El CV fue de 3,9%. El ensayo midió el total de L-homocisteína. Los valores de referencia de Hci sérica fueron de 5 a 15 µmol/L de acuerdo a lo informado por Molloy *et al.* (2002). El punto de corte para identificar hiperhomocisteinemia fue de >15 µmol/mL.

Análisis estadístico: La relación entre los DTN y LH c/s PH y las variables incluidas en el estudio se hizo mediante regresión logística condicionada. El análisis fue hecho con STATA 8.0 (2004) para Windows. La distribución de las diferentes variables fue explorada tanto en los casos como en los controles. Para las variables continuas se calcularon las medidas de tendencia central y se hicieron transformaciones logarítmicas en el caso de AFP, AFI, Vit B₁₂ y Hci con el fin de normalizarlas, ya que fueron analizadas en

forma continua y dicotómica para determinar su asociación con DTN y LH c/s PH. Para las variables categóricas se hizo igualmente un análisis exploratorio, univariado y bivariado. Para el análisis multivariado se construyó un modelo saturado con las variables que tuvieron una $p < 0,10$ en el análisis bivariado o con un papel importante en el modelo biológico conceptual de acuerdo a la literatura (Shaw *et al.*, 1999; Rull *et al.*, 2006).

Las variables se excluyeron una a una, de acuerdo a la significancia estadística conservando aquellas, que aunque tuvieran una $p > 0,05$, fueran de importancia biológica, evaluando el modelo a cada paso hasta obtener el más parsimonioso.

RESULTADOS

Tabla I. Características sociodemográficas y reproductivas de los grupos estudiados y RM crudos. Chihuahua, México 2001-2002.

Variable	Casos n*	%	Controles n	%	p	cRM (IC _{95%})
Edad materna (años)						
≤19	8	22	39	28	0.69	0.83 (0.33-2.09)
20-35	24	67	96	68		1.0
>35	4	11	6	4	0.48	1.34 (0.58-3.08)
Paridad						
Primigestas	14	39	39	27	0.17	0.57 (0.25-1.29)
Multi gestas	22	61	102	72		1.0
Escolaridad de la madre (años)						
Analfabetas	4	11	19	13		
1-9	23	64	77	55	0.62	0.69 (0.13-3.33)
≥10	9	25	45	32		1.0
Ocupación materna						
Hogar	24	67	93	66		1.0
Fuera del hogar	12	33	48	34	0.87	1.07 (0.45-2.55)
Ocupación paterna*						
Agrícolas y forestales	8	23	15	11	0.11	2.90 (0.77-10.84)
Obreros	15	43	73	53	0.69	0.84 (0.36-1.95)
Otros	12	34	49	36		1.0
Trabajo con plaguicidas						
No	32	89	137	97	0.04	1.0
Si	4	11	4	3		4.70 (1.03-21.38)
Consanguinidad						
No	34	94	138	98	0.26	1.0
Si	2	6	3	2		3.15 (0.42-23.35)
Antecedentes de defectos congénitos						
No	34	97	135	99	0.62	1.0
Si	1	3	2	1		1.81 (0.16-20.08)
Tabaquismo materno durante la gestación						
No	31	86	131	93	0.19	1.0
Si	5	14	10	7		2.06 (0.68-6.20)
Zona de residencia						
Urbana	14	39	120	85	0.01	1.0
No urbana	22	61	21	15		8.86 (2.4-32.6)
Etnia						
Mestizo	28	82	109	77	VP	-
Tarahumara	8	18	32	23		

cRM: Razón de Momios condicionada. IC95% = Intervalo de confianza al 95% VP: Variable de pareamiento n:Varía en algunos casos por datos incompletos

Se estudiaron 36 casos y 141 controles. La edad materna fue mayor en el grupo de los casos con DTN y LH c/s PH (25 ± 7 años) que en el grupo control 23 ± 5 años ($p=0,03$). La escolaridad fue similar en los dos grupos, el promedio de años cursados en el grupo de las madres de los casos fue de 5 ± 3 y en los controles 5 ± 4 ($p>0,05$). Las características sociodemográficas y el análisis bivariado entre ellas y los DTN y LH c/s PH se muestran en la Tabla I. Se identificó una asociación significativa entre la zona de residencia rural de la madre durante la gestación y la ocupación paterna relacionada con desempeño de labores agrícolas, así como la exposición laboral a plaguicidas de ambos padres.

La exposición a Rx, aguas termales y enfermedades durante el primer trimestre de la gestación no mostraron una relación significativa con la variable respuesta ($p>0,05$).

Las mujeres que habían tomado suplementos vitamínicos en el período periconcepcional fueron sólo el 4% del grupo control y ninguna del grupo de casos.

En la Tabla II se presenta la asociación entre AFI, AFP y Vit B₁₂ con DTN y LH c/s PH tanto con las variables analizadas de forma dicotómica como continua. La asociación entre la deficiencia de AFI y los DTN y LH c/s PH fue marginal ($p=0,09$). Dos controles tuvieron muestra de sangre insuficiente por lo que no aparecen en el análisis.

En el caso de la Hci no se observó asociación significativa al analizarla como variable continua y el análisis con la variable dicotómica no se realizó ya que solo uno de los controles estaba por encima del punto de corte $>15 \mu\text{mol/L}$ (Bakusu & Taskin, 2006).

El AFI, AFP y la Vit B₁₂ fueron menores en las madres de etnia Tarahumara (Fig. 1), el AFP, fue de $4,9 \pm 2,3$ y en las mestizas de $6,8 \pm 5 \text{ ng/mL}$ ($p < 0,01$). El promedio de AFI en mujeres de etnia mestiza fue de 408 ± 296 en la etnia Tarahumara fue de 320 ± 142 ($p=0,01$). La Hci fue similar en estos grupos.

Tabla II. Razón de Momios cruda para la asociación entre los niveles de ácido fólico y vitamina B¹² y DTN. Chihuahua, México, 2001-2002.

Variable	Casos		Controles		RM*	β	p
	n	%	n	%	(IC _{95%})		
Ácido fólico intraeritrocitario ng/mL							
<160	8	22	16	12	2.36 (0.88 - 6.40)	0.86	0.09
≥ 160	28	78	123	88	1.0		
Ácido fólico plasmático ng/mL							
<3.5	9	25	30	27	1.21 (0.52 - 2.78)	0.18	0.66
≥ 3.5	27	75	109	78	1.0		
Vitamina B ₁₂ pg/mL							
<200	18	50	63	45	1.31 (0.58 - 2.95)	0.26	0.52
≥ 200	18	50	76	55	1.0		

n= 175. Dos controles tuvieron muestra insuficiente. RM= Razón de Momios. IC95% = Intervalo de confianza al 95%. β = Coeficiente de regresión logística condicionada (variable continua). p= valor de p.

Tabla III. Relación ajustada entre el ácido fólico intraeritrocitario y DTN y LH c/s PH. Chihuahua, México 2001-2002.

Variable	RM	p	IC _{95%}
Edad materna (años)	1.08	0.03	1.00 - 1.16
Exposición a plaguicidas *	5.19	0.06	0.95 - 28.3
Residencia en área rural	12.63	<0.01	2.93 - 54.32
Deficiencia de ácido fólico intraeritrocitario (ng/mL)	2.96	0.067	0.92 - 9.46

n= 175. RM= Razón de Momios. IC95% = Intervalo de confianza al 95%. p= valor de p. * Los dos padres.

El modelo multivariado de la relación entre AFI y DTN y LH c/s PH fue ajustado por: edad de la madre, zona de residencia y trabajo con plaguicidas de ambos padres

(Tabla III). La asociación entre la deficiencia de AFI y los DTN y LH c/s PH fue marginal con una RM de 2,96 (IC 95% 0,92-9,46 $p = 0,067$).

Fig. 1. Las concentraciones de folatos (intraeritrocitario y plasmático) así como la vitamina B12 (a-c) fueron menores en mujeres de etnia Tarahumara ($p < 0.05$). En la homocisteína (d) no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

DISCUSIÓN

En la actualidad aún se desconoce la etiología en la mayoría de los defectos congénitos, por lo que es importante identificar los factores de riesgo que afectan a una población.

La cantidad de folatos ingerida por la madre, es un factor importante del medio ambiente que interviene en la etiología de los DTN y LH c/s PH. Una de las funciones de los folatos es actuar como sustrato de alguna de las enzimas involucradas en la síntesis de novo del DNA, proceso que es esencial en el desarrollo del embrión (van der Put *et al.*).

En este estudio se determinó una asociación marginal del AFI para defectos DTN y LH c/s PH. Estos resultados son consistentes con otros estudios (Hernandez-Valencia & Carrillo-Pacheco; Rodriguez-Moran *et al.*; Berry *et*

al., 1999). La medición de AFI para determinar la deficiencia de folatos fue realizada, debido a que se ha sugerido como mejor marcador y está sujeto a menores cambios fisiológicos durante el embarazo (Park & Kim, 2004), por lo cual se considera la aproximación óptima para conocer el estado de los folatos (Daly *et al.*, 1995), ya que su presencia en el interior de las células tiene concentración 1 a 2 veces superior a la extracelular (House *et al.*; Shaw *et al.*, 2006).

Otra variable que se identificó como significativa fue la exposición prenatal a plaguicidas, asociación que ya otros autores han reportado. Shaw *et al.* (1995) informaron que la ocupación paterna relacionada con plaguicidas incrementaba el riesgo de defectos congénitos al nacimiento, asimismo en mujeres que residen en áreas cercanas a los sitios de aplicación de plaguicidas el RM fue de 1.5 (IC 95% 1,1-2,1). Otros

autores han informado resultados similares en mujeres que residen a una distancia de 1000 m de los campos agrícolas (Rull *et al.*). En una reciente revisión de la asociación entre plaguicidas y efectos reproductivos se encontró una tendencia consistente y creciente con las hendiduras orofaciales y DTN (Sanborns).

En los niveles de AFP, Vit B₁₂ y Hci no se determinó una relación significativa. Para esto pueden existir varias explicaciones, las concentraciones de Hci durante el embarazo no aumentan por hemodilución, influencias hormonales e incremento en la demanda metabólica de metionina por la madre y el feto y si el metabolismo de la Hci no se encuentra alterado, se espera que los niveles de la Vit B₁₂ se encuentren normales (Afman *et al.*, 2001).

En relación a la consanguinidad se ha mencionado que cuando el parentesco se presenta en segundo grado, la proporción de genes que tienen en común los parientes es de 25% (Guízar-Vázquez, 1988).

Bender *et al.*, mencionan que genes afectados de ambos padres, combinados con ciertos factores del medio ambiente, sobrepasan el umbral y se presentan estos defectos y, consideran que el riesgo de recurrencia multifactorial se determina por: el riesgo empírico (probabilidad de que un rasgo pueda repetirse), la heredabilidad (proporción de variación del fenotipo) y coeficiente de parentesco (proporción de genes de un tipo de parentesco). La consanguinidad, en este estudio no fue significativa.

Con relación a los antecedentes de defectos congénitos al nacimiento (2° y 3° orden) nosotros determinamos una RM de 1,81 aunque el IC 95% no fue significativo (0,16-20,08), otros estudios han identificado un riesgo incrementado (Sanborns), probablemente porque incluyen antecedentes familiares de primer orden.

Se considera la edad materna como un factor de riesgo menor para DTN, el riesgo tiende a ser elevado en madres muy jóvenes o mayores de 35 años (Lauren & Allen, 2003). En el presente trabajo se observó una edad mayor en las madres del grupo de casos ($p < 0,03$) y el riesgo fue lineal al analizar la variable como continua, es decir a mayor edad más riesgo.

En la población estudiada las mujeres que habían tomado suplementos vitamínicos en el período periconcepcional fueron solo el 4% del grupo control y ninguna del grupo de casos. Esto sugiere que es necesario reforzar el programa de suplementación con AF en el período periconcepcional y que el personal de salud, (ginecoobstetras, pediatras y médicos generales) informen y estimulen a las

mujeres para que consuman la suplementación de AF durante este periodo tan importante, medida que ha mostrado gran éxito en otros lugares (Bakusu & Taskin, 2006).

Otro factor es el genético, ya que la mutación en el gen de la enzima MTHFR (677C>T), ha sido propuesto como un factor de riesgo para DTN y LH c/s PH. Tiene una amplia distribución en el mundo, donde exhibe una gran variabilidad. En mestizos del centro, este, occidente y norte de México se ha reportado una frecuencia alélica muy alta (58,6%) (Mutchinick *et al.*, 1999), igual en Yucatán 54% (Gonzalez-Herrera *et al.*, 2002), y un poco menor en Nuevo León 36% (Rodriguez-Moran *et al.*); en un grupo poblacional de etnia Tarahumara del 36% (Davalos *et al.*, 2000). No se puede descartar la participación de otros genes sensibles a la actividad del AF, tal como se ha observado en algunos modelos animales, particularmente con los genes *Cart1* y *Cd* (Martínez-Villarreal *et al.*). En este estudio se evaluaron sólo los niveles de folatos, vit B12 y Hci, por lo que sería de interés determinar la frecuencia de dichas mutación en nuestra población.

Las limitaciones metodológicas para estudios de malformaciones congénitas han sido analizadas por varios autores (Sanborns, Czeizel *et al.*), entre ellas un problema grave es que se analizan casos prevalentes, es decir aquellos que sobreviven o llegan al final del embarazo, ya que una alta proporción puede quedar enmascarada como pérdida temprana (Joffe, 1997; Idrovo *et al.*, 2005a, 2005b.), produciendo un sesgo de selección común a este tipo de estudios. Otra fuente probable de sesgo de selección es que los casos accesibles pudieran estar sobrerrepresentando a los sujetos con curso más benigno de la enfermedad. Finalmente, al analizar las pérdidas vemos que todas fueron controles y mestizos, grupo que presentó mayor concentración en los niveles de AFI por lo cual pudiera tenerse un sesgo de selección alejado del valor de nulidad pero, probablemente, con una magnitud mínima, ya que representan sólo el 1,4% de los controles.

En relación al sesgo de información, el error de medición de la variable independiente trató de minimizarse estandarizando a los observadores y realizando las determinaciones hasta que los coeficientes de variación fueron aceptables.

En cuanto al sesgo de memoria, es posible que hubiese estado presente, sobretodo en los casos de RN y para variables evaluadas por cuestionario, mas no para variables medidas en el laboratorio, como es el caso de las concentraciones de AFI.

Con respecto a los confusores, se incluyeron los más

documentados en la literatura, sin embargo, no podemos asegurar que no existan confusores no tomados en cuenta y llama la atención la importancia de la residencia en el modelo final, donde el vivir en área rural tiene un RM ajustado de 2,36 (IC 95% 0,88-6,40), lo que nos puede hablar de exposiciones relacionadas, que no podemos precisar, pero que pueden incluir factores físicos, químicos, biológicos exigencias de tipo ergonómicas o, incluso factores nutricionales importantes más allá del AF y que no fue posible analizar en su totalidad debido a la falta de registros hospitalarios de algunos datos antropométricos maternos.

Se observa un problema de poder, ya que la asociación principal mostró una p de 0,067 pero con una tendencia a la derecha, ello se debe en parte al ajuste por otros factores lo cual disminuyó el poder estadístico de la muestra.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la descendencia de mujeres con deficiencia de AFI podría tener

con una mayor probabilidad de presentar DTN y LH c/s PH. Se sugiere la realización de proyectos de intervención que ayuden a incrementar la participación en el programa de de ingesta de AF en el período prenatal, la cual fue sorprendentemente baja en este grupo (4%) e incrementar la cantidad de alimentos de uso generalizado suplementados con AF que ha mostrado sus bondades en evaluaciones a largo plazo (Ray *et al.*, 2005).

Dada la trascendencia en el ámbito familiar, social y económico de estos problemas, es necesario seguir investigando para ayudar a resolver los problemas metodológicos y hacer estudios multicéntricos, para evaluar los puntos que aún están en controversia.

AGRADECIMIENTOS. Agradecemos la valiosa participación de todos los pacientes y personal de los hospitales incluidos en este estudio.

CHÁVEZ-CORRAL, D. V.; VELAZCO-CAMPOS, M. R.; SANIN, L. H.; LEVARIO-CARRILLO, M.; AGUIRRE-RODRÍGUEZ, A. A. & MARTÍNEZ, L. E. Relation between levels of folic acid, vitamin B₁₂ and maternal homocysteine with neural tube defects and cleft lip. *Int. J. Morphol.*, 26(4):905-914, 2008.

SUMMARY: Objective: To determine the association between maternal folate deficiency, neural tube defects (NTDs), and cleft lip, with and without cleft palate (CL/P). Material and methods: A case/control study was conducted. The cases included subjects with diagnoses of NTD and CL/P ($n=36$) and four hospital controls per case ($n=141$); the study included newborns (NBs) and nursing babies up to 12 months of age. The parameter variables were the following: the age of the NB or nursing baby, the ethnic group, and the hospital of origin. The Tarahumara ethnic group made up 23% of the cases, while 77% were mestizos. The red cell folate (RCF), the plasma folic acid (PFA), and the vitamin B₁₂ levels were determined by radioimmunoassay and the homocysteine levels by polarized fluorescence immunoassay. A deficiency was considered to be present if the RCF were <160 ng/mL, the PFA <3.5 ng/mL and the vitamin B₁₂ <200 pg/mL; hyperhomocysteinemia was defined as HC >15 μ mol/L. The statistical analysis was carried out through of conditional logistic regression. Results: An RCF deficiency was identified in 22% of the women whose newborn or nursing babies presented with some type of congenital defect and in 12% of the controls. The correlation adjusted by maternal age, exposure to pesticides and zone of residence was OR 2.96 (CI 95% 0.92-9.46). There was no difference in vitamin B₁₂ or homocysteine levels between groups. Conclusions: Our results suggest that newborns whose mothers present with an RCF deficiency have an increased risk of displaying NTD and CL/P.

KEY WORDS: Defects neural tube; Cleft lip; Cleft palate; Folic acid; Homocysteine; Vitamin B₁₂.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afman, L. A.; Van Der Put, N. M.; Thomas, C. M.; Trijbels, J. M. & Blom, H. J. Reduced vitamin B12 binding by transcobalamin II increases the risk of neural tube defects. *QJM*, 94(3):159-66, 2001.
- Bakusu, A. & Taskin, M. Plasma homocysteine in late pregnancies complicated with preeclampsia and in newborns. *Am. J. Perinatol.*, 23(1):31-5, 2006.
- Bender, P. L. Genetics of cleft lip and palate. *J. Pediatr. Nurs.*, 15(4):242-9, 2000.
- Berry, R. J.; Li, Z. & Erickson, J. D. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. *N. Engl. J. Med.*, 341(20):1485-90, 1999.
- Borja-Aburto, V. Dificultades en los métodos de estudio de exposiciones ambientales y defectos del tubo neural. *Salud Pública Mex.*, 41(2):124-31, 1991.
- Carinci, F.; Rullo, R.; Farina, A.; Morano, D.; Festa, V. M.; Mazzarella, N.; Del Viscovo, D.; Carls, P. F.; Becchetti, A. & Gombos, F. Non-syndromic orofacial clefts in Southern Italy:

- pattern analysis according to gender, history of maternal smoking, folic acid intake and familial diabetes. *J. Craniomaxillofac. Surg.*, 33(2):91-4, 2005.
- Czeizel, A. E. Folic acid in the prevention of neural tube defects. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 20(1):4-16, 1995.
- Czeizel, A. E.; Timar, L. & Sarkozi, A. Dose-dependent effect of folic acid on the prevention of orofacial clefts. *Pediatrics*, 104(6):e66, 1999.
- Daly, L. E.; Kirke, P. N.; Molloy, A.; Weir, D. G. & Scott, J. M. Folate levels and neural tube defects. *JAMA*, 274:1698-702, 1995.
- Davalos, I. P.; Olivares, N. & Castillo, M. T. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Ann. Genet.*, 43(2):89-92, 2000.
- Eichholzer, M.; Tonz, O. & Zimmermann, R. Folic acid: a public-health challenge. *Lancet*, 367(9519):1352-61, 2006.
- Fleming, A. The role of folate in the prevention of neural tube defects: human and animal studies. *Nutr. Rev.*, 59(8):S13-20; discussion S1-3, 2001.
- Frey, L. & Hauser, W. A. Epidemiology of neural tube defects. *Epilepsia*, 44:4-13, 2003.
- Frosst, P.; Blom, H. J.; Milos, R.; Goyette, P. & Sheppard, C. A. *et al.* A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.*, 10(1):111-3, 1995.
- Gonzalez-Herrera, L.; Garcia-Escalante, G. & Castillo-Zapata, I. Frequency of the thermolabile variant C677T in the MTHFR gene and lack of association with neural tube defects in the State of Yucatan, Mexico. *Clin. Genet.*, 62(5):394-8, 2002.
- Graham, J. M. Jr. & Edwards, M. J. Teratogen update: gestational effects of maternal hyperthermia due to febrile illnesses and resultant patterns of defects in humans. *Teratology*, 58(5):209-21, 1998.
- Guízar-Vázquez, J. E. *Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. Herencia multifactorial*. Manual Moderno, México DF, 1988. pp.97-102.
- Hayes, C.; Werler, M. M.; Willett, W. C. & Mitchell, A. A. Case-control study of periconceptional folic acid supplementation and oral clefts. *Am. J. Epidemiol.*, 143(12):1229-34, 1996.
- Hendricks, K. A.; Simpson, J. S. & Larsen, R. D. Neural tube defects along the Texas-Mexico border, 1993-1995. *Am. J. Epidemiol.*, 15;149(12):1119-27, 1999.
- Hernandez-Diaz, S.; Werler, M. M.; Walker, A. M. & Mitchell, A. A. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N. Engl. J. Med.*, 343(22):1608-14, 2000.
- Hernandez-Valencia, M. & Carrillo-Pacheco, A. Glucose screening during active labour for the detection of undiagnosed hyperglycaemia and newborn malformations in a population without prenatal care. *Diabetes Obes. Metab.*, 4(2):132-7, 2002.
- House, J. D.; March, S. B.; Ratnam, M. S.; Crowley, M. & Friel, J. K. Improvements in the status of folate and cobalamin in pregnant Newfoundland women are consistent with observed reductions in the incidence of neural tube defects. *Can. J. Public Health*, 97(2):132-5, 2006.
- Idrovo, A. J.; Sanin, L. H. & Cole, D. Evaluation of time-to-pregnancy as a measure in environmental epidemiology. *Biomedica*, 25(3):398-411, 2005a.
- Idrovo, A. J.; Sanin, L. H. & Cole, D. Time to first pregnancy among women working in agricultural production. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, 78(6):493-500, 2005b.
- Joffe, M. Time to pregnancy: a measure of reproductive function in either sex. *Asclepius Project. Am. J. Epidemiol.*, 162(2):115-24, 1997.
- Krapels, I. P.; van Rooij, I. A.; Ocke, M. C.; West, C. E.; van der Horst, C. M. & Steegers-Theunissen, R. P. Maternal nutritional status and the risk for orofacial cleft offspring in humans. *J. Nutr.*, 134(11):3106-13, 2004.
- Lammer, E. J.; Shaw, G. M.; Iovannisci, D. M.; Van Waes, J. & Finnell, R. H. Maternal smoking and the risk of orofacial clefts: Susceptibility with NAT1 and NAT2 polymorphisms. *Epidemiology*, 15(2):150-6, 2004.
- Lauren, F. & Allen, H. W. Epidemiology of neural tube defects. *Epilepsia*, 44(10):4-13, 2003.
- Martínez, L. E.; Delgado, I.; Valdez, R.; Ortiz, R.; Rojas, A. & Limón, C. Folate levels and N5, N10-methylenetetrahydrofolate reductase genotype (MTHFR) in mothers of offspring with neural tube defects: a case-control study. *Arch. Med. Res.*, 32(4):277-82, 2001.
- Martínez-Villarreal, R. T.; Rojas-Martínez, A.; Sánchez-Hernández, J. G.; Hernández Torres, U., y Delgado, E. I. & Ortiz, L. R. Evaluación clínica, bioquímica y molecular de una familia con recurrencia de defectos del tubo neural. *Respyn*, 2:1-12, 2001.
- Molloy, A. M.; Mills, J. L.; McPartlin, J.; Kirke, P. N.; Scott, J. M. & Daly, S. Maternal and fetal plasma homocysteine concentrations at birth: the influence of folate, vitamin B12,

- and the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T variant. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 186(3):499-503, 2002.
- Moretti, M. E.; Bar-Oz, B.; Fried, S. & Koren, G. Maternal hyperthermia and the risk for neural tube defects in offspring: systematic review and meta-analysis. *Epidemiology*, 16(2):216-9, 2005.
- Mutchinick, O. M.; Lopez, M. A.; Luna, L.; Waxman, J. & Babinsky, V. E. High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Mol. Genet. Metab.*, 68(4):461-7, 1999.
- Padmanabhan, R. Etiology, pathogenesis and prevention of neural tube defects. *Congenit. Anom.*, 46(2):55-67, 2006.
- Park, H. & Kim, Y. The risk of folate and vitamin B12 deficiencies associated with hyperhomocysteinemia among pregnant women. *Am. J. Perinatol.*, 21(8):469-76, 2004.
- Ramírez-Espitia, J. & Benavides, F. Mortalidad por defectos del tubo neural en México, 1980-1997. *Salud Pública Mex.*, 45:356-64, 2003.
- Ray, J. G.; Meier, C.; Vermeulen, M. J.; Wyatt, P. R. & Cole, D. E. Association between folic acid food fortification and congenital orofacial clefts. *J. Pediatr.*, 143(6):805-7, 2003.
- Ray, J. G.; Wyatt, P. R.; Vermeulen, M. J.; Meier, C. & Cole, D. E. Greater maternal weight and the ongoing risk of neural tube defects after folic acid flour fortification. *Obstet. Gynecol.*, 105(2):261-5, 2005.
- Rodriguez-Moran, M.; Guerrero-Romero, J. F.; Parra-Quezada, M.; Segura-Pineda, M. J.; Levorio-Carrillo, M. & Sotelo-Ham, E. I. Folic acid deficiency and its association with neural tube defects in northern Mexico. *Salud Publica Mex.*, 40(6):474-80, 1998.
- Rouget, F.; Monfort, C. & Bahuau, M. Periconceptional folates and the prevention of orofacial clefts: role of dietary intakes in France. *Rev. Epidemiol. Sante Publique.*, 53(4):351-60, 2005.
- Rull, R. P.; Ritz, B. & Shaw, G. M. Neural tube defects and maternal residential proximity to agricultural pesticide applications. *Am. J. Epidemiol.*, 163(8):743-53, 2006.
- Sanborns, M. *Systematic Review of Pesticide Human Health Effects*. Ontario College of Family Physicians, Toronto, 2007.
- Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología. *Manual de procedimientos para la vigilancia epidemiológica de los defectos de tubo neural*. Dirección General de Epidemiología, México, 2005. pp.14-6.
- Shaw, G. M.; Carmichael, S. L.; Laurent, C. & Rasmussen, S. A. Maternal nutrient intakes and risk of orofacial clefts. *Epidemiology*, 17(3):285-91, 2006.
- Shaw, G. M.; Lammer, E. J.; Wasserman, C. R.; O'Malley, C. D. & Tolarova, M. M. Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *Lancet*, 346(8972):393-6, 1995.
- Shaw, G. M.; Wasserman, C. R.; O'Malley, C. D.; Nelson, V. & Jackson, R. J. Maternal pesticide exposure from multiple sources and selected congenital anomalies. *Epidemiology*, 10(1):60-6, 1999.
- Silbergeld, E. K. & Patrick, T. E. Environmental exposures, toxicologic mechanisms, and adverse pregnancy outcomes. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 192(5 Suppl):S11-21, 2005.
- STATA. Stata Statistical Software, USA, 2004.
- Ubbink, J. B.; Christianson, A. & Bester, M. J. Folate status, homocysteine metabolism, and methylene tetrahydrofolate reductase genotype in rural South African blacks with a history of pregnancy complicated by neural tube defects. *Metabolism*, 48(2):269-74, 1999.
- van der Put, N. M.; van Straaten, H. W.; Trijbels, F. J. & Blom, H. J. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp. Biol. Med.*, 226(4):243-70, 2001.
- van Rooij, I. A.; Ocke, M. C.; Straatman, H.; Zielhuis, G. A.; Merkus, H. M. & Steegers-Theunissen, R. P. Periconceptional folate intake by supplement and food reduces the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Prev. Med.*, 39(4):689-94, 2004.
- van Rooij, I. A.; Swinkels, D. W.; Blom, H. J.; Merkus, H. M. & Steegers-Theunissen, R. P. Vitamin and homocysteine status of mothers and infants and the risk of nonsyndromic orofacial clefts. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 189(4):1155-60, 2003.
- Zhu, J.; Ren, A.; Hao, L.; Zhu, H.; Li, S.; Finnell, R. H. & Li, Z. Variable contribution of the MTHFR C677T polymorphism to non-syndromic cleft lip and palate risk in China. *Am. J. Med. Genet. A.*, 140(6):551-7, 2006.
- Dirección para correspondencia:
Dra. Luz Helena Sanín A
Unidad Fronteriza de Salud Ambiental
Facultad de Enfermería y Nutriología
Av. Politécnico Nacional N° 2714
Chihuahua, Chih, México. C.P. 31250
Tel y Fax 52 614 4 30 00 75 ext 1104, 113
- Email: saninluz@yahoo.ca
- Recibido : 30-09-2008
Aceptado: 22-10-2008