

**Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara  
Departamento Provincial de Genética Médica  
Hospital Gineco Obstétrico Universitario Mariana Grajales**

**FACTORES GENÉTICOS Y AMBIENTALES EN MADRES CON  
DESCENDENCIA AFECTADA POR DEFECTOS CONGÉNITOS  
FOLATO-SENSIBLES EN VILLA CLARA**

**TRABAJO EN OPCIÓN DEL GRADO CIENTÍFICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS**

**Autor: Dr. Noel Taboada Lugo**

**SANTA CLARA  
2022**

**Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara  
Departamento Provincial de Genética Médica  
Hospital Gineco Obstétrico Universitario Mariana Grajales**

**TRABAJO EN OPCIÓN DEL GRADO CIENTÍFICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS**

**FACTORES GENÉTICOS Y AMBIENTALES EN MADRES CON  
DESCENDENCIA AFECTADA POR DEFECTOS CONGÉNITOS  
FOLATO-SENSIBLES EN VILLA CLARA**

**Autor: Dr. Noel Taboada Lugo**

**Tutora: Dra. C. Manuela Herrera Martínez**

**SANTA CLARA  
2022**

# INITIUM

*La insistencia es mi lugar,  
el himno con que me elevo.  
Tomo la roca de nuevo  
para volver a empezar.*

*Discurso del aprendiz de Sísifo.*

## DEDICATORIA

*A mis hijos, Clau y Ale, por todas las horas que dejamos de compartir...*  
*A mi tío Orly, por brindarme siempre todo su apoyo hasta su partida  
prematura a la eternidad.*

## AGRADECIMIENTOS

*En todo este periodo tuve que superar pesados obstáculos y dificultades de toda índole, pero cual émulo de Sísifo, la persistencia y la perseverancia me permitieron enfrentarlos.*

*Pero a diferencia del mitológico personaje griego, en este gran esfuerzo de llegar a la cima conté con el apoyo de muchas personas, a quienes ofrezco aquí mi sincera gratitud.*

*En primer lugar, a mi madre, sin su sostén y ayuda sin límites no hubiera sido capaz de llevar a feliz término este proyecto.*

*A mi papá por su preocupación permanente sobre cuánto me restaba por finalizar.*

*A mi hermana, por acompañarme siempre, aún hasta en los ingresos hospitalarios en este periodo.*

*A mi tutora y profesora desde mi etapa de pregrado, Manuela Herrera, quien con grandes esfuerzos me acompañó y apoyó siempre en la búsqueda de alternativas para reemprender el camino*

*A todos mis compañeros de trabajo, en particular a Felicia y Maritza quienes trabajaron siempre con entusiasmo en el proyecto, a María Dolores y Liset por todo el apoyo brindado, a mi hermana y amiga desde la etapa de la residencia, Greisy, por asumir durante todo este tiempo una mayor carga sobre sus hombros; a Miguel por ayudarme en la gestión de recursos, a Gisela y Ana Esther quienes me ayudaron a localizar y ver algunos casos.*

*A Danay, Vivian y Hamlet por poner también sus ojos al microscopio.*

*Al profe y ya amigo, Raúl Ferreira por poner a nuestra disposición toda su inmensa sabiduría y su valioso tiempo.*

*A Angel Mollineda por asumir con entusiasmo la idea y acompañarnos hasta el final.*

*A Beatriz Marcheco quien apoyó el proyecto desde sus inicios y me acompañó a tocar nuevas puertas cuando otras se cerraban.*

*A Teresita, Alina, Tatiana, Manolito y Elizabeth por su colaboración y apoyo desde sus respectivos laboratorios.*

*A la profe Estela por infundirme siempre ánimos y conminarme a poner un codón de terminación.*

*A Angel Aquino y a Luis Amaquer, por los entrenamientos brindados en las técnicas de extracción de ADN y de estudio molecular de los polimorfismos, respectivamente. A Luisito le agradezco, además, por utilizar su tiempo y sus recursos en el procesamiento molecular de un número de casos.*

*A Geni y Hartley quienes se unieron con entusiasmo al proyecto desde sus inicios.*

*A todas mis amigas y amigos de la residencia, Amanda, Mayte, Frank, Rafael, Katia Brianne, Osvaldo y Rosi, pero sobre todo a mi hermano Roberto, quien puso a mi disposición su caudal de conocimientos y encontró opciones para brindar su ayuda ante las dificultades creadas por la pandemia.*

*A todos los profesores del Programa Doctoral: Nélida, Cañizares, María, Manuela y a la profe Otmará, quien la Covid-19 nos la arrebató antes de tiempo, así como a todos los colegas y amigos que estamos juntos en este Programa de formación Doctoral, por el apoyo y sostén emocional para no cejar en el empeño de llegar a la cima.*

*A mi prima Geidy, por estar siempre ahí cuando la necesité. A mis sobrinas, por ser también mis hijas.*

*A mi prima Yudi quien tuvo que hacer maravillas para arreglarme la computadora las múltiples veces que se rompió, para añadir un poco más de peso a la ya pesada carga.*

*A mi amigo Abelardo, quien desde la distancia no dejó de preocuparse por las cuestiones más vitales o los detalles más pequeños.*

*A mi prima Yanisley, quien estuvo a mi cabecera en los ingresos hospitalarios durante el periodo de la investigación.*

*A toda mi familia, de aquí y de allá, a todos mis amigos y amigos cubanos, españoles y bolivianos: Zander, Janito, Noel, Mayra, Dagny, Compadre y Maritza, Rafael, Oscar y Noelya; por sus buenos deseos de que corriera con más suerte que Sísifo y que lograra, al final, llegar victorioso a la cima. ¡A todos... Muchas Gracias!*

## LISTADO DE ABREVIATURAS

**aa:** Aminoácido (s)

**ADN:** Ácido Desoxinucleico

**AEM:** Avanzada edad materna

**AF:** Ácido fólico

**AFP:** Alfa Feto Proteína

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**Ca:** Calcio

**CC:** Cardiopatías congénitas

**CCCT:** Cardiopatías congénitas conotruncuales

**CI:** Coeficiente de inteligencia

**CIA:** Comunicación interauricular

**CID-10:** International Classification of Diseases, 10th Revision (Clasificación internacional de Enfermedades- 10ma Revisión)

**Cu:** Cobre

**CIV:** Comunicación interventricular

**DC:** Defectos congénitos

**DM:** Diabetes mellitus

**DS:** Desviación estándar

**DPN:** Diagnóstico prenatal

**DTN:** Defectos del Tubo Neural

**EB:** Espina bífida

**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilendiaminotetraacético)

**EHW:** Equilibrio de Hardy Weinberg

**EUA:** Estados Unidos de América

**Fe:** Hierro

**FISH:** Fluorescence In Situ Hybridation (Hibridación in situ fluorescente)

**GS:** Gastrosquisis

**Hcis:** Homocisteína

**Hinfl:** Endonucleasa de restricción proveniente del Haemophilus influenzae I.

**HLP:** Hendiduras labiopalatinas

**HTA:** Hipertensión Arterial

**IC:** Intervalo de Confianza

**IEE:** Interrupciones electivas del embarazo

**IMC:** Índice de masa corporal

**Kb:** Kilobases

**kD:** Kilodaltons

**LL:** Labio leporino

**LLR:** Log likelihood (Razón de máxima verosimilitud)

**Mg:** Magnesio

**mL:** Mililitros

**µL:** Microlitros

**µmol/L:** Micromoles por litro

**MTHFR:** Metilén Tetrahidrofolato Reductasa

**MTHF:** Metil Tetrahidrofolato

**MSX1:** Muscle Segment Homeobox gene 1 (Gen homeótico 1 de segmento muscular)

**NM:** Nacido muerto

**nm:** Nanómetros

**NOS:** Nitric oxid synthase (Sintasa de Óxido Nítrico)

**NV:** Nacidos vivos

**OMIM:** Online Mendelian Inheritance in Men (Catálogo en línea de genes y trastornos mendelianos en el hombre)

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OR:** Odds Ratio o razón de productos cruzados.

**PA:** Prevalencia ajustada

**PAX:** Paired Box (Cajas pareadas)

**PCA:** Persistencia Conducto Arterioso

**PCR:** Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la Polimerasa)

**PH:** Paladar hendido

**RECUMAC:** Registro Cubano de Malformaciones Congénitas

**RECUPREMAC:** Registro Cubano Prenatal de Malformaciones Congénitas.

**RFC1:** Reduced Folate Carrier 1 (Transportador de folato reducido 1)

**RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphic (Fragmento de restricción de longitud polimórfica)

**RN:** Recién nacido

**rpm:** Revoluciones por minuto

**SD:** Síndrome Down

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**SNP:** Single Nucleotide Polymorphisms (polimorfismos de un único nucleótido)

**TF:** Tetralogía de Fallot

**TGV:** Transposición de Grandes Vasos

**TP:** Tasa de prevalencia

**TN:** Tubo Neural

**UNIMMAP:** United Nations International Multiple Micronutrient Preparation (Preparación internacional de múltiples micronutrientes de las Naciones Unidas)

**Vs:** Versus (frente a, contra)

**Zn:** Cinc



## SÍNTESIS

Se realizó un estudio de casos y controles en Villa Clara para estudiar factores genéticos y ambientales relacionados con defectos congénitos folato-sensibles entre 2013 y 2018. Se aplicó un cuestionario a 106 madres de casos prevalentes e igual cantidad de casos incidentes y controles. En todas se determinó la segmentación neutrofílica y concentraciones de cinco oligoelementos. En 100 madres se determinaron niveles de homocisteína y en 133 el polimorfismo C677T. Se analizó el efecto aislado y conjunto de las variables sobre la aparición de dichos defectos. Se identificaron conglomerados que incluyeron cuatro municipios. Las edades maternas extremas, enfermedades crónicas, consumo de medicamentos, periodo intergenésico corto, alteraciones del peso materno y consumo deficiente de folatos resultaron asociados en diversos análisis. La hipersegmentación neutrofílica y los niveles de homocisteína resultaron buenos marcadores indirectos de deficiencia de folatos. Las bajas concentraciones maternas de cinc, hierro y magnesio, así como la hipercupremia, se asociaron a la presencia de cardiopatías, DTN y hendiduras labiopalatinas en su descendencia. El alelo 677T se asoció al total de madres con hijos con estos defectos y con DTN, evidenciándose en modelos de codominancia y recesividad. Los análisis multivariados de parámetros maternos muestran el origen multifactorial de los defectos folato-sensibles.

# TABLA DE CONTENIDOS

<b>INITIUM</b> .....	
<b>DEDICATORIA</b> .....	
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b> .....	
<b>SÍNTESIS</b> .....	
<b>TABLA DE CONTENIDOS</b> .....	
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Situación problémica .....	3
Problema Científico: .....	3
Hipótesis de investigación: .....	3
Objetivo General.....	3
Objetivos Específicos: .....	3
Fundamento metodológico de la tesis .....	4
Volumen, estructura de la tesis y diseño metodológico .....	4
Limitaciones del estudio .....	7
Control de sesgos de la investigación.....	8
Consideraciones éticas .....	10
Novedad científica .....	10
Aportes teóricos: .....	11
Aportes prácticos:.....	11
Aportes Sociales: .....	11
Aportes Metodológicos: .....	11
<b>CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO</b> .....	12
1.1- Consideraciones generales sobre los defectos congénitos: definiciones y clasificaciones.....	12
1.2- Aspectos epidemiológicos: Prevalencia ajustada. Análisis de conglomerados.....	13
1.3- Causa de los defectos congénitos .....	14
1.4- Micronutrientes y defectos congénitos .....	15
1.5- Mecanismos moleculares y celulares en los defectos congénitos.....	17
1.6- Estructura del gen MTHFR y de la proteína.....	17
1.7- Polimorfismos del gen MTHFR .....	17
1.8- Control epigenético de la expresión fenotípica .....	19

1.9- Factores de riesgo ambientales en el origen de los defectos congénitos.....	20
1.10- Detección de la deficiencia materna de ácido fólico.....	20
1.11- Homocisteína e hiperhomocisteinemia .....	21
1.12 Prevención de los defectos congénitos .....	21
1.13 Conclusiones parciales.....	22
<b>CAPÍTULO 2. IDENTIFICACIÓN DE CONGLOMERADOS Y DE FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LOS DC FOLATO-SENSIBLES.....</b>	<b>23</b>
2.1 Introducción.....	23
2.2 Objetivos.....	23
2.3 Material y Métodos .....	23
2.3.1 Definición de universo, población y muestra.....	23
Universo: .....	23
Población: .....	23
2.3.2 Selección de la muestra:.....	23
2.3.3 Métodos de recolección del dato primario .....	25
2.3.4 Identificación de conglomerados temporales, espaciales y espacio-temporales de DC folato-sensibles .....	26
2.3.5 Variables clínicas, epidemiológicas, nutricionales y de riesgo incluidas en el estudio .....	27
2.3.6 Técnicas estadísticas empleadas para contrastar los resultados de los factores de riesgo..	28
2.4 Resultados. ....	29
2.4.1 Conglomerados temporales, espaciales y espacio-temporales de los DC folato-sensibles..	29
2.4.2 Identificación de factores de riesgo asociados a los defectos congénitos mediante análisis bivariado.....	31
2.4.3 Identificación de factores de riesgo mediante análisis multivariado.....	32
2.5 Discusión.....	33
2.5.1 Conglomerados temporales, espaciales y espacio-temporales de los DC folato-sensibles..	33
2.5.3 Factores de riesgo asociados a los defectos congénitos folato-sensibles identificados en el análisis bivariado y multivariado.....	39
2.6 Conclusiones parciales.....	46
TABLAS Y FIGURAS DEL CAPÍTULO 2.....	
<b>CAPÍTULO 3 ESTUDIO DE LA SEGMENTACIÓN NEUTROFÍLICA, NIVELES SÉRICOS DE OLIGOELEMENTOS Y HOMOCISTEÍNA EN MADRES CON DESCENDENCIA AFECTADA POR DEFECTOS CONGÉNITOS FOLATO-SENSIBLES.....</b>	<b>48</b>
3.1 Introducción.....	48
3.2 Objetivos.....	48

3.3 Material y Métodos .....	48
3.3.1 Definición de la muestra de estudio .....	48
3.3.2 Métodos de recolección del dato primario para el estudio de variables analíticas .....	48
3.3.3 Obtención de las muestras de estudio de parámetros analíticos .....	49
3.3.4 Estudio de la segmentación nuclear de neutrófilos .....	49
3.3.5 Determinación de las concentraciones séricas de cinc, cobre, magnesio, hierro y calcio....	50
3.3.6 Determinación de las concentraciones de Homocisteína .....	50
3.3.7 Variables analíticas incluidas en el estudio .....	51
3.3.8 Técnicas estadísticas empleadas para contrastar los resultados del estudio de la segmentación neutrofílica, los niveles séricos de Zn, Cu, Ca, Mg, Fe y Homocisteína .....	52
3.4 Resultados .....	53
3.4.1 Resultados del estudio de segmentación neutrofílica en lámina periférica .....	53
3.4.2 Resultados de las concentraciones séricas de oligoelementos.....	55
3.4.3 Análisis conjunto de variables epidemiológicas, la hipersegmentación neutrofílica y las concentraciones séricas maternas de oligoelementos como factores de riesgo para DC folato-sensibles en la descendencia.....	57
3.4.4 Resultados de la determinación de Homocisteína.....	57
3.4.5 Análisis conjunto de las variables epidemiológicas, hipersegmentación neutrofílica, concentraciones séricas maternas de oligoelementos y de homocisteína como factores de riesgo para DC folato-sensibles en la descendencia .....	59
3.5 Discusión de los resultados.....	59
3.5.1 Segmentación nuclear de neutrófilos en lámina periférica .....	59
3.5.2 Concentraciones séricas de oligoelementos .....	60
3.5.3 Concentraciones séricas de Homocisteína.....	65
3.5.3.1 La hiperhomocisteinemia como factor de riesgo para el conjunto de los DC folato-sensibles y según grupo de defectos congénitos.....	66
3.5.6 Análisis de la influencia de variables epidemiológicas y analíticas de conjunto en el riesgo de aparición de los DC folato-sensibles.....	68
3. 6 Conclusiones parciales.....	69
TABLAS Y GRÁFICOS DEL CAPÍTULO 3.....	
<b>CAPÍTULO 4. ESTUDIO DEL POLIMORFISMO C677T DEL GEN MTHFR EN MADRES CON DESCENDENCIA AFECTADA POR DEFECTOS CONGÉNITOS FOLATO-SENSIBLES .....</b>	<b>70</b>
4.1 Introducción.....	70
4.2 Objetivos.....	70
4.3 Material y Métodos .....	70
4.3.2 Metodología del estudio molecular del polimorfismo C677T del gen MTHFR .....	71

4.3.3 Variables moleculares .....	72
4.3.4 Técnicas estadísticas empleadas para determinar la existencia de equilibrio génico .....	73
4.3.5 Determinación de las frecuencias génicas y genotípicas en las madres de casos y controles .....	74
4.3.6 Estudios de asociación genética del polimorfismo C677T del gen MTHFR.....	74
4.3.7 Relación entre el genotipo y otras variables de riesgo .....	74
4.4 Resultados .....	75
4.4.1 Estudio del equilibrio génico en el polimorfismo MTHFR C677T .....	75
4.4.2 Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo MTHFR C677T .....	75
4.4.3 Estudios de asociación genética del polimorfismo C677T en la muestra total y por defectos congénitos específicos.....	76
4.4.4 Relación entre los genotipos del polimorfismo C677T y otras variables de riesgo.....	77
4.4.4.1 Concentraciones maternas de Homocisteína según genotipo del polimorfismo C677T ...	78
4.4.5 Análisis conjunto de las variables epidemiológicas, analíticas y moleculares .....	78
4.5 Discusión .....	78
4.5.1 Estudio del equilibrio génico de Hardy Weinberg en el polimorfismo C677T .....	78
4.5.2 Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C677T.....	79
4.5.3 Estudios de asociación genética del polimorfismo C677T .....	83
4.5.4 Relación entre los genotipos del polimorfismo C677T y otras variables de riesgo en el análisis bivariado y multivariado.....	86
4.5.5 Análisis de la influencia conjunta de variables epidemiológicas, analíticas y del resultado del genotipaje en el riesgo de aparición de los DC folato-sensibles .....	89
4.6 Conclusiones parciales.....	90
TABLAS Y GRÁFICOS DEL CAPÍTULO 4.....	
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>91</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>92</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	
<b>AUTOBIBLIOGRAFÍA .....</b>	
<b>ANEXOS INTRODUCCIÓN .....</b>	
<b>ANEXOS CAPÍTULO 2 .....</b>	
<b>ANEXOS CAPÍTULO 3 .....</b>	
<b>ANEXOS CAPÍTULO 4 .....</b>	

## INTRODUCCIÓN

Los defectos congénitos (DC) son alteraciones morfológicas, bioquímicas o funcionales de origen prenatal, que originan una alta mortalidad y variedad de complicaciones. Los recién nacidos (RN) con DC, comparados con aquellos que no los tienen, son más propensos a hospitalizaciones, así como a alteraciones neurológicas y psicológicas. (1) (2)

De acuerdo a datos aportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año fallecen 303 000 RN en el mundo debido a DC. Además, constituyen la segunda causa de mortalidad en menores de un año y entre las edades entre uno y cuatro años. De forma adicional, un incontable número de DC conlleva a abortos y muertes fetales. Según datos de este organismo internacional, el 94% de los DC mayores ocurren en países de ingresos bajos y medios, donde resulta común la deficiencia materna de macro y micronutrientes. (1) (2) (3) (4) (5)

Entre los años 2013 y 2018 fallecieron en Cuba 2162 menores de un año por DC y anomalías cromosómicas, para una tasa de prevalencia de 3,0 por 1000 nacidos vivos (NV). En igual periodo fallecieron por esta causa en la provincia de Villa Clara 38 menores de un año, con una tasa de 0,83 por 1000 NV y constituyó la segunda causa de mortalidad infantil. (6) (7) (8)

Aunque los DC mayores como grupo, son relativamente frecuentes, estos incluyen una variedad de procesos morfológicos que son etiológicamente distintos y con frecuencias diferentes. Por ello, resulta oportuna su agrupación etiopatogénica siempre que sea posible, por ejemplo, los DC sensibles a la deficiencia materna de ácido fólico (AF); entendiéndose como tal aquellos DC en los que se ha comprobado una disminución de su frecuencia, luego de la suplementación materna preconcepcional o fortificación de alimentos con AF. (3)

Entre los DC folato-sensibles se describen los defectos del tubo neural (DTN), las cardiopatías congénitas conotruncales (CCCT), las hendiduras labiopalatinas (HLP), la gastrosquisis (GS); así como el síndrome Down (SD) por trisomía libre o total del cromosoma 21. (9)

El folato es un nutriente esencial, debido a que los mamíferos carecen de actividad fisiológica para sintetizarlo, es necesario obtenerlo de la dieta o consumir su forma sintética: el AF. (10) (11)

Diferentes indicadores bioquímicos son útiles para medir el estado nutricional del AF, el folato sérico permite identificar su ingesta reciente, mientras que el eritrocitario evalúa sus reservas corporales. (11) (12)

También se utilizan marcadores indirectos del estado del folato a través de la identificación de cambios morfológicos en el frotis sanguíneo y la determinación de compuestos generados en las vías relacionadas con su metabolismo, siendo la homocisteína (Hcis) la de mayor utilización en la clínica. (11)(12)

Este aminoácido sulfurado, derivado demetilado de la metionina, después de su conversión en S-adenosilmetionina constituye el donante más importante de grupos metilos en el organismo, cuya reacción de remetilación está estrechamente relacionada con el gen metilén tetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Se han descrito diversos polimorfismos del gen MTHFR asociados a los DC folato-sensibles; el más estudiado es el C677T (rs1801133), considerado como la causa genética más frecuente de hiperhomocisteinemia moderada. (13)(14)

A pesar del impacto personal, familiar y en la salud pública, las causas de la mayoría de los DC son poco conocidas. El conocimiento de los factores genéticos, como los polimorfismos en diferentes genes que intervienen en el metabolismo del AF y de la Hcis, así como de factores epigenéticos como los nutricionales y los ambientales, sería de enorme beneficio al mejorar la calidad del proceso de asesoramiento genético de estos defectos multifactoriales. (3)

Los factores genéticos tienen un peso importante en el origen de estos defectos, bien como causa primaria o como modificadores de la exposición ambiental. (3)(15)

La epigenética describe cómo las células que tienen la misma información genética, presentan diferentes patrones de expresión génica para cumplir funciones específicas. En la década de los 40, Waddington usó este término para explicar cómo los genes y factores ambientales, como los nutricionales, interactúan para modular el proceso de desarrollo y la expresión fenotípica. (16)(17)

Además de la deficiencia de AF, existen evidencias que muestran que las carencias de otros micronutrientes como los oligoelementos, se relacionan con DC. Las deficiencias de múltiples micronutrientes (como oligoelementos y vitaminas) a menudo coexisten en las mujeres en edad reproductiva, sobre todos en aquellos países donde las dietas son deficientes en nutrientes y micronutrientes, lo cual se exagera durante el embarazo; debido al incremento de las demandas del feto en desarrollo, lo que implica consecuencias maternas y embriofetales. Se conoce que las deficiencias de micronutrientes a menudo coexisten y se espera que la suplementación múltiple tenga un efecto más favorable que la suplementación de micronutrientes aislados, aunque, las interacciones podrían provocar pobre absorción de algunos de ellos. (18)(19)

## Situación problemática

La relevancia que han alcanzado los DC en Villa Clara como una de las primeras causas de mortalidad infantil es un tema que preocupa a los especialistas vinculados al programa de atención materno infantil, sin embargo; la gestión en la búsqueda de nuevos conocimientos teóricos en esta área de interés aún no es suficiente, lo que limita la elaboración de estrategias basadas en evidencias científicamente fundamentadas para la prevención primaria preconcepcional de los DC folato-sensibles.

**Problema Científico:** En Cuba no han sido explorados factores de riesgo maternos asociados a un conjunto de cinco tipos de DC folato-sensibles, ni la existencia de conglomerados de elevada prevalencia de los DC folato-sensibles. Por otra parte, no existen evidencias de investigaciones en la provincia de Villa Clara, ni en Cuba, que estudien parámetros analíticos en las madres de productos con DC folato-sensibles, que valoren la relación entre su presencia y determinadas variables genéticas y ambientales de riesgo, así como factores epigenéticos tales como las concentraciones maternas de algunos oligoelementos y de Hcis, la presencia de hipersegmentación nuclear de neutrófilos y del polimorfismo C677T en el gen MTHFR.

**Hipótesis de investigación:** El estudio de conglomerados espaciales y espacio-temporales de estos defectos, permite identificar territorios de mayor riesgo poblacional.

La interacción de factores genéticos, ambientales y epigenéticos, como los nutricionales y la presencia del alelo mutado del polimorfismo C677T en el gen MTHFR en las madres, incrementa el riesgo de aparición en la descendencia de DC folato-sensibles.

**Objeto de investigación:** Los DC sensibles a la deficiencia materna de ácido fólico.

**Sujeto de investigación:** Productos con DC folato-sensibles, los controles seleccionados y las madres de estos casos y controles.

**Campo de acción:** Variaciones espacio-temporales y factores de riesgo genéticos y no genéticos asociados a los DC folato-sensibles.

## Objetivo General

Analizar la influencia de factores de riesgo maternos genéticos y ambientales en la aparición de defectos congénitos folato-sensibles en su descendencia, en la provincia Villa Clara en el periodo 2013-2018.

## Objetivos Específicos:

1. Identificar conglomerados temporales, espaciales o espacio-temporales de DC folato-sensibles.



2. Identificar factores de riesgo de diferente naturaleza, asociados a la aparición de estos defectos congénitos.
3. Determinar la asociación entre variables epigenéticas reflejo de deficiencias nutricionales en madres con hijos con defectos congénitos folato-sensibles.
4. Identificar la relación entre la presencia del polimorfismo C677T del gen MTHFR en las madres y la aparición de los DC folato-sensibles en su descendencia.

### Fundamento metodológico de la tesis

La investigación se insertó en el contexto de la medicina fetal y preventiva. El fundamento metodológico se sustenta en el análisis del efecto conjunto de diferentes variables maternas: genéticas, ambientales, nutricionales y del polimorfismo C677T del gen MTHFR, así como la relación entre éstas sobre la presencia de DC folato-sensibles en los productos de la gestación. En la investigación se aplicaron los siguientes métodos para la obtención del conocimiento:

**Del nivel teórico:** Histórico y lógico: para realizar el análisis del surgimiento, desarrollo y evolución de teorías acerca del papel de la deficiencia de AF en el origen de los DC. El método analítico-sintético permitió estudiar el fenómeno, analizar la situación actual del problema, determinar las categorías esenciales. Inductivo-deductivo: para la elaboración del paradigma del proceso investigativo, cumplimentando los objetivos específicos y el objetivo general. Hipotético-deductivo: Tomó como premisa la hipótesis de la investigación y siguiendo las reglas de la deducción, llegar a nuevas conclusiones y predicciones empíricas.

**Del nivel Empírico:** La confección y aplicación de un cuestionario permitió obtener la exposición a los factores de riesgo. Documentación científica: revisión de estadísticas vitales, resultados de exámenes, fichas de RECUMAC y RECUPREMAC. Observación científica participante en el examen físico de los casos, la interpretación de los resultados de los estudios analíticos de hipersegmentación, concentración de oligoelementos, Hcis y del polimorfismo estudiado. Los métodos analíticos para el manejo de los datos cualitativos y cuantitativos, determinar asociación entre variables de diferente naturaleza, evaluación bivariada y multivariada de riesgos y para estudios de asociación genética, lo que posibilitó a través de muestras hacer inferencias a la población. El enfoque sistémico permitió el reconocimiento de interrelaciones complejas entre variables que muestran un efecto de potenciación entre ellas.

### Volumen, estructura de la tesis y diseño metodológico

La tesis se presenta como un documento único de 92 páginas. Se estructura en Introducción; Capítulo 1 (Marco teórico) y tres capítulos de resultados, cada uno con objetivos parciales,

diseño metodológico específico, resultados, discusión, conclusiones parciales, tablas y gráficos. Además, la tesis consta de Conclusiones, Recomendaciones, Bibliografía, Autobiografía y Anexos.

Para dar salida a los objetivos generales y específicos de la investigación realizada, la cual se documenta en esta tesis, se realizó un diseño metodológico tipo caso-control, que comprende varias tareas de investigación.

En las madres de los casos y de los controles incluidos se estudiaron variables clínico-epidemiológicas de riesgos genéticos y ambientales, por exposición durante el primer trimestre de la gestación, las que fueron obtenidas con indagación retrospectiva. Se les determinaron variables analíticas epigenéticas de tipo nutricional (segmentación nuclear de neutrófilos, concentraciones de cinco oligoelementos y de Hcis) a partir de muestras sanguíneas maternas obtenidas en el momento de su inclusión en el estudio. De igual forma se estudió una variable molecular, mediante la determinación del polimorfismo C677T del gen MTHFR con muestras de ADN linfocitario obtenidas a partir de las muestras sanguíneas maternas disponibles.

El Capítulo 2 contiene los resultados de la tarea de investigación dirigida a la búsqueda de conglomerados espaciales, temporales y espacio-temporales de DC folato-sensibles, para ello se estableció la prevalencia ajustada de estos DC según municipios y años de ocurrencia, lo que se realizó a partir de la totalidad de los casos registrados en NV, nacidos muertos (NM) e interrupciones electivas del embarazo (IEE) entre 2013 y 2018 en Villa Clara y la totalidad de los nacidos en igual período. Para la búsqueda de conglomerados se empleó el método de Kulldorff. Este capítulo incluye, además, los resultados del estudio de los factores de riesgo genéticos y ambientales potencialmente asociados a estos DC en el total de madres de casos y controles incluidos en el estudio epidemiológico que estuvieron expuestas o no a los mismos, durante el periodo de organogénesis activa en el primer trimestre del embarazo. Se efectuó un estudio de asociación bivariado y un estudio de regresión logística binaria, con aquellas variables que cumplieran los requisitos establecidos.

Los casos incluidos en el análisis de factores de riesgo provienen de la totalidad de casos registrados entre 2013 y 2018, pero su inclusión tuvo en cuenta el cumplimiento de los criterios siguientes:

- Se incluyeron la totalidad de los casos incidentes NV, NM y con IEE entre 2016 y 2018, los que se fueron incorporando al estudio en la misma medida que se realizaba el diagnóstico de alguno de los DC aislados del tipo CCCT, DTN, HLP, GS y SD (por trisomía 21 libre

confirmados por cariotipo) o bien una combinación no sindrómica de alguno de los anteriores, cuyas madres residieran en alguno de los municipios de Villa Clara y dieran su consentimiento para participar.

- Se incluyeron casos prevalentes nacidos en alguno de los hospitales de Villa Clara, entre 2013 y 2015 con los mismos tipos de DC y condición al nacer, hasta completar la misma cantidad de casos incidentes con cada uno de los cinco tipos de DC estudiados, los que se tomaron luego de descartar las madres que no consintieron en participar y las que no fue posible localizar por traslado de domicilio o salida del país.

- Se incluyeron controles sin ningún tipo de DC, nacidos vivos en alguno de los hospitales de Villa Clara, entre 2016 y 2018, tomados en el momento que se hacía el diagnóstico del caso incidente, provenientes de las mismas áreas de salud que aquellos, con el menor tiempo posible de diferencia con la fecha de diagnóstico de los casos incidentes y siempre con menos de tres meses de diferencia del nacimiento del caso incidente. Fueron tomados en una relación 1:1 hasta completar la misma cantidad de casos incidentes.

Fueron considerados los siguientes criterios de exclusión:

- Madres con antecedentes de haber recibido transfusiones sanguíneas en un periodo menor a seis meses.

- Madres con antecedentes patológicos personales de enfermedad arterial coronaria, cáncer, trombofilia o insuficiencia renal.

El Capítulo 3 incluye los resultados del análisis de los parámetros sanguíneos maternos, que, en el caso de la segmentación nuclear de neutrófilos y la concentración de oligoelementos se realizó a la totalidad de las madres. Para la evaluación de las concentraciones de Hcis se tomaron muestras de sangre a todas las madres de casos y controles y fueron debidamente identificadas en tres grupos: A (casos incidentes), B (casos prevalentes) y C (controles). A partir del número posible de muestras a estudiar, definido por el laboratorio donde se hicieron las determinaciones, se fueron tomando muestras a ciegas y al azar, garantizando que las mismas se distribuyeran por igual entre los tres grupos, así como la aleatorización de las muestras estudiadas.

Los resultados de las concentraciones de los parámetros sanguíneos maternos estudiados se compararon entre casos incidentes respecto a los controles, casos prevalentes respecto a los controles y casos incidentes respecto a los prevalentes, a fin de evaluar la repercusión del tiempo transcurrido entre la ocurrencia del evento dismorfogénico y la toma de la muestra de sangre a la madre, así como el efecto de la presencia o no del DC en la descendencia.

Además de estos análisis, dichas variables independientes se unieron a las variables epidemiológicas de riesgos genéticos y ambientales y se efectuó un análisis de regresión logística binaria, para analizar el efecto conjunto de todas ellas sobre la aparición de estos DC. El Capítulo 4 contiene los resultados del estudio de asociación genética del polimorfismo C677T en madres con hijos con estos DC y controles, el cual se realizó a un grupo de madres. A partir de las muestras de ADN obtenidas de la totalidad de las madres incluidas en el estudio, las que fueron identificadas en tres grupos, del mismo modo que se realizó para la determinación de Hcis, se distribuyeron por igual, a ciegas y al azar las muestras que serían genotipadas, hasta completar la cantidad de determinaciones declaradas por el laboratorio que las realizó, garantizando la aleatorización de las muestras.

La comprobación de la existencia de equilibrio de Hardy Weinberg, se realizó a partir de la muestra control del presente estudio y también de los resultados de la genotificación de una muestra control de un estudio realizado en la provincia de Holguín. Se realizaron los análisis de los controles de cada provincia por separado y de manera conjunta. Una vez comprobado que no había diferencias en las frecuencias génicas ni genotípicas entre ambas y que estaban en equilibrio génico, se procedió a realizar el análisis de asociación empleando siete modelos diferentes. Además de estos análisis, se realizó un análisis multivariado de regresión logística, empleando las variables epidemiológicas, analíticas y el polimorfismo estudiado, para evaluar el efecto conjunto de todas ellas sobre la aparición del DC folato-sensible en la descendencia.

El diagrama general de la investigación, así como las muestras finales empleadas en cada tarea de investigación aparecen en el Anexo 1, mientras que la metodología específica detallada de cada una, aparece en los respectivos capítulos, del dos al cuatro.

Para el procesamiento estadístico de la información, los procedimientos empleados fueron los sugeridos acorde a la naturaleza de la variable y a los objetivos de la investigación. Para todos los estudios se empleó un nivel de significación  $\alpha=0,05$  para diferencias significativas y  $\alpha=0,001$  para diferencias altamente significativas. Las técnicas estadísticas específicas utilizadas aparecen desglosadas en los diferentes capítulos.

### Limitaciones del estudio

La identificación de factores teratogénicos es complicada, debido a la variabilidad del riesgo (que depende del momento y dosis de exposición, entre otros factores) y a la incertidumbre de la exposición, en la presente investigación a las madres de los casos prevalentes se le recabó información respecto a su embarazo en un lapso de tiempo posterior al diagnóstico, por lo que

no puede descartarse el sesgo de memoria en estos casos. Las variables epidemiológicas y analíticas se determinaron con posterioridad al periodo crítico de organogénesis, con un lapso de tiempo mayor para los casos prevalentes, por lo que, como en todos los estudios de casos y controles, el sesgo de la temporalidad no pudo ser controlado.

Otras limitaciones del estudio estuvieron en la imposibilidad de realizar la determinación de las concentraciones séricas o eritrocitarias de AF, por lo que se procedió a la cuantificación de los niveles maternos de Hcis total, como un sensible marcador bioquímico indirecto de la deficiencia materna de AF, aunque no fue posible realizar su cuantificación en la totalidad de la muestra, por lo que fue preciso realizar las determinaciones en dos laboratorios diferentes.

Por limitaciones de recursos, el genotipaje del SNP no pudo realizarse a la totalidad de las madres incluidas, por lo que el tamaño de la muestra fue pequeño, lo que limita la interpretación de los resultados de los estudios de asociación genética. De igual forma, el número de controles genotipados fue bajo, por ello se incorporaron los resultados del genotipaje del polimorfismo C677T de los controles de un estudio realizado en otra provincia, para el análisis del equilibrio génico y para los estudios de asociación, práctica ésta que resulta habitual en los estudios internacionales multicéntricos.

### Control de sesgos de la investigación

Para el control de los sesgos en el diagnóstico de los DC se trianguló la información procedente del RECUMAC y del RECUPREMAC con los informes de estudios sonográficos, citogenéticos o anatomopatológicos; estos últimos constituyeron la regla de oro. A los casos incidentes NV y controles se les realizó, además, un examen físico y dismorfológico por parte del autor.

Para la obtención de la información respecto a los factores de riesgo, el cuestionario aplicado (Anexo 2) fue previamente validado y el mismo fue aplicado siempre por el autor del trabajo. El periodo de exposición considerado fue el primer trimestre de la gestación o de organogénesis.

Para el análisis multivariado se consideraron aquellas variables que se asociaron significativamente con los DC en el análisis bivariado, que no presentaran colinealidad y con suficiente evidencia en la literatura. Para el control del sesgo de memoria se verificó que los factores de riesgos asociados significativamente con los DC en el grupo de madres de los casos incidentes y prevalentes de conjunto, respecto a los controles, no diferían del comportamiento existente entre el grupo de madres de casos incidentes respecto a los controles.

Para el control del sesgo de la temporalidad en el análisis de las variables relacionadas con los factores nutricionales se tuvo en cuenta el año en que se realizó el diagnóstico y el momento de

la toma de muestras biológicas. En el análisis de estas variables se realizaron comparaciones considerando el conjunto de madres de casos (incidentes y prevalentes) respecto a los controles y entre cada grupo por separado con respecto a los controles y entre las madres de casos incidentes respecto a las prevalentes. Teniendo en cuenta que entre las madres de los casos incidentes y de los controles difieren en la presencia o no del DC en su descendencia, mientras que entre las madres de casos incidentes y prevalentes éstos coincidían en el tipo específico de DC, pero diferían en el tiempo que transcurrió entre el momento del diagnóstico del DC y la toma de las muestras sanguíneas maternas.

Para la toma de muestras biológicas, en las madres de los casos incidentes y controles, el periodo de tiempo máximo entre la incorporación al estudio y la toma de estas muestras no excedió los tres meses. Cuando la determinación se realizó en más de un laboratorio, se procedió a procesar un número de muestras a ciegas, en ambos laboratorios, para comprobar la inexistencia de diferencias entre los resultados.

Para evitar los sesgos en el análisis del polimorfismo, previo a la incorporación del resultado del genotipaje de los controles del único estudio del que existen evidencias que se haya estudiado el SNP C677T en un estudio de casos y controles en Cuba, se procedió a evaluar la existencia de equilibrio génico en los controles procedentes de Villa Clara y de Holguín por separado y se realizaron, además, análisis estadísticos para comprobar la existencia de homogeneidad entre los resultados de las frecuencias génicas y genotípicas en ambos grupos de controles.

Para el control de los sesgos de muestreo, siempre que fue posible, se incluyeron todos los casos y controles en los análisis. Las determinaciones de Hcis y el estudio del SNP C677T no se pudieron realizar a todos los casos y controles y, además, el número estudiado estuvo limitado a los que podía estudiar el laboratorio; por otra parte, dada la naturaleza del diseño, la muestra debía definirse progresivamente y los casos con posibilidades de estudiarse no podían definirse previamente para aplicar un muestreo del tipo probabilístico aleatorio simple o estratificado; por cuanto ésta no podía ser una decisión a priori. Se utilizó un muestreo no puro, que, aunque tuvo carácter no probabilístico, se introdujeron elementos azarosos, dados porque la selección de los casos se hizo a ciegas y al azar por parte del analista en el laboratorio en el momento de tomar la muestra para su análisis; hasta completar una cuota definida, que se distribuyó equitativamente entre los grupos establecidos; pero no identificados por quien las procesó.

Por otro parte, el hecho de que se obtuvieron muestras sanguíneas de todas las madres, las que se trasladaron en su totalidad a los laboratorios, garantizó que todas tuvieron la misma probabilidad de ser estudiadas; la que quedó definida a posteriori por la cuota establecida.

Del mismo modo, la inclusión de un caso prevalente y un control en el estudio por cada caso incidente que se iba diagnosticando, mediante muestreo no probabilístico secuencial; permitió completar tres grupos de estudio numéricamente equivalentes, con el mismo tipo de DC aislado para los casos prevalentes e incidentes y para la situación de caso incidente y control, con la misma área de salud y la menor diferencia posible en el periodo de nacimiento. Estas variantes de selección, previamente definidas, permitieron homogeneizar, hasta donde ésto es posible, los factores relacionados con el macroambiente.

### Consideraciones éticas

La investigación fue llevada a cabo en correspondencia con las regulaciones establecidas en la declaración de Helsinki sobre investigaciones médicas que involucran a seres humanos. (20) Fue aprobada por el Comité de Ética del Hospital Gineco Obstétrico Universitario “Mariana Grajales” de Santa Clara. Todas las madres incluidas en el estudio expresaron su consentimiento para participar en la investigación, así como para la toma de muestras biológicas y para la extracción de ADN. (Anexo 3)

### Novedad científica

Se realizan por primera vez en Cuba la genotificación de un polimorfismo del gen MTHFR en madres con descendencia afectada por DC folato-sensibles y estudios de asociación genética bajo siete diferentes modelos.

La utilización de marcadores hematológicos y bioquímicos indirectos del estado nutricional del folato en madres con descendencia afectada por estos DC, no había sido empleada antes.

No existen evidencias de estudios previos que relacionen las concentraciones maternas de cinco oligoelementos y la presencia de cinco tipos de DC folato-sensibles en su descendencia. Además, es el primer estudio analítico donde se realizan análisis tanto bivariados como multivariados, de factores de riesgo genéticos y ambientales, para cada uno de los cinco grupos de DC más comúnmente relacionados etiopatogénicamente con la deficiencia materna de AF.

La perspectiva de evaluar el efecto del papel de elementos nutricionales maternos sobre la aparición de DC en la descendencia, es un acercamiento inicial a la temática del control epigenético sobre el desarrollo embrionario.

En este sentido, el exhaustivo cuestionario elaborado y aplicado a las madres con hijos con DC folato-sensibles, recopila valiosa y novedosa información sobre aspectos nutricionales en la gestación que no son indagados en las encuestas de riesgo, que se aplican para los registros de DC existentes en Cuba.

**Aportes teóricos:** Se determinó la asociación que existe entre ciertas variables ambientales, nutricionales, biológicas, genéticas y la presencia de DC folato-sensibles, lo que permitió establecer, por primera vez, los riesgos teóricos de ocurrencia de este tipo de DC en la población cubana ante la presencia de estos factores de riesgo de diferente naturaleza.

Se aportan elementos teóricos sobre la modificación de las concentraciones de micronutrientes y de homocisteína en función del tiempo transcurrido desde la ocurrencia del DC asociado a la deficiencia materna de AF, lo que tiene utilidad en la evaluación de riesgos.

**Aportes prácticos:** La determinación de las zonas geográficas en la provincia con conglomerados de elevada prevalencia de DC folato-sensibles, así como la identificación de los factores de riesgo ambientales modificables y de las deficiencias maternas de determinados oligoelementos que se asocian con la aparición de DC en la descendencia, constituyen un valioso resultado para el diseño de estrategias preventivas preconcepcionales.

La implementación de la segmentación nuclear de neutrófilos, como un marcador hematológico más económico para el estudio del estatus nutricional del AF en gestantes, resulta factible de introducir en la práctica médica.

**Aportes Sociales:** La confección y publicación de materiales bibliográficos, luego de un análisis crítico de la bibliografía, con prioridad en los estudios sistemáticos y de meta-análisis, sobre el objeto de estudio es de utilidad para la docencia médica postgraduada y como soporte teórico en los servicios de asesoramiento genético.

**Aportes Metodológicos:** La utilización en el análisis epidemiológico de factores de riesgo de casos incidentes y prevalentes resulta un diseño metodológico que puede considerarse novedoso para el tratamiento de variables que se modifican en el tiempo, como ciertos parámetros dietarios. En los análisis de las variables maternas se consideró la potenciación intervariable al evaluar el efecto conjunto de todas ellas sobre la aparición de DC folato-sensibles, así como la interdependencia de unas sobre otras.



## CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1- Consideraciones generales sobre los defectos congénitos: definiciones y clasificaciones

Según la OMS, un DC es cualquier alteración morfológica, bioquímica o funcional de origen prenatal que se detecte en el momento del nacimiento o después. Los DC pueden ser múltiples o aislados y por su magnitud se distinguen en mayores y menores. Los primeros tienen un compromiso funcional importante para la vida del individuo. La guía de referencia de uso más común a nivel internacional para clasificar los DC es la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10) que publicó la OMS. (2) (3) (21) (22)

**Defectos congénitos folato-sensibles:** El AF desempeña un rol crucial en la regulación epigenética del desarrollo embrionario y se ha demostrado que su deficiencia se relaciona con la aparición de diferentes DC, entre ellos se describen en la literatura médica: los DTN, las CCCT y el SD, las HLP y la GS, entre otros. (21) (23) (24) (25) (26)

Las cardiopatías congénitas (Código ICD-10: Q20-Q28) (22) son todos los DC como consecuencia de alteraciones en la cardiogénesis. Las cardiopatías congénitas conotruncales (CCCT) o troncoconales, por su parte, comprenden un subgrupo de DC del tracto de salida del corazón y las grandes arterias que comparten un origen embriológico y estructural común, ya que derivan de las células cardíacas de la cresta neural y del segundo campo cardíaco. (26) Las CCCT representan entre el 20 al 30% de las cardiopatías congénitas en humanos. (27) (28) (29)

Los DTN (Códigos ICD-10: Q00, Q01, Q05) (22) constituyen un grupo heterogéneo de DC con una gran variabilidad fenotípica, que resultan de un fallo parcial o completo de la fusión del tubo neural a cualquier nivel del eje rostrocaudal entre los 23 y 27 días de vida embrionaria. Se clasifican en abiertos y cerrados. Los primeros son los más frecuentes y en ellos el tejido nervioso se expone en la superficie corporal, entre estos se incluyen la anencefalia (ICD10: Q00), el encefalocele (ICD10: Q01) y la espina bífida (EB) (ICD10: Q05). (22) (25) (26) (30) (31)

El término hendiduras labio-palatinas (Código ICD-10: Q35-Q37) (22) se refiere a la presencia de una fisura en el labio y/o paladar sin otros DC asociados, que se manifiesta por una separación incompleta entre la cavidad oral y nasal, que constituyen las DC craneofaciales más frecuentes. Se clasifican en: labio leporino (LL) con o sin paladar hendido (PH) no sindrómico y PH no sindrómico. (26) (32) (33)

La gastrosquisis (Código ICD-10: Q793) (22) se define como una herniación visceral a través de un defecto al lado derecho de la pared abdominal, con un cordón umbilical intacto y no cubierto por membranas. A comienzos de la década del 2000 se introdujo la clasificación de GS simple y compleja, la primera se reserva para los casos que tienen el defecto aislado de la pared abdominal con la protrusión intestinal, mientras que las formas complejas se refieren a aquellos que coexisten con necrosis, atresia, perforación o vólvulos. (26) (34) (35)

El síndrome Down (Código ICD-10: Q90) (22) constituye el primer síndrome de origen cromosómico descrito y la causa más frecuente de discapacidad intelectual de origen genético. La trisomía que origina el SD puede ser total o parcial. En el 95% de los casos el SD se debe a una trisomía total, libre o regular del autosoma 21 humano, y en el resto se describen aberraciones cromosómicas estructurales (translocaciones robertsonianas entre cromosomas acrocéntricos de los grupos D o G, isocromosomas del brazo largo del cromosoma 21, trisomía parcial de la región 21q22.3 y los mosaicismos cromosómicos. (36) (37) (38)

### 1.2- Aspectos epidemiológicos: Prevalencia ajustada. Análisis de conglomerados.

Los DC son un problema global, de acuerdo a la OMS se estima que afectan cada año 7,9 millones de RN y constituyen la primera causa de muerte infantil en los países desarrollados y la segunda en muchos países en vías de desarrollo, como Cuba. (2) (39) (40)

Las CC constituyen el DC más frecuente al afectar aproximadamente entre seis a 11 RN por cada 1000 NV, entre las que el 20 y el 30% son severas como las CCCT, cuya prevalencia es de 7 por cada 10 000 NV. Algunos tipos producen muy poca discapacidad, mientras que otros son incompatibles con la vida y la mayoría se asocian a una elevada comorbilidad. (27) (41) (42) (43)

Aunque la suplementación y la fortificación de alimentos con AF han reducido la incidencia de DTN, aún constituyen el tipo de DC mayores más frecuentes en muchos países. Se estima que anualmente ocurren 338 109 casos de EB y anencefalia a nivel mundial, con tasas de prevalencias estimadas entre 2 y 6 por 1000 nacimientos. (25) (44) (45) (46) (47)

La prevalencia de las HLP varía de 1 en 500 a 1 en 2500 RN, con una considerable variación entre diferentes grupos étnicos. La forma más severa se presenta en el 10% de los casos, e incluye LL bilateral y PH total, mientras que el fenotipo más frecuente (40% de los casos) presenta LL unilateral y PH total. Las formas no sindrómicas se presentan en el 76,8% de los casos. Los pacientes afectados presentan un amplio rango de trastornos funcionales y estéticos. (14) (25) (32)

La incidencia de GS es de 1-5 en 10 000 NV, aunque en las últimas décadas se ha detectado un incremento de sus tasas de prevalencia a nivel global. En EUA afecta aproximadamente a 4.5 por cada 10 000 RN, mientras que en Europa se presenta en 1: 5 000 RN. (26) (34) (35) (48)

Entre el 0,5 y el 1% de los NV presenta aberraciones cromosómicas, la más frecuente es el SD, cuya prevalencia es de 1/600 a 1/1000 NV. En Cuba la prevalencia ajustada del SD es de 7,0 por cada 10 000 NV y constituye la tasa más baja reportada en la literatura internacional en un país donde no se realizan los marcadores séricos bioquímicos para determinar el riesgo de las aneuploidías más frecuentes detectadas prenatalmente. La morbilidad de los pacientes con SD implica elevados costos, especialmente los pacientes con CC, en quienes se estima que requieren de cinco a siete veces más atención médica que aquellos sin CC. (49) (50) (51) (52)

La prevalencia ajustada, concepto postulado por Martina Cornel en 1999, es considerada aquella tasa especial en la cual se incluyen todos los DC registrados, incluso los que se interrumpen por diagnóstico prenatal. (53) Tiene la ventaja de evaluar la totalidad de casos que ocurren en un área determinada, en un periodo de tiempo específico y no solo los que prevalecen al nacimiento.

La consideración del espacio está implícita cuando se calculan las tasas de incidencia y prevalencia, sin embargo; la utilización de la prevalencia ajustada para la detección de clúster o conglomerados provee una oportunidad para identificar aspectos relacionados con la atípica distribución espacial y temporal. El patrón espacial de eventos de salud es fundamental para comprender la exposición y prevenir eventos futuros, más allá de si el proceso que subyace es contagioso, influenciado por el ambiente o relacionado con la variabilidad genotípica. (32)

### 1.3- Causa de los defectos congénitos

Los DC pueden ser de origen genético, ambiental o multifactorial. Entre un 30-40% son de causa genética, donde las mutaciones de un único gen son responsables de aproximadamente el 7,5% de todos los DC, las aberraciones cromosómicas del 6%, las causas multifactoriales de un 20-30% y los factores ambientales de un 2-4% de los casos. (2) (21) (54)

La causa de las CC no sindrómicas es multifactorial, debida a una compleja interrelación entre la predisposición genética, la susceptibilidad epigenética, el ambiente parental y estilos de vida. (27) (42) (43) (55)

Los fallos en la neurulación primaria o secundaria provocan la aparición de un DTN, aunque análisis detallados han revelado también alteraciones en el proceso de gastrulación. La mayoría de los DTN son aislados donde están involucrados factores genéticos y ambientales. El factor ambiental más señalado es la deficiencia de AF. (9) (26) (30) (31)

La causa de las HLP es heterogénea e incluye casos de origen monogénico o cromosómico, así como por exposición a agentes teratogénicos. Prácticamente todos los tipos de herencia mendeliana se han propuesto para estos DC, aunque cumplen con las características de un clásico rasgo multifactorial con umbral, como una mayor concordancia entre gemelos monocigóticos (25-40%) que dicigóticos (3-6%) y una heredabilidad del 76%. (32) (47) (56)

Los mecanismos etiopatogénicos de la GS no están del todo bien elucidados, históricamente se ha planteado un mecanismo de disrupción vascular por agenesia de la arteria onfalomésentérica derecha, que ocasiona infarto y necrosis de la base del cordón, permitiendo la extrusión visceral. Otras hipótesis embriológicas se centran en el proceso de cierre de la pared ventral, en el desarrollo del anillo umbilical y en el fallo del saco, del conducto de Yolk y de los vasos vitelinos, para incorporarse inicialmente al alantoides y posteriormente al tallo corporal.

Teorías recientes proponen un modelo binario vascular-trombótico, donde la involución normal de las venas umbilicales crea un sitio potencial para la trombosis adyacente al anillo umbilical, lo que, unido a otros factores como los niveles crecientes de estrógenos maternos y la debilidad del anillo umbilical, crean un sitio potencial para la posterior herniación. (34) (35) (48)

Estudios moleculares realizados en trisomías parciales del cromosoma 21 han delimitado una región de alrededor de 1,6 Mb denominada «región crítica para SD». En esta región, la mayor tasa de recombinación se registra en las bandas 21q22.2- 21q22.3, donde varios genes presentan un elevado grado de metilación en islotes CpG, lo que sugiere que esta región desempeña un papel importante en las complejas interacciones genómicas y epigenéticas que intervienen en la patogénesis del SD, lo que actualmente es objeto de controversia científica. (36) (38) (49)

#### 1.4- Micronutrientes y defectos congénitos

Existen bioelementos que, aunque presentes en cantidades muy pequeñas en el organismo (menos de 5  $\mu\text{mol/kg}$ ) son nutrientes esenciales que realizan funciones indispensables para el mantenimiento de la vida, el crecimiento y la reproducción. Está claramente demostrado que el AF desempeña un rol crucial en la regulación epigenética del programa de desarrollo embrionario y su deficiencia implica además de consecuencias hematológicas, diferentes DC. Varios estudios han evidenciado que el consumo periconcepcional de AF constituye un factor protector durante el desarrollo del área troncoconal. (24) (42) (57)

La relación entre la suplementación preconcepcional de AF y la prevención de los DTN tiene suficiente soporte epidemiológico para ser una recomendación de aplicación clínica. (25) (58)

Sin embargo, la hipocincinemia y la hipercupremia durante el embarazo también se han relacionado con la aparición de DTN. (59) (60)

Dado que el mesénquima facial, que da origen a los labios y el paladar, deriva de las células de la cresta neural; se ha postulado que la suplementación con AF puede reducir la recurrencia de las HLP. (23) (26) (32) En un metanálisis que evaluó el efecto del AF en modelos animales, cultivos celulares y HLP en humanos, Bendahan (23) concluyó que el consumo preconcepcional de AF en adición a la suplementación de alimentos con este micronutriente, previene la aparición de HLP. El Zinc es un micronutriente esencial para el desarrollo fetal que está relacionado con funciones celulares vitales y su deficiencia se relaciona con la presencia de DTN, HLP y otros DC. (19)

La demostrada teratogenicidad de la deficiencia materna de zinc en ratas, ha llevado a un creciente interés en el papel de éste y otros oligoelementos en el desarrollo embrionario. (16) (24)

Diversos micronutrientes esenciales son necesarios por el mantenimiento de la salud, la normal progresión del embarazo y del desarrollo embrionario. Tanto las cantidades deficientes, como excesivas de oligoelementos, como el cinc, cobre, calcio, hierro y magnesio se han relacionado con complicaciones maternas y sobre todo, embriofetales, como los DC. (61)

Para la prevención farmacológica de DC la OMS preconizó en 2016 el consumo de un conjunto de 15 micronutrientes, denominado UNIMMAP (Preparación internacional de múltiples micronutrientes de las Naciones Unidas) y, aunque inicialmente se relacionó con la reducción en la incidencia de determinados tipos de DC como: los DTN, las CC, y las HLP; en una posterior revisión realizada en 2019 se plantea que existe muy poca o ninguna evidencia de disminución de DC con su uso en comparación con la suplementación solo con hierro y AF. (62) (63)

Se plantea que la deficiencia de determinados micronutrientes explica la mayor prevalencia de GS entre madres jóvenes, al existir una competencia por los nutrientes esenciales entre la madre, que no ha completado todo su crecimiento y desarrollo, y su feto. (34) (35) Otros autores señalan, además, otros factores de tipo nutricional como la anemia, bajo peso materno, el estatus socioeconómico bajo, consumo materno de alcohol u hormonas anticonceptivas, estos dos últimos agentes con un conocido efecto antagonista en el metabolismo del AF. (64)

Estudios experimentales y clínicos han demostrado que la no disyunción está asociada a inestabilidad cromosómica, relacionada con una hipometilación del ADN resultante de la deficiencia de AF. Existen polimorfismos del gen *MTHFR* que pueden predisponer a una metilación anormal del ADN y a un incremento de la probabilidad de una no disyunción meiótica, elevándose el riesgo 2,6 veces de tener descendencia afectada por SD. (36) (49) (65)

## 1.5- Mecanismos moleculares y celulares en los defectos congénitos

Muchos son los genes que están involucrados en el desarrollo durante la etapa de morfogénesis. Los procesos celulares obedecen a complejas interacciones y regulaciones génicas que ocurren en un tiempo y espacio limitado. La implicación de los mecanismos moleculares y celulares en los DC folato-sensibles aparece en una publicación del autor de la presente investigación. (9)

## 1.6- Estructura del gen *MTHFR* y de la proteína

El gen *MTHFR* tiene locus génico en 1p36.3, posee una longitud de 22 kb, resultando en un transcripto de entre 7.5 y 9.5 kb que codifica para la proteína *MTHFR* (OMIM #607093) conformada por 656 aminoácidos (aa). Estudios recientes describen que este gen consta de 12 exones (OMIM #005957), el primero de los cuales es no codificante.

La proteína *MTHFR* humana es un homodímero con una masa molecular total de 150 kD, cada subunidad consistente en un dominio catalítico N-terminal (aa 1-356) y un dominio regulatorio C-terminal (aa 363-656) unidos por una región conectora (aa 357-362). El dominio catalítico resulta suficiente para llevar a cabo todas las reacciones enzimáticas que cataliza la reducción fisiológica unidireccional e irreversible de 5,10MTHF (metil tetrahidrofolato) a 5MTHF, que es la forma de AF predominantemente circulante y es el co-sustrato donador de grupos carbono, utilizados para la remetilación de Hcis a Metionina, con lo cual es precursor de una cadena de reacciones de metilación de sustancias de interés biológico, como la síntesis de ADN, proteínas, neurotransmisores y fosfolípidos. (66) (67)

## 1.7- Polimorfismos del gen *MTHFR*

Existe evidencia científica que demuestra que la presencia de polimorfismos en genes que codifican enzimas del metabolismo del folato, pueden afectar los indicadores bioquímicos del estado del AF en humanos. El polimorfismo de un único nucleótido (SNP) más estudiado es el C677T (OMIM: 607093.0003) localizado en el exón 4 del gen, que consiste en la sustitución de Citosina por Timina en el codón 222, que origina la sustitución de Alanina por Valina en el nucleótido 677.

La combinación alélica homocigótica C/C representa el genotipo silvestre del polimorfismo C677T, la combinación heterocigótica C/T y la homocigótica T/T, representan genotipos que originan enzimas con disminución de su actividad reductasa en 30 y 60% respectivamente. Se describe que el genotipo homocigótico 677TT aumenta 2,24 veces la probabilidad de presentar bajas concentraciones de AF (95% IC=1,85 – 2,70 p<0,001). (36) (68) (69) (70)

Existen otros polimorfismos en este gen, en los cuales se ha evaluado su asociación a DC folato-sensibles, con reportes más o menos consistentes en la literatura, como el polimorfismo A1298C (rs1801131). (36) (69) (71) (72) El SNP C677T se relaciona con la disminución de la actividad enzimática de *MTHFR* y presenta una penetrancia variable relacionada con el consumo dietario o suplementario de AF. (73)

La suplementación periconcepcional con AF tiene un efecto protector durante el desarrollo del segundo campo cardíaco que resulta en una disminución de las CCCT. Se han estudiado múltiples polimorfismos maternos y fetales en genes involucrados en las vías del AF y de la Hcis, los resultados sugieren que los polimorfismos en genes relacionados con el metabolismo del AF, se asocian con el riesgo de ocurrencia de las CCCT. (70) (74)

Investigadores paquistaníes constataron que las bajas concentraciones maternas de folatos y el polimorfismo C677T se asociaron con un riesgo incrementado para DTN en la descendencia. (73) Otras investigaciones al considerar, además, el consumo periconcepcional de AF; constataron que las madres con genotipo 677TT y con un bajo consumo de AF tuvieron un riesgo elevado de tener descendencia afectada por labio leporino (LL) con o sin paladar hendido (PH). (75) (76)

Al considerar la dualidad de un posible mecanismo patogénico vascular/trombótico en la génesis de la GS, Makhmudi (71) estudió tres polimorfismos protrombóticos en 46 pacientes con GS y en 89 controles pareados por etnias. De los SNP estudiados solamente el C677T mostró una asociación significativa con la GS, por lo que el grupo de investigadores concluyó que el SNP C677T es un factor de susceptibilidad para la GS y que el incremento del riesgo para los descendientes de las madres más jóvenes sustenta el modelo patogénico trombótico en este DC. El hecho de que varios genes relacionados con el metabolismo del AF tengan su loci en el cromosoma 21, incluyendo los genes *RFCL*, *CBS* y otros, ha llevado a plantear la hipótesis de que los embriones con trisomía 21 libre pudieran tener diferente demanda de AF que los embriones diploides normales y que, la ingesta materna de AF durante la gestación, el genotipo materno, así como los niveles de expresión de los genes de la vía del AF con loci en este cromosoma, podrían interactuar para determinar la muerte intraútero o la sobrevivencia de los casos con SD. (77)

El gen *MTHFR* resulta clave en el metabolismo del AF, el SNP C677T conlleva a la hipometilación del ADN, lo que favorece la no disyunción cromosómica. Éste fue el primer SNP en que se identificó asociación con el riesgo materno de tener descendencia con SD. (36) (78)



## 1.8- Control epigenético de la expresión fenotípica

El genoma codifica para una información potencial, pero la manera en que la secuencia de ADN se traduce en un fenotipo determinado no depende directamente de la secuencia en sí, sino de la interacción con factores ambientales. El AF desempeña un rol crucial en el metabolismo monocarbonado para la síntesis de nucleótidos y aminoácidos, así como para la metilación del ADN, que resulta esencial para la dinámica de los cambios conformacionales de la cromatina y la consecuente expresión génica. (24) (79)

En una comparación realizada entre el patrón global de metilación del ADN de 18 fetos afectados por CC y del ADN leucocitario de 656 personas como grupo control, se constató hipermetilación de varios sitios intragénicos de los genes *MSX1* y *GATA4*, relacionados con la morfogénesis del tracto de salida. Estas epimutaciones probablemente contribuyen a la patogénesis de estos DC por efecto de una actuación cis sobre la expresión génica. (80)

El aporte suficiente de AF permite que la neurulación del cerebro y de la médula espinal se lleve a cabo en forma correcta. La capacidad epigenética del AF lograda mediante la adición de radicales metilos en los islotes CpG, regula dicho proceso y con ello disminuye la incidencia de DTN. (25) (60) Investigaciones recientes concluyen que la suplementación materna con AF y multivitaminas disminuyen la incidencia de DTN y de otros DC folato-sensibles. (81)

Algunos investigadores plantean que el riesgo de tener un hijo con HLP aumenta cuando se utilizan inhibidores de la enzima MTHFR, debido a que se produce una hiperhomocisteinemia. El efecto del uso del AF en el riesgo de desarrollar LL con/sin PH en la descendencia se ha documentado con valores hasta de un 13% mayor de AF en las madres que no tienen hijos con HLP en comparación a las madres que sí poseen hijos con estos DC. (47) (75)

Existe una evidencia creciente del papel protector del AF en la prevención de la GS. (82) Geng (83) al estudiar los mecanismos moleculares post-implantatorios, confirmó que la metilación del ADN participa en el proceso de decidualización y constató que la deficiencia materna de AF origina cambios en los patrones de metilación de genes relacionados con la angiogénesis y la integridad de los vasos sanguíneos, procesos relacionados con la etiopatogenia de la GS.

Estudios experimentales y clínicos han demostrado que el fenómeno de no disyunción está asociado a una inestabilidad cromosómica, relacionada con una hipometilación del ADN. La separación prematura de las cromátidas hermanas, es el mecanismo más frecuente en el origen de las aneuploidías.



Otro de los mecanismos causales está relacionado con la alteración en los mecanismos de recombinación y la asociación de inestabilidad cromosómica por hipometilación del ADN, lo que hace considerar que alteraciones del metabolismo del AF podrían estar relacionadas con la aparición del SD, dado que el AF participa tanto en la síntesis como en la metilación del ADN, a través de la vía metabólica de la Hcis. (24) (49) (79)

### 1.9- Factores de riesgo ambientales en el origen de los defectos congénitos

Múltiples factores ambientales están implicados en el origen de los DC, a través de una interacción genoma-ambiente, que influyen sobre el epigenoma materno y fetal e incrementan el riesgo de la expresión fenotípica de diferentes DC en genotipos con predisposición genética. (24)

Los principales factores de riesgo ambientales descritos en la literatura para cada tipo de DC folato-sensible aparecen en una publicación realizada por el autor de esta investigación. (21)

Destacan entre ellos, las edades maternas extremas, la presencia de fiebre en el embarazo, el periodo intergenésico corto, el sobrepeso y la obesidad materna, el consumo de medicamentos, los hábitos tóxicos y otros, referenciados en numerosas publicaciones. (24) (79)

### 1.10- Detección de la deficiencia materna de ácido fólico

A mediados del siglo XX los métodos para la determinación de los niveles de AF incluían el uso de microorganismos como el *Streptococcus fecalis* y *Lactobacillus casei*, con posterioridad se desarrollaron métodos bioquímicos para la determinación de los niveles séricos y eritrocitarios de AF, muchos investigadores refieren que este último es más fiable, pues las concentraciones séricas se relacionan con los niveles de ingesta en determinado tiempo, mientras que la concentración eritrocitaria se relaciona mejor con los niveles tisulares.

En la actualidad existen cientos de exámenes moleculares para el diagnóstico de su deficiencia, entre los que se incluyen análisis de deleciones y duplicaciones, secuenciación de las regiones codificantes o de los exones seleccionados del gen que codifica la MTHFR y de otros genes que participan en el metabolismo del AF.

Sin embargo, aún en la era de los análisis moleculares, el diagnóstico de la deficiencia de AF puede realizarse en base a las anomalías detectadas en un frotis de sangre periférica y/o médula ósea, mediante el análisis de la hipersegmentación nuclear de los neutrófilos.

El frotis de sangre periférica tiene gran importancia por dos razones: primero es mucho más rápido y sencillo de realizar por lo que permite un diagnóstico instantáneo y segundo, un frotis puede sugerir déficit de AF aún con una dosificación sérica normal, puesto que la deficiencia de AF a veces se presenta en pacientes aún antes que se establezca en las células rojas. (84) (85)

### 1.11- Homocisteína e hiperhomocisteinemia

La Homocisteína (Hcis) es un aa azufrado importante en la transferencia de grupos metilo en el metabolismo celular. Una parte de este compuesto se une a la Serina y forma Cistationina, sin embargo, la mayor parte se remetila para formar Metionina, proceso clave para el ciclo de metilación monocarbonado. Las concentraciones de Hcis pueden incrementarse por factores genéticos o nutricionales. Las deficiencias de AF, piridoxina o cobalamina interfieren con el proceso de remetilación y originan hiperhomocisteinemia. (86)

Una causa fundamental de hiperhomocisteinemia es el polimorfismo C677T del gen MTHFR, entre el 10 y el 20% de los casos son homocigotos 677TT para este polimorfismo, (87) otros autores alegan, sin embargo, que este SNP provoca elevados niveles de Hcis solamente cuando coexisten bajos niveles de folatos. (13)

### 1.12 Prevención de los defectos congénitos

Los diferentes niveles preventivos de los DC incluyen la prevención primaria, secundaria y terciaria. La prevención primaria puede ser preconcepcional o postconcepcional. La búsqueda de nuevos conocimientos en la presente investigación está dirigida, en lo fundamental, a encontrar evidencias teóricas que puedan apoyar la prevención primaria preconcepcional. (35) (53)

En la actualidad las posibilidades de la prevención primaria preconcepcional están limitadas de forma general a la suplementación preconcepcional con AF, la estimulación de la maternidad en edades óptimas, así como evitar las exposiciones a teratógenos conocidos. (35) (53)

La prevención primaria postconcepcional, disponible actualmente, incluye para las CC la resonancia magnética cardiovascular y la ecocardiografía fetal. (88) (89) (90) El tratamiento farmacológico de estos defectos ha avanzado mucho, las técnicas quirúrgicas cada vez son menos invasivas y más resolutivas, lo que favorece su prevención terciaria. (91)

Entre las medidas para la prevención primaria postconcepcional de los DTN se encuentran la determinación de Alfafo proteína (AFP) materna y los estudios sonográficos fetales. (26) (92) Para su prevención terciaria se realiza la corrección quirúrgica del DC. Aproximadamente un 60% de los pacientes necesitarán una derivación ventrículo-peritoneal a lo largo de su vida. (93)

Para la prevención primaria postconcepcional de las HLP se utilizan la ultrasonografía fetal, en dependencia de su severidad clínica y la prevención terciaria incluye el manejo psicológico y el tratamiento multidisciplinario con cirujanos, odontólogos y foniatras. (26) (47)

La prevención primaria postconcepcional de la GS incluye la determinación de AFP sérica materna y los estudios sonográficos fetales, a partir de las 12 semanas de gestación. (48) (94)

El desarrollo de los cuidados intensivos neonatales ha contribuido a su prevención terciaria. Todos los RN con GS requieren algún tipo de intervención quirúrgica, sin embargo, la técnica de cierre que resulta más óptima aún constituye un tema controversial. (95)

La prevención primaria postconcepcional del SD se basa en el diagnóstico prenatal citogenético convencional, o molecular mediante FISH interfásico y los estudios de células fetales circulantes en sangre materna, (49) (51) mientras que, la prevención terciaria incluye medidas de carácter rehabilitador y de autocuidado, que les permita una inserción a la sociedad y una mejor calidad de vida. (96)

### 1.13 Conclusiones parciales

- 1- Los defectos congénitos constituyen una importante causa de morbilidad y mortalidad y, en la actualidad son motivo de frecuente interés en la bibliografía médica mundial, con especial atención en sus causas; pues a pesar de su importancia médica y social se desconoce la causa de entre el 50 y 70% de los casos.
- 2- Existen en la literatura numerosas investigaciones con variable consistencia sobre diferentes factores de riesgos ambientales, nutricionales y epigenéticos, de utilidad para la implementación de estrategias preventivas; los estudios epidemiológicos mantienen su interés, tanto en lo concerniente al establecimiento de conglomerados de mayor riesgo poblacional, como a la determinación de deficiencias maternas de ácido fólico y otros oligoelementos.
- 3- A pesar del vertiginoso avance en la identificación de genes que participan en los procesos de embriogénesis y en las diferentes vías de comunicación y señalización intercelular, la causa de los defectos congénitos en muchos casos, sigue siendo una interrogante, y numerosos aspectos relacionados con la asociación de determinados polimorfismos son controversiales; por lo que constituyen un reto permanente a la investigación.
- 4- En esta área del conocimiento persisten importantes problemas científicos sin resolver o con contradicciones, que pueden ser utilizados como problemas de investigación, como los relacionados con el conocimiento de las bases que subyacen en la interacción de factores de tipo genético, nutricional y epigenéticos, implicados en el origen multifactorial de estos defectos, a la vez que sustenta la necesidad de aportar elementos teóricos de utilidad potencial para la prevención primaria preconcepcional de los DC folato-sensibles.

## **CAPÍTULO 2. IDENTIFICACIÓN DE CONGLOMERADOS Y DE FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LOS DC FOLATO-SENSIBLES**

### **2.1 Introducción**

Los DC constituyen un importante problema de salud por su elevada morbimortalidad. Según se avance en el conocimiento e identificación de factores de riesgo ambientales y se implementen acciones preventivas eficaces, muchos DC disminuirán su frecuencia. (21)

### **2.2 Objetivos**

Este capítulo da salida a los objetivos 1 y 2 de la investigación, dirigidos a identificar conglomerados temporales, espaciales o espacio-temporales de DC folato-sensibles e identificar los diferentes factores de riesgos genéticos y ambientales relacionados a estos DC. Para ello se llevaron a cabo diferentes tareas de investigación, cuyos resultados se presentan a continuación.

### **2.3 Material y Métodos**

#### **2.3.1 Definición de universo, población y muestra**

**Universo:** 46 473 nacimientos entre los años 2013 y 2018. De ellos 45 692 nacidos vivos (NV), 425 nacidos muertos (NM) y 356 interrupciones electivas del embarazo (IEE) registrados en el Centro Provincial de Genética, en los Departamentos de estadísticas del Hospital Gineco Obstétrico Universitario “Mariana Grajales” y de la Dirección Provincial de Salud de Villa Clara.

**Población:** 267 productos de gestaciones ocurridas entre los años 2013 y 2018 (143 en el periodo 2013 a 2015 y 124 entre 2016 y 2018). Del total de casos de estudio 108 NV, 154 IEE y cinco mortinatos con alguno de los siguientes tipos de DC folato-sensibles: 80 cardiopatías congénitas conotruncales (CCCT), 59 defectos del tubo neural (DTN), 36 hendiduras labio-palatinas (HLP), 31 gastrosquisis (GS) y 61 Síndrome Down (SD) por trisomía libre, como aberración cromosómica sensible a esta deficiencia.

#### **2.3.2 Selección de la muestra:**

Para el análisis de conglomerados espaciales, temporales y espacio-temporales de DC folato-sensibles se consideraron el universo y la población.

Para la identificación de los factores de riesgo se empleó una muestra de 106 casos incidentes, e igual cantidad de casos prevalentes y controles, como se muestra en el diagrama de la

investigación. (Anexo 1). Para los análisis de factores de riesgo epidemiológicos, los casos incidentes y prevalentes se procesaron de conjunto.

- Casos incidentes: Del total de 124 casos diagnosticados en el Centro Provincial de Genética por estudios de pesquisaje prenatal o por examen físico, con algún tipo de DC folato-sensible entre 2016- 2018, 11 madres no consintieron participar en el estudio y siete casos se excluyeron (cinco por constatarse patrón de DC múltiples en el estudio anatomopatológico, uno por identificarse una translocación cromosómica como causa del SD y otro por salida del país). Por lo que el total de casos incidentes incluidos fue de 106/124 (85,48%), de ellos 36 NV, tres NM y 67 casos con IEE. Por tipos de DC: 29 CCCT, 23 DTN, 17 HLP, 15 GS y 22 SD.

- Casos prevalentes: A partir de los 143 casos diagnosticados entre 2013 y 2015 con algún tipo de DC folato-sensible, y después de aplicados los criterios de inclusión y exclusión ocho madres no consintieron en participar, y 12 no fueron localizadas por cambio de residencia, quedaron 123 casos prevalentes potencialmente incluibles en el estudio, de los que se escogieron 106, uno por cada caso incidente.

Los casos prevalentes a seleccionar fueron una muestra que no podía ser conocida hasta el final del estudio, por tanto, se fueron tomando por muestreo no probabilístico secuencial; progresivamente en la medida que se diagnosticaba un caso incidente con un DC aislado de uno de los cinco DC incluidos. Como método para el diseño se estableció previamente la conducta a tomar, según se verificara una de las tres situaciones que pueden ocurrir en un diseño de este tipo: primero, que los casos incidentes fueran iguales a los del periodo prevalente, (en cuyo caso se incluirían todos los casos prevalentes potencialmente incluibles; lo que ocurrió en concreto para los DTN, HLP y GS), segundo: que los casos incidentes superaran en número a los del periodo prevalente para un DC determinado, en cuyo caso se tomarían los necesarios hasta completar la misma cantidad utilizando los precedentes del año 2012, considerando comenzar por la fecha de nacimiento del último mes del año hacia atrás, en esta situación no se encontró ninguno de los DC y por último, aquellas situaciones de DC aislados en que los casos incidentes fueran menos que los casos prevalentes, y por tanto, se debían seleccionar casos prevalentes con igual DC de entre el total de casos prevalentes potencialmente incluibles, lo que ocurrió en las CCCT donde se debieron escoger 29 casos prevalentes de entre los 36 potencialmente incluibles y en el SD, que fueron 22 de 32, los que se escogieron por coincidencia del mes de nacido y/o por coincidencia del área de salud.

- Selección de los controles:

Una vez que se iban identificando los casos, los controles se fueron tomando por muestreo no probabilístico secuencial a partir de los potenciales controles y se seleccionaba uno por cada caso incidente, residente en la misma área de salud; con la menor diferencia posible en la fecha de nacimiento hasta una diferencia máxima de tres meses posteriores respecto a la fecha de diagnóstico del caso incidente. Este periodo de tiempo garantizó la realización del examen dismorfológico después del mes de nacido, para excluir la presencia de algún DC no diagnosticado previamente.

### **2.3.3 Métodos de recolección del dato primario**

Las estadísticas vitales relativas al número de NV se obtuvieron del departamento de estadísticas del Sectorial Provincial de Salud Pública de Villa Clara. Los datos de muertes fetales y neonatales se recopilaron del departamento de estadísticas del hospital Gineco Obstétrico Universitario “Mariana Grajales” de Santa Clara y del Sectorial Provincial de Salud Pública de Villa Clara y los referentes a las IEE fueron recolectados de los registros existentes en el Centro Provincial de Genética Médica de Villa Clara (RECUMAC y el RECUPREMAC) y del departamento de estadísticas del Hospital Gineco Obstétrico Universitario “Mariana Grajales”.

Para la obtención del dato primario de los DC prevalentes, diagnosticados entre los años 2013 al 2015 se empleó la documentación científica, mediante la revisión de los registros existentes en el Centro Provincial de Genética Médica de Villa Clara (RECUMAC y el RECUPREMAC), revisión de los resultados del examen ultrasonográfico, del estudio prenatal citogenético, así como los informes necrópsicos del departamento de Anatomía Patológica del hospital Gineco Obstétrico Universitario “Mariana Grajales”. Los hallazgos del examen anatomopatológico constituyeron la regla de oro.

Para la obtención del dato primario de los DC incidentes diagnosticados entre los años 2016 al 2018 se empleó la observación científica participante, consistente en la realización de un examen físico y dismorfológico por el autor del trabajo, a los RN vivos con DC registrados en los servicios de neonatología de los cuatro hospitales donde ocurren nacimientos en Villa Clara.

Además, se empleó la documentación científica, mediante la revisión de los resultados del examen ultrasonográfico, del estudio prenatal citogenético, del examen anatomopatológico macroscópico de los NM y de las IEE y los datos del RECUPREMAC y del RECUMAC. Los hallazgos del examen anatomopatológico constituyeron también la regla de oro.

### 2.3.4 Identificación de conglomerados temporales, espaciales y espacio-temporales de DC folato-sensibles

Para dar salida al objetivo 1 de la investigación e identificar conglomerados temporales, espaciales o espacio-temporales de DC folato-sensibles se consideró la población de estudio (267 casos con alguno de los DC incluidos) respecto al universo, los que cubren todos los nacimientos e IEE de todo el periodo de estudio. Para ello se empleó el programa SatScan, que implementa el método de Kulldorf. (97) La unidad espacial de análisis fueron los municipios y la temporal fue dividida por años. (32)

Para el análisis de la temporalidad e identificación de potenciales conglomerados temporales de DC folato-sensibles se determinaron las tasas de prevalencia ajustada (PA) por años, para el conjunto de defectos, para cada uno de los cinco tipos de DC y para sus diferentes fenotipos clínicos.

El cálculo de la tasa de PA permitió determinar la proporción en la cual aparecieron los casos NV, NM o por IEE con los diferentes tipos de DC folato-sensibles, respecto al universo de nacidos (vivos y muertos); como muestra la siguiente fórmula:

$$PA = \frac{NV \text{ con DC} + NM \text{ con DC} + IEE}{\text{Total de NV} + NM} \times 1000 \text{ nacimientos}$$

Para la identificación de conglomerados espaciales se tuvo en cuenta el número de casos con DC (en el total de DC folato-sensibles y para cada tipo de DC) y el número esperado para cada municipio y se determinó el riesgo relativo y la significación asociada. (53) (97)

Este método emplea una ventana cilíndrica formada por una base geográfica circular y una altura que refleja el periodo de tiempo de los potenciales conglomerados, se calcula el riesgo relativo (RR) dentro y fuera del cilindro y se selecciona aquel de máxima verosimilitud (LLR = log likelihood ratio). (98)

En el análisis de conglomerados espacio-temporales se consideraron el número de casos observados con DC folato-sensibles en cada uno de los años de estudio, respecto a lo esperado. La definición de conglomerado se muestra en el Anexo 1 (definición y operacionalización de variables) y los detalles para su identificación, incluyendo las fórmulas para la determinación de los casos esperados y del riesgo relativo aparecen en un artículo publicado por el autor de la presente investigación. (32)

Para dar cumplimiento al objetivo 2 referente al análisis de los factores de riesgo, a todas las madres de los casos y controles se les aplicó un cuestionario heteroadministrado por el investigador, en el local de consulta del Centro Provincial de Genética Médica. A las madres de los casos incidentes se les aplicó en el momento del diagnóstico y en las madres de los casos prevalentes y de los controles, a medida que se fueron incorporando al estudio.

En el cuestionario, previamente validado por el autor, mediante criterios de expertos por el método Delphi, (21) se reflejaron datos demográficos y de identificación personal, variables clínicas, epidemiológicas, nutricionales y un grupo de factores e indicadores de riesgo. Para la obtención de los datos dietarios referentes al consumo de folatos se incluyó en el cuestionario una tabla de frecuencia semicuantitativa de consumo de alimentos a nivel individual, que indaga sobre la frecuencia con que se consumieron determinados alimentos que son fuentes naturales de folatos, de acuerdo a lo referido en la literatura, respecto a los requerimientos nutricionales de este micronutriente en el embarazo, mediante el uso del sistema automatizado para la evaluación de encuestas de consumo de alimentos (CERES +) del Instituto de Higiene, Epidemiología y Microbiología de la Habana y de la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (99)

### **2.3.5 Variables clínicas, epidemiológicas, nutricionales y de riesgo incluidas en el estudio**

Entre las variables clínicas se especificaron los diferentes fenotipos clínicos de los DC folato-sensibles, las que se definen y operacionalizan en el Anexo 1. Mientras que entre las variables epidemiológicas se incluyeron: edad materna y paterna, municipio de residencia, urbanidad, escolaridad y ocupación.

En este propio Anexo 1 se detallan las variables de riesgo empleadas, las que fueron autoreferidas por las gestantes o tomadas de la historia clínica obstétrica y fueron clasificadas en:

- Factor de riesgo modificable: Se refiere a las características o circunstancias detectadas en individuos o grupos, asociada con una probabilidad incrementada en experimentar un daño a la salud, que pueden ser controladas o modificadas. Fueron consideradas las enfermedades maternas agudas y crónicas, el consumo de bebidas alcohólicas, la exposición al humo de cigarrillo, exposición a radiaciones ionizantes, así como a productos químicos, la hipertermia y el consumo de medicamentos no habituales, todos durante el primer trimestre del embarazo. (21)

(100)

- Factor de riesgo biológico no modificable: Referido a las características o circunstancias detectadas en individuos o grupos, asociada con una probabilidad incrementada en experimentar



un daño a la salud, que no pueden ser controladas o modificadas. Fueron consideradas las edades maternas extremas, el sexo del feto o recién nacido y la avanzada edad paterna. (21)

- Factor de riesgo nutricional: Características o trastornos relacionados con la nutrición, tanto por macro como micronutrientes, ya sea por déficit o por exceso. Valores finales: Bajo peso materno, sobre peso u obesidad materna, anemia en el embarazo, deficiencia de uno o más micronutrientes, niveles elevados de uno o más micronutrientes, consumo deficiente de folatos, no consumo preconcepcional de ácido fólico, periodo intergenésico corto y consumo de antagonistas del ácido fólico. En este último grupo se consideró como una variable independiente el consumo de tabletas anticonceptivas, pues además del efecto antifolínico, se describe en la literatura científica que actúa durante la morfogénesis como un disruptor endocrino. (26) (101)

- Factor de riesgo genético: Referido a los antecedentes familiares de DC o enfermedad monogénica, cromosómica o multifactorial, historia de abortos espontáneos o muertes fetales y de consanguinidad parental. (53)

- Marcadores de riesgo materno fetal: Alteraciones en los niveles de líquido amniótico, restricción del crecimiento intrauterino, gemelaridad y niveles elevados de Alfafofo proteína. (101)

### **2.3.6 Técnicas estadísticas empleadas para contrastar los resultados de los factores de riesgo**

Los datos obtenidos de la aplicación del cuestionario fueron introducidos en una base de datos creada al efecto mediante el programa SPSS versión 22.0 de Windows.

Para analizar los factores de riesgo epidemiológicos se realizaron estudios de asociación bivariados entre variables cualitativas nominales. Fueron consideradas un total de 54 variables de riesgo. Se realizaron análisis para el conjunto de DC y para los cinco tipos de DC. Finalmente, en el informe escrito se presentan los resultados de 33 de ellas que resultaron significativamente asociadas al menos a uno de los tipos de DC sensibles a la deficiencia materna de AF.

Se empleó la dódima de hipótesis de independencia u homogeneidad, a través de la estimación del estadígrafo Ji cuadrado ( $X^2$ ) de Pearson y test de probabilidades exactas de Fisher. Una vez demostrada la significación estadística se calcularon las medidas de asociación, como la razón de productos cruzados u Odds Ratio (OR) y la V de Cramer, con el objetivo de demostrar magnitud de asociación.

En la edad materna como factor de riesgo, se realizó un análisis particular, teniendo en cuenta su condición de variable cuantitativa continua. Se determinó la edad media, la desviación estándar (DS) y el rango, en los cinco grupos de DC folato-sensibles, en el conjunto de ellos, así como en

las madres de controles. Se realizó prueba T de Student de comparación de medias entre casos y controles.

Se realizó un análisis multivariado, en el total de 318 gestantes, para ello se empleó la regresión logística binaria por el método hacia adelante (condicional), donde se incluyeron 17 variables clínico-epidemiológicas, de ellas 15 que resultaron significativas en el análisis bivariado del conjunto de los DC y dos con suficiente consistencia en la literatura científica (fiebre en el embarazo y polihidramnios). Se descartaron 16 variables por presentar colinealidad (medicamentos hipoglucemiantes, anticonvulsivos, antihipertensivos, antianémicos, broncodilatadores y esteroides, hormonas tiroideas y las drogas antitiroideas; las que presentaron colinealidad con enfermedades crónicas, así como con cada enfermedad crónica en particular, los analgésicos y antiinflamatorios, los antibióticos, la presencia de fiebre, los antimicrobianos y antiparasitarios, que presentaron colinealidad con las sepsis urinaria y vaginal, infección respiratoria y las enfermedades agudas, la avanzada edad paterna y la multiparidad con la AEM y la nuliparidad con la madre adolescente).

## 2.4 Resultados.

### 2.4.1 Conglomerados temporales, espaciales y espacio-temporales de los DC folato-sensibles

La información primaria para el análisis de conglomerados se muestra en los Anexos del 1 al 6.

#### 2.4.1.1 Determinación de la prevalencia ajustada por años, fenotipos clínicos y tipos de DC folato-sensibles para el análisis de su variación temporal.

En la Tabla 1 se observa un total de 267 DC folato-sensibles, para una PA de 5,79 por 1000 nacimientos (95% IC: 5,16 - 6,89). Las mayores tasas de PA se constataron en las CCCT, seguido del SD y los DTN.

En el Anexo 2 se muestra la información primaria para el análisis de conglomerados temporales para el conjunto de DC, por tipo específico de DC y condición al nacer según años. Las mayores tasas de PA para el conjunto de DC se identificó en los años 2013 y 2016, por encima de 6 por 1000 nacimientos.

En el propio Anexo 2 se puede apreciar que solamente se observaron incrementos en la PA entre los años 2013 y 2018 en dos tipos de DC folato-sensibles: las CCCT (de 1,50 en 2013 a 1,72 en el 2018) y los DTN (de 1,75 a 1,99 en dichos años).

En el Anexo 3 aparece la distribución temporal de la frecuencia y la PA según el fenotipo clínico de los DC folato-sensibles. En los años 2014 y 2016 se constataron las mayores tasas de PA para

las CCCT, donde predominaron los defectos septales conotruncales con el 43,75% y 31,25% del total.

Los DTN tuvieron su mayor tasa de PA en 2018, con predominio de los casos con EB, los que representaron el 60% del total de DTN en este año (9/15).

En las HLP la PA más elevada se constató en 2016 con 1,08 por 1000 nacimientos y predominio del fenotipo de labio leporino (LL) con paladar hendido (0,54 por 1000 nacimientos).

En las GS la PA más elevada se constató en el año 2013, seguida del 2016, mientras que el SD tuvo también la mayor PA en 2013, seguida de 2015.

En el Anexo 4 se muestran las curvas de tendencia temporal de las tasas de prevalencias de todos los DC folato-sensibles, donde se observa una tendencia decreciente en las curvas de PA para todos los DC, excepto en las CCCT y en los DTN en las que se describe una tendencia temporal discretamente ascendente.

#### 2.4.1.2 Identificación de conglomerados espaciales para DC folato-sensibles

En el Anexo 5 se incluye la información recopilada para el análisis de conglomerados espaciales, en el que se aprecia que para el conjunto de DC folato-sensibles, el municipio que presentó la mayor tasa de PA fue Corralillo (9,19 por 1000 nacimientos), seguido de Quemado de Güines (9,10 por 1000 nacimientos) y Placetas (8,04 por 1000 nacimientos).

En el propio Anexo 5, por tipo de DC, la mayor tasa dese PA para las CCCT se constató en el municipio de Quemado de Güines (3,64 por 1000 nacimientos). La mayor tasa para los DTN se observó en Placetas (2,59 por 1000 nacimientos). Mientras que las mayores tasas de PA para HLP se constataron en los municipios colindantes de Quemado de Güines y Corralillo, por encima de 2 por 1000 nacimientos. La mayor PA para la GS se presentó en el municipio de Manicaragua (1,72 por 1000 nacimientos). En el municipio de Placetas se constató la mayor PA para el SD (2,08 por 1000 nacimientos).

En el Anexo 6 se muestran las tasas de PA de los diferentes fenotipos clínicos por municipios. En las CCCT en el municipio con mayor PA que fue Quemado de Güines, el predominio fue a expensas de los defectos septales conoventriculares, con tasa de PA de 1,82 por 1000 nacimientos, mientras que, en Placetas, con la mayor prevalencia de los DTN, la anencefalia y la EB tuvieron la misma tasa de PA (1,30 x 1000 nacimientos).

En HLP con la mayor PA en Quemado de Güines, predominaron los casos con LL sin paladar hendido (1,82 por 1000 nacimientos) mientras que, en Corralillo, con la segunda mayor PA; la

mayor frecuencia se observó para el fenotipo clínico de LL con paladar hendido (1,41 por 1000 nacimientos).

#### **2.4.1.3 Identificación de conglomerados espacio-temporales para DC folato-sensibles**

El resultado del análisis para la identificación de conglomerados espacio-temporales se muestra en el Anexo 7. Se observan varias áreas con mayor probabilidad de que aparezcan DC sensibles a la deficiencia materna de AF que fuera de ellas, para diferentes DC específicos, con diferencias entre los casos observados y esperados y con un RR superior a 1. No obstante, solo se identificaron dos conglomerados espacio-temporales primarios significativos, uno en el año 2017 para las HLP (Figura 1) que incluyó los municipios de Corralillo y Quemado de Güines (casos observados: 5; casos esperados: 0,31 RR: 18,93;  $p=0,004$ ) y otro para los DTN en el año 2018 (Figura 2) que abarcó los municipios de Quemado de Güines, Santo Domingo y Sagua la Grande (casos observados: 7; casos esperados: 1,06 RR: 6,47;  $p=0,013$ )

#### **2.4.2 Identificación de factores de riesgo asociados a los defectos congénitos mediante análisis bivariado**

Los factores de riesgo identificados en análisis bivariado en el conjunto de DC y que resultaron significativamente asociados a éstos se muestran en la Tabla 2.

En el Anexo 8 se muestran los factores de riesgo que se asociaron significativamente a los DC folato-sensibles en el grupo de madres de casos incidentes y prevalentes en conjunto, respecto a las madres del grupo control y se comparan con los resultados de un análisis de asociación similar efectuado entre las madres de casos incidentes respecto al grupo control. Entre ambos estudios hubo coincidencia entre los factores de riesgo que se asociaron a los DC, con excepción de los antecedentes familiares de DC, los antecedentes de DC en familiares de I Grado y por vía paterna, en los que no se constató significación en el grupo de madres de casos incidentes respecto a las madres de los controles.

En las Tablas de la 3 a la 7 aparecen los factores de riesgo asociados a los grupos de DC específicos. En las mismas puede observarse que las enfermedades crónicas en el embarazo, el consumo de medicamentos no habituales, el consumo deficiente de folatos, el sobrepeso y obesidad materna, así como los antecedentes familiares de DC son factores de riesgo que se identificaron en las CCCT, los DTN y las HLP.

La avanzada edad materna constituyó un factor de riesgo para las CCCT, los DTN, las HLP y el SD, mientras que la maternidad en la adolescencia se asoció a la presencia de HLP y GS. Por su

parte, el no consumo preconcepcional de AF fue un factor de riesgo para las CCCT, los DTN y el SD.

El periodo intergenésico corto fue un factor de riesgo identificado en las madres con CCCT, HLP, la GS y el SD. La exposición a productos químicos se constató en los casos con DTN y GS.

Entre los factores de riesgo que resultaron significativamente asociados a las CCCT se encuentran las enfermedades crónicas (diabetes pregestacional y la HTA crónica), medicamentos no habituales, como los antibióticos, los analgésicos-antinflamatorios y los esteroides. (Tabla 3) Los antecedentes familiares de CC y la anemia en el embarazo fueron factores de riesgo que no se identificaron en otros tipos de DC.

En la Tabla 4 se resumen los factores de riesgo que se asociaron con la aparición de los DTN. La diabetes mellitus y la epilepsia fueron las enfermedades crónicas más frecuentes y entre los medicamentos se identificaron los antibióticos, sedantes y sicotrópicos. La exposición materna a fuentes de calor y la fiebre en el embarazo fueron factores de riesgo que solamente se asociaron a este tipo de DC.

Los factores de riesgo asociados a las HLP (Tabla 5), muestran entre los medicamentos no habituales a los del grupo de analgésicos y antinflamatorios y a los sedantes y sicotrópicos. La exposición pasiva al humo del cigarrillo y los antecedentes familiares de HLP fueron factores de riesgo limitados a este tipo de DC.

En la Tabla 6 aparecen los factores de riesgo asociados a la GS. Entre los riesgos que se asociaron a este tipo de DC se identificaron la ingestión de bebidas alcohólicas, el hábito de fumar, el bajo peso materno y las edades maternas menores de 20 años de edad.

Entre los factores de riesgo asociados con la aparición del SD estuvieron el consumo de medicamentos no habituales, como los sedantes y psicofármacos. Entre los factores de riesgo nutricionales se encontró el no consumo preconcepcional de AF y el consumo deficiente de folatos; mientras que entre los factores de riesgo biológicos no modificables se identificaron la la avanzada edad materna. (Tabla 7).

En la Tabla 8 se muestra que la edad media en las madres de los controles fue 27,65 +/- 4,48 años. Las diferencias encontradas para la GS y el SD fueron significativas ( $p=0,000$ ).

#### **2.4.3 Identificación de factores de riesgo mediante análisis multivariado**

A partir de las 17 variables clínicas y epidemiológicas incluidas como variables independientes en el modelo, quedaron incluidas 10 en la ecuación de regresión, todas significativas. El porcentaje global de clasificación correcta fue de 84,3%; 90,1% en los casos y 72,6% en los

controles. Las variables incluidas en la ecuación en el análisis multivariado fueron los antecedentes personales de enfermedades crónicas, periodo intergenésico corto, consumo de tabletas anticonceptivas, niveles elevados de AFP, polihidramnios, sobre peso u obesidad materna, consumo deficiente de folatos, avanzada edad materna, madre adolescente y no consumo preconcepcional de AF. (Anexo 9).

## 2.5 Discusión

### 2.5.1 Conglomerados temporales, espaciales y espacio-temporales de los DC folato-sensibles

#### 2.5.1.1 Determinación de la prevalencia ajustada por años, fenotipos clínicos y tipos de DC folato-sensibles para el análisis de su variación temporal.

El hallazgo de las CCCT como el DC más frecuente coincide con los reportes de la literatura que señala a las CC como los DC de mayor prevalencia a nivel mundial, estimada entre 8 y 10 por 1000 NV, constituyen un tercio de todos los DC y la principal causa de mortalidad infantil por DC, al representar entre el 30 y 50% de éstas. (102) (103) (104)

La mayoría de las publicaciones sobre el tema se limitan a determinar la prevalencia de CC en NV de manera general y no por fenotipos, lo cual dificulta la comparación de los resultados.

(105) (106) (107) (108) (109) (110)

Entre las CC más comunes y más severas se encuentran las conotronics, que constituyen entre el 20 y el 30% de todas las CC diagnosticadas en la vida prenatal y constituyen el subtipo más común de CC, luego de los defectos septales. (111) (112) (113) (114)

Al incluir todos los tipos de CC, Navarro (100) identificó que en Villa Clara las tasas anuales de PA entre los años 2000 y 2008 oscilaron entre 3,0 y 5,2 por 1000 nacimientos.

En el presente estudio los DTN ocuparon el tercer lugar en frecuencia, sin embargo, la literatura científica refleja que los DTN constituyen el segundo grupo de DC más frecuentes, con una frecuencia que oscila en un rango entre 1,0 y 10,0 por cada 1000 nacimientos. (2) (115) Resulta oportuno señalar que la tasa de PA identificada en el presente estudio se incluye en ese rango de prevalencia.

Estos defectos estructurales del sistema nervioso central que afectan el cerebro o la columna vertebral del embrión, como promedio se presentan en 1 cada 1000 gestaciones, aunque su frecuencia resulta aún mayor entre los productos abortados. (116) Los tipos más comunes de DTN son la EB y la anencefalia. (26) (117) (118) (119) (120) (121) (122)

Las HLP constituyen los DC craneofaciales más frecuentes y ocupan el cuarto lugar en prevalencia entre los DC. (23) (26) Aunque, en EUA los DC más frecuentes a nivel nacional son el SD y el LL con o sin PH, seguido de las CC. (1)

La PA de HLP en la provincia de Villa Clara se encuentra dentro del rango de prevalencia descrito en Cuba y a nivel mundial (0,75 – 1,75 por 1000 nacimientos). (32) (123) (124) (125)

La PA de HLP identificada en el presente estudio resultó discretamente superior a la encontrada en una investigación realizada en La Habana entre 2000 y 2003 (PA de 0,71 por 1000 nacimientos), (126) frecuencia ésta que coincide exactamente con la descrita en Santiago de Cuba, donde se identificaron 98 casos de HLP entre 138 381 nacimientos en un periodo de 10 años. (127)

El fenotipo clínico más frecuente en los casos de este estudio fue el LL con paladar hendido (PH) con una frecuencia que duplica a la de las fisuras del paladar, resultado coincidente con diferentes estudios nacionales e internacionales donde el PH representa entre un tercio y la mitad de los casos con HLP. (128) (129) (130)

La prevalencia de GS identificada en el presente estudio se encuentra en el rango de prevalencia global descrito en la literatura científica, que oscila entre 3 a 4,5 casos por 10 000 nacimientos. Se plantea que existen variaciones temporales y espaciales en las cifras de incidencia de GS, con una tendencia temporal ascendente en los últimos años (34) (35) (131)

El SD ocupó el segundo lugar de frecuencia en la provincia de Villa Clara, éste constituye la aneuploidía más frecuente en humanos y su frecuencia varía en los diferentes países de acuerdo con las características de la población, tasas de fecundidad específicas por edad materna, la posibilidad de realizar DPN y de IEE, así como las características propias de los sistemas de vigilancia. (37) (38) (132)

La tasa de prevalencia ajustada identificada en el presente estudio en el periodo comprendido entre 2013 y 2018 resulta similar a la identificada por Herrera Martínez (53) en un estudio previo realizado en esta provincia entre los años 1986 y 2000 (1,012 por 1000 nacimientos para todas las edades maternas), mientras que la prevalencia en mujeres mayores y menores de 35 años fue de 5,19 y 0,79 por 1000 nacimientos, respectivamente.

En la provincia de Villa Clara se implementó a mediados del año 2015 un programa preventivo para incentivar el uso preconcepcional de AF en las mujeres de edad reproductiva que abarcó a varios municipios. (133) Existe suficiente evidencia epidemiológica que avala el hecho de que

la suplementación preconcepcional materna con AF disminuye la aparición de DTN y otros DC folato-sensibles en la descendencia. (10) (117) (134) (135) (136)

El hecho de que las mayores tasas de PA para este tipo de DC se observara dos y tres años después de la implementación del programa preventivo en la provincia, junto a los bajos niveles de consumo preconcepcional de este micronutriente identificado en el presente estudio, justifican investigar el alcance y efectividad de este programa de base comunitaria.

La tendencia temporal discretamente creciente en la PA de las CCCT entre los años 2013 y 2018 identificadas en el presente estudio está acorde con lo descrito en la literatura, donde se plantea que en los últimos años se observa una tendencia creciente en la incidencia de CC no sindrómicas. (137) (138) (139) Un meta-análisis que incluyó 260 investigaciones reveló que entre 1970 y 2017, la prevalencia de CC se incrementó globalmente en 10% cada cinco años. (109)

Este incremento pudiera ser reflejo de un incremento en la frecuencia de conocidos factores de riesgo como el sobrepeso y la obesidad materna, diabetes pregestacional y otros. (21)

Sin embargo, la tendencia al incremento observada en la frecuencia de los DTN no coincide con lo descrito en la literatura, donde se describe en los países desarrollados una tendencia a la disminución de su frecuencia, entre sus causas se encuentran la suplementación preconcepcional y fortificación de alimentos con AF, la accesibilidad a un DPN temprano y la IEE. (122) (135) (140) (141) El autor considera que dado el acceso universal de las embarazadas cubanas a los diferentes métodos de DPN de los DTN, así como a la posibilidad de solicitar la IEE, los factores que subyacen en esta tendencia al incremento apuntan a deficiencias en la suplementación preconcepcional y en la fortificación con AF.

La tendencia temporal discretamente ascendente en la prevalencia de DTN observada en Villa Clara resulta similar a la descrita en la provincia de Las Tunas entre los años 2012 y 2015. (142)

Cuba se encuentra entre los 81 países en que está establecida la fortificación obligatoria de alimentos con AF. (143) En 1987 se implementó un programa de cobertura nacional dirigido a todos los grupos poblacionales para la fortificación con hierro y vitaminas del complejo B de la harina de trigo y 12 años después, se inició la fortificación con iodo de toda la sal de consumo dirigida también a todos los grupos poblacionales.

A los alimentos de consumo común que pueden ser fortificados se llaman "vehículos alimentarios", porque transportan micronutrientes. Los vehículos alimentarios fortificados más comúnmente utilizados a nivel mundial son el aceite vegetal, el arroz, la harina de maíz, la harina de trigo y la sal de consumo. (144) (145)



Sin embargo, de acuerdo a los datos publicados por la OMS, resultado de la segunda revisión de las políticas de nutrición global 2016-2017, no existen evidencias de que en Cuba se continúe fortificando la harina de trigo con AF, como un programa dirigido a toda la población. (144)

Se plantea que en los países en los que la estrategia de prevención de los DTN está basada en la promoción del consumo preconcepcional de AF y no en la fortificación de alimentos, como las de Cuba y la mayoría de los países europeos, han mostrado ser inefectivas. (146)

Aunque, los resultados de ensayos clínicos realizados para evaluar el consumo materno preconcepcional de AF en la prevención de la recurrencia en casos de DTN, indican que entre el 30 y el 50% de los casos no son prevenibles con AF, a esos casos se les denomina “AF resistentes” o “no respondedores”. Por lo que se investiga el efecto de otras deficiencias nutricionales en el origen de los DTN, como la deficiencia materna de Inositol. (141)

Existe suficiente evidencia científica a favor de una tendencia temporal ascendente en los casos de GS en las últimas tres décadas, tanto en Europa como en América, de una prevalencia global estimada en 3,6 por 100 000 NV durante el periodo 1995-2005 alcanzó la cifra de 4,9 por 100 000 NV entre 2006-2012. (147) (148) (149) (150) Por el contrario, en la provincia de Villa Clara en el periodo de estudio se constató una tendencia al decrecimiento, lo que coincide con lo observado por Chen y colaboradores. (151)

A consideración del autor de la presente investigación, la tendencia al decrecimiento en la frecuencia de GS observada en Villa Clara guarda relación, además, con la pequeña cantidad de años (seis) incluidos en la serie y, a que solamente se limita al estudio de la GS, pues cuando el autor del presente trabajo incluyó también los casos con onfalocele y amplió el periodo de estudio a 30 años se observó una tendencia temporal francamente creciente en la prevalencia en la provincia de 0,38 en 1990 a 0,75 en 2019. (34)

De igual forma, cuando fueron incluidos todos los tipos de defectos de la pared abdominal anterior se observó un incremento temporal de la PA de 0,70 en el periodo 1994-2006 a 0,95 entre 2007-2019. (61)

La tendencia temporal decreciente observada en la prevalencia de SD en NV en Villa Clara coincide con la que presenta el país, lo que es atribuido a una disminución en la tasa de fecundidad general que se observa en Cuba en las últimas décadas. (37)

#### 2.5.1.2 Identificación de conglomerados espaciales

En los municipios de Corralillo, Placetas y Quemado de Güines se identificaron las mayores tasas de PA de CCCT y DTN. En el caso de Corralillo y Quemado de Güines pudiera estar en

relación con el hecho de que estos territorios estuvieron entre los que menor número de NV y NM tuvieron durante el periodo. Explicación epidemiológica no aplicable a Placetas, por lo que es preciso profundizar en las causas de la elevada PA en este municipio, aunque resulta oportuno recordar que, a pesar de la importancia que revisten los DC tanto desde el punto de vista médico como social, se desconoce la causa del 50 al 70% de los casos. (2)

La mayor tasa de prevalencia ajustada para la GS se presentó en el municipio de Manicaragua. La principal actividad económica en éste y en los mencionados municipios es la agricultura cañera y no cañera. (152)

Tras estas elevadas tasas de prevalencia subyacen múltiples factores genéticos y ambientales. La exposición no ocupacional a sustancias químicas puede ocurrir en ambientes residenciales cercanos a áreas agrícolas a través de residuos contaminantes de las aguas de consumo o alimentos. Los fertilizantes, herbicidas e insecticidas son de uso frecuente por los campesinos, los que podrían terminar en el suelo y aguas subterráneas y subsecuentemente incrementar los niveles de nitratos u otros agentes químicos en las aguas de consumo. (153)

Más de un cuarto (30,5%) de la población de estos territorios villaclareños residen en áreas rurales, donde el agua de consumo es usualmente obtenida de pozos y en menor frecuencia de manantiales. (133) Por lo que se requieren estudios más específicos en este sentido.

Adicionalmente, en el municipio de Placetas existe una alta concentración de fundiciones artesanales de objetos de aluminio, la mayoría de ellas localizadas de manera inadecuada en los patios de las viviendas, en cuyo proceso se generan elevadas temperaturas además de contaminación del aire con hollín, humo, hidrocarburos orgánicos y otros contaminantes ambientales. (133) Entre los factores ambientales que describe la OMS como causas de DC se describe el hecho de trabajar o vivir cerca de fundiciones. (2)

La literatura científica describe múltiples factores ambientales relacionados con la aparición de DTN, incluyendo la hipertermia, elementos químicos en el suelo, exposición a pesticidas y desinfectantes, así como a la presencia de nitratos en el agua de consumo. (15) (122) (140) (154)

### 2.5.1.3 Identificación de conglomerados espacio-temporales

La identificación de conglomerados espacio-temporales para DC es una herramienta útil en epidemiología, considerando el papel del macroambiente sobre las condiciones de salud y enfermedad. El conglomerado espacio temporal para las HLP en el año 2017 que abarcó los municipios colindantes de Corralillo y de Quemado de Güines y el que abarcó a los municipios de Quemado de Güines, Santo Domingo y Sagua la Grande para los DTN en el año 2018, son

referentes de esta observación. La labor económica fundamental de estos municipios y sus condiciones de ambientes vulnerables propician análisis particulares, como los derivados de las industrias químicas existentes en el municipio de Sagua la Grande y la labor agrícola fundamental en los demás municipios.

Dentro del conglomerado de DTN identificado en el presente estudio predominan los casos con EB (71,43%), excepto en Sagua la Grande, donde la totalidad de los casos observados fueron de anencefalia. Es este un municipio donde, además de la actividad agrícola, tienen un gran peso la industria de productos químicos, fundamentalmente de cloro y de sosa cáustica.

Resulta oportuno señalar que de los municipios incluidos en el conglomerado espacio temporal de DTN el único municipio que estuvo incluido en el programa preventivo para incentivar el uso preconcepcional de AF en las mujeres de edad reproductiva que se implementó a mediados del año 2015 en la provincia de Villa Clara fue Santo Domingo, pero en la medida que se avanzó en la investigación se incluyeron los municipios de Sagua la Grande y Quemado de Guines. (133)

En la variación espacial de las HLP están implicados además de factores genéticos, diferentes factores económicos y socioculturales; así, por ejemplo, dentro del propio continente africano se advierten variaciones en la frecuencia de estos DC, con tasas que oscilan desde 0.5/1000 en Ghana y en Nigeria 0.7/1000 en Malawi, 1.4/1000 en Etiopía, hasta 1.65/1000 en Kenia. (155)

(156) Evidencia que es sustentada por un reciente estudio de meta-análisis, donde se observó que la prevalencia al nacer de las HLP en países de bajos y medianos ingresos fue de 1.38/1000. (130)

Se describe también una variación espacio-temporal en los DTN, debido a factores ambientales directos e indirectos. Entre los factores directos se mencionan la temperatura ambiental, que podría inducir a hipertermia durante el periodo crítico del desarrollo y entre los factores indirectos, la exposición a agentes infecciosos, químicos usados en la agricultura y los factores nutricionales, como la dieta. Janitz (157) identificó un clúster de DTN en el oeste de Oklahoma, en EUA. Aunque se desconocen las causas, los investigadores plantean que en esta región predomina la población hispana y que en este grupo étnico se han constatado las concentraciones más bajas de AF y las frecuencias más elevadas de DTN en los EUA.

Otros investigadores informan conglomerados espaciales de DTN, por ejemplo, en Argentina, a pesar de que en este país se realiza la fortificación obligatoria de la harina de trigo con AF, en la ciudad de Buenos Aires se identificó un conglomerado espacial de anencefalia. Aunque

esta ciudad es la única del país donde es legalmente permitido el aborto ante el DPN de anencefalia, por lo que los autores plantean que es probable que algunos casos con este DC procedan de otras regiones del país. (158)

Se describe una variación espacial en las tasas de prevalencia de GS, con conglomerados espaciales en zonas particulares o áreas geográficamente cercanas, se ha sugerido un posible factor etiológico agroquímico. (48)

En el presente estudio no se identificaron conglomerados significativos de elevada frecuencia de este DC, no obstante, en el municipio montañoso de Manicaragua, se constató un RR=3.00 para la aparición de este DC, por lo que se precisan estudios ecológicos que puedan valorar la acción de este potencial mecanismo etiopatogénico.

Del mismo modo, en los municipios de Corralillo y Quemado de Güines se acusó riesgo para las CCCT, pero no pudo demostrarse la existencia de conglomerados, hallazgos similares a los de los municipios de Manicaragua, Santa Clara y Placetas que, de conjunto, constituyen un área con mayor probabilidad de aparición de SD, pero sin significación estadística asociada. Se ha planteado que la demostración de conglomerados, resulta difícil desde el punto de vista epidemiológico y estadístico y, una vez identificados implican dificultades para establecer una asociación entre éstos y los factores relacionados con cada área geográfica. (98)

### **2.5.3 Factores de riesgo asociados a los defectos congénitos folato-sensibles identificados en el análisis bivariado y multivariado**

#### **2.5.3.1 Factores de riesgo maternos asociados a las CCCT en la descendencia**

La diabetes pregestacional y la hipertensión arterial (HTA) crónica como las enfermedades crónicas no transmisibles que con mayor frecuencia se asociaron a las CCCT, coincide con lo observado en la provincia de Cienfuegos, donde las CC fueron los DC que con mayor frecuencia se observaron en la descendencia de las madres con diabetes pregestacional (50% de los casos con DC), mientras que en Arabia Saudita la frecuencia de CC entre los hijos de madres diabéticas fue de 11,82%. (159) (160)

Durante el primer trimestre el feto no es capaz de secretar insulina, lo que resulta en hiperglucemia fetal ante la presencia de relativa resistencia materna a la insulina. Modelos animales en roedores y embriones de pollo muestran que elevados niveles de glucosa exógena originan una variedad de DC. (102) Un inadecuado control metabólico en mujeres con diabetes mellitus (DM) se ha asociado a un incremento del riesgo de CC en la descendencia, con mayor frecuencia en los casos con DM tipo 1. (160) (161) (162) (163)

Varias investigaciones describen asociación entre la presencia de síndrome metabólico en las mujeres y la aparición de CC en su descendencia. (102) (164)

Navarro (100) en su estudio de las CC en Villa Clara encontró que la DM y la HTA se asociaron significativamente a las CC con OR de 6,32 y 3,57, respectivamente.

La HTA pregestacional se asocia con un incremento del riesgo para varios tipos de DC, incluyendo las CC. (165) (166) (167) El hecho de que esta asociación parece ser independiente de los medicamentos antihipertensivos consumidos, parece indicar que la HTA materna, *per se*, tiene un impacto negativo en el desarrollo embrionario, lo que pudiera estar relacionado con una afectación en el flujo sanguíneo o porque la HTA y algunos DC comparten factores de riesgo genético comunes, por ejemplo, genes con efectos pleiotrópicos. (165)

Por su parte, la identificación de la anemia materna como un factor de riesgo coincide con lo constatado en el estudio clínico, epidemiológico y etiopatogénico de las CC realizado en Villa Clara entre los años 2000 y 2008. (100) Se plantea que la aparición de DC en la descendencia de madres anémicas podría ser consecuencia de una hipoxia embrionaria durante el periodo crítico de morfogénesis. (168) (169)

El efecto de la anemia por déficit de hierro como agente teratogénico fue estudiado en modelos murinos y se observó que la deficiencia materna de hierro origina una disminución de las células anteriores del segundo campo cardiaco, debido a una variedad de procesos como la disrupción de la proliferación o inhibición de la migración; los que a nivel molecular resultan de la activación de la vía de señalización del ácido retinoico que se une a sus receptores intracelulares, altera la expresión de varios genes “secuencia abajo” involucrados en el proceso de morfogénesis y la diferenciación de los cardiomiocitos del tracto de salida del corazón. (27) (106) (161)

La obesidad durante el embarazo está asociada a diferentes efectos adversos, incluyendo un aumento del riesgo de DC en la descendencia, como las CC y los DTN. (170) Según reportes de la OMS; alrededor del 15% de las mujeres en edad reproductiva son obesas y un 40% tienen sobrepeso. (171)

Liu (170) en un meta-análisis que incluyó 90 estudios de casos y controles encontró que, comparado con las madres normopeso, el riesgo para CC en la descendencia fue de 1,08 (95% IC: 1,03- 1,13) en las madres con sobrepeso y 1,23 (95% IC: 1,17- 1,29) en las obesas.

### 2.5.3.2 Factores de riesgo maternos asociados a los DTN en la descendencia

El hallazgo de la diabetes pregestacional y la epilepsia asociados a las madres con descendencia con DTN coincide con lo descrito en la literatura. (172) (173) (174)

El porcentaje de diabéticas entre las madres de los casos con DTN identificadas en el presente estudio, resultó superior a la observada en las madres de casos con DTN en Egipto (4,40%).

(172) El inadecuado control metabólico en el embarazo se relaciona con el incremento de la frecuencia de diversos DC, entre ellos los DTN. Múltiples factores no glucémicos influyen en la teratogénesis, como la interacción entre citoquinas y el genotipo fetal y la glucosa. (173) La prevalencia promedio de los DC relacionados con la DM materna entre los años 2001 y 2016 en el Estado Norteamericano de Utah, fue de 1,1 por 100 000 nacimientos. (174)

Los diferentes medicamentos antiepilépticos pueden originar un amplio rango de DC, aquellos que son antagonistas del AF, como la fenitoina, fenobarbital, carbamazepina y primidona; incrementan el riesgo para los DTN y otros DC sensibles a la deficiencia materna de AF. (175)

(176) Todos con riesgo teratogénico moderado (categoría C) o alto (categoría D). (177) Un estudio prospectivo para ver la relación entre las diferentes dosis de las drogas antiepilépticas y su efecto teratogénico, que incluyó a 7355 embarazadas epilépticas de 42 países, informa que la mayor tasa de DC se observó en la carbamazepina, (5,5%) (178) medicamento éste que con mayor frecuencia se identificó en el presente estudio que consumían las madres epilépticas villaclareñas.

La identificación del consumo materno de antibióticos como un factor de riesgo para la aparición de DC folato-sensibles en la descendencia, particularmente CCCT y DTN, está a tono con lo referido en la literatura científica, donde se plantea que el consumo de estos medicamentos constituye un factor de riesgo para la aparición de DTN y otros DC folato-sensibles, como resultado de una disminución de la microflora intestinal que interviene en la absorción y metabolismo de los poliglutamatos, la forma natural del folato. (23)

Los resultados observados en el presente estudio en relación al incremento del riesgo de DC en las madres que refirieron exposición a fuentes de calor o fiebre durante el primer trimestre coincide con lo referido en la literatura, respecto a que la hipertermia constituye un factor teratogénico en una variedad de especies de animales, al interferir con la síntesis de proteínas; lo que puede conllevar a la muerte celular, disrupción vascular e infartos placentarios. (179)

La hipertermia como factor de riesgo para los DTN en humanos ha sido referida por otros investigadores. (30) (180) (181) En estudio realizado en EUA se constató que, la presencia de gripe

o influenza que cursó con fiebre, se asoció significativamente con ocho tipos de DC, entre ellos los DTN. (180)

#### 2.5.3.3 Factores de riesgo maternos asociados a las HLP en la descendencia

La identificación del consumo de medicamentos no habituales, como analgésicos y antiinflamatorios; sedantes y sicotrópicos como riesgo para las HLP coincide con un estudio de casos y controles realizado en Hungría en el año 2020, donde se incluyeron 751 casos con HLP, y se encontró asociación entre la presencia de síndrome de dolor neuro músculo-esquelético en las madres y la presencia de HLP y los autores atribuyeron el hecho al efecto teratogénico de los analgésicos y antiinflamatorios consumidos para aliviar los síntomas. (182)

Todos los medicamentos de los grupos farmacológicos de sedantes y sicotrópicos, tienen un alto riesgo teratogénico (categorías D y X). (177) Estudios en animales han demostrado un mecanismo mediante el cual la alteración en los niveles de serotonina inducido por las drogas inhibitoras de su recaptación y algunos antidepresivos tricíclicos, como la amitriptilina, pueden impactar en el proceso de morfogénesis y organogénesis. La serotonina resulta esencial durante la organogénesis, así un insulto que tenga el potencial de alterar el proceso de señalización de la serotonina resulta en una variedad de DC, como las HLP. (183)

La aparición de las HLP asociadas a la exposición pasiva al humo del cigarrillo, el consumo deficiente de folatos y el sobrepeso u obesidad materna, los antecedentes familiares de HLP, el sexo masculino y el embarazo en las edades extremas de la vida (menores de 20 y mayores de 35 años) concuerdan con lo descrito por investigadores de diferentes regiones del mundo, incluido Cuba. (33) (168) (184) (185) (186) (187)

Se ha reportado asociación entre las HLP y el consumo materno de alcohol, (168) (185) (188) lo que no se corroboró en la presente investigación, a tono con un reciente meta-análisis donde no se constató correlación entre el consumo moderado de alcohol y el riesgo de HLP, aunque los autores plantean que el riesgo potencial del consumo de bebidas alcohólicas no debe ser excluido, debido a la heterogeneidad en los niveles de consumo de las diferentes investigaciones y la limitada muestra de casos de mujeres con elevado nivel de consumo. (189)

#### 2.5.3.4 Factores de riesgo maternos asociados a la GS en la descendencia

La GS es uno de los pocos DC en que está bien documentado el incremento de su prevalencia a nivel mundial, especialmente en mujeres menores de 24 años de edad, se reconoce que la concepción en edades jóvenes de la vida constituye uno de los factores de riesgo que con mayor fuerza se asocia a la GS. (35) (148) (190) (191) (192) En la provincia de Villa Clara se constató que más



del 80% de las madres de los casos con GS tenían menos de 24 años de edad, consistente con lo planteado por otros investigadores, quienes refieren que aproximadamente entre el 70% al 80% de los casos con GS son hijos de madres menores de 25 años. (48) (193)

La edad media de las madres en el presente estudio resultó análoga a la descrita en una investigación realizada en El Cairo entre los años 2017 y 2018. (194) La mayor proporción en la frecuencia observada en las madres jóvenes podría estar asociada con factores ambientales.

Estos factores pueden ser más frecuentes en mujeres jóvenes, como el consumo de bebidas alcohólicas y de drogas ilícitas, el hábito de fumar y las infecciones del tracto genitourinario y de transmisión sexual. (193)

El hallazgo en el presente estudio de la sepsis urinaria asociada a las GS concuerda con otros investigadores que describen las infecciones maternas y la sepsis urinaria como factores de riesgo para la GS. (48) (67) (192) (193) En todos los casos se asoció a consumo de medicamentos.

La identificación del consumo de medicamentos no habituales, como los analgésicos y antiinflamatorios y la presencia de GS coincide con lo observado por Anderson (148) quien identificó a los antiinflamatorios no esteroideos entre los medicamentos que se asociaron a la presencia de este DC. Sin embargo; en el presente estudio no se constató la asociación observada por este investigador con el consumo de drogas vasoconstrictoras; ni tampoco con los antidepresivos, descrito por otros investigadores. (48) (195)

#### 2.5.3.5 Factores de riesgo maternos asociados a SD en la descendencia

En el presente estudio más de la mitad de las madres de los casos con SD tenían AEM, aquellas con 35 años o más tuvieron un alto riesgo de tener descendencia con esta aneuploidía. Este hallazgo respalda la reconocida asociación entre la AEM y el incremento del riesgo de aneuploidías cromosómicas. (36) (49)

El riesgo asociado a la AEM identificado en el presente estudio resulta superior al observado por Elmerdahl (196) en un estudio de cohorte realizado en Dinamarca. [OR 7,44 (95% IC 5,93–9,34)], quien constató el mayor riesgo en las madres con 40 años o más.

En China el riesgo para SD se incrementa significativamente de menos de 3 por 1000 en las edades maternas menores de 35 años a 28 por 1000 a la edad de 45 años. (197)

El cambio global en los estilos de vida en los últimos 50 años con una clara tendencia a posponer la planificación familiar y el embarazo, unido a la extensión en los servicios de fertilidad a nivel mundial, ha resultado en un incremento del número de gestantes con AEM.

(196) (197) (198) (199)



La edad media de las madres de los casos con SD en el presente estudio (aproximadamente 34 años) resultó superior a la observada en Costa Rica [32,2 (95% IC:31,47- 32,92), DS: 1,60]. (132) La edad materna por encima de los 35 años en el momento de la concepción constituye en factor de riesgo establecido para el SD, sin embargo; el gran número de casos en madres jóvenes sugiere que otros factores de riesgo pudieran estar involucrados en la predisposición de las madres jóvenes a tener hijos con SD. (36) (68)

Cuando se analiza la distribución de frecuencia de SD según las edades maternas, se obtiene una curva de distribución bimodal, con un pico temprano en los grupos de edades de menores de 30 años, que coincide con el mayor número de nacimientos en este grupo etario y no por una posible mayor incidencia y un segundo pico en el grupo de madres mayores de 35 años, que se corresponde con el riesgo atribuible a la AEM. (37) (53)

En un estudio previo realizado en Villa Clara entre los años 1986-2000, Herrera Martínez (53) constató que el comportamiento de la prevalencia de SD en las edades maternas hasta los 30 años mostró una lenta progresión y a partir de esta edad se produjo un incremento exponencial de ésta. En el presente estudio la edad paterna no constituyó un factor de riesgo para esta aberración cromosómica, a diferencia de lo descrito por otros investigadores, (53) (199)

El riesgo de DC sensibles a la deficiencia materna de AF asociado a la avanzada edad materna se explica porque a medida que aumenta la edad materna, se incrementa la desmetilación pasiva del ADN en el pronúcleo femenino y la pérdida de eficacia de las enzimas metiltransferasas de las histonas, lo que resulta en hipometilación del ADN. (16) (24)

Las mujeres con consumo deficiente de folatos y las que no tomaron suplemento preconcepcional de AF tuvieron cuatro veces más posibilidades de tener descendencia afectada por SD que aquellas que lo consumieron. La deficiencia de AF puede alterar los niveles de metilación de la región pericentromérica requeridos para su unión con los microtúbulos del huso acromático, y favorecer así la no disyunción cromosómica durante la meiosis y, de esta forma, actúa como un factor de riesgo para la aparición del SD. (49) (200)

A pesar de que la mayoría de la literatura referida a los factores de riesgo para SD se centra en la AEM, los agentes que inducen errores en la recombinación meiótica y la deficiencia de AF (por consumo deficiente de folatos o por polimorfismos génicos) se han investigado otros factores de riesgo potenciales, como uso de tabletas anticonceptivas, la obesidad materna, hábito de fumar y exposición a rayos X, (200) ninguno de estos últimos identificados en el presente estudio.

Entre los medicamentos identificados que consumieron con mayor frecuencia las madres de los casos con SD estuvieron los sedantes y psicofármacos. Se conoce que diferentes compuestos químicos ambientales y drogas tienen potencial aneugénico. (200) (201) (202)

Múltiples laboratorios de la Unión Europea que han investigado la inducción de la aneuploidía por químicos ambientales, demostraron que diversos químicos aneugénicos interactúan con una variedad de procesos celulares diana produciendo alteraciones en la segregación cromosómica. Entre los medicamentos que estudiaron se encuentran sedantes y psicofármacos como el hidrato de cloral y el diazepam, capaces de generar aneuploidía por inhibición de la formación del huso acromático y por modificaciones en el funcionamiento de los centriolos, respectivamente. (202)

Desde el año 2005 la OMS recomendó que las mujeres deben esperar un mínimo de 24 meses entre una gestación y la concepción del próximo hijo, para reducir el riesgo de resultados adversos, tanto maternos como neonatales. Cuando un embarazo es concebido dentro de un periodo intergenésico corto, la reserva de micronutrientes no está completamente restaurada después del embarazo previo, lo cual puede producir un síndrome de depleción materna y conllevar a consecuencias maternas, fetales y perinatales.

Principalmente, son las reservas de AF las que se ven implicadas, ya que durante el embarazo existe una movilización de las reservas maternas hacia el feto; con concentraciones que comienzan a reducirse desde la semana 20 de gestación hasta las primeras semanas post-parto, lo cual se ha visto reflejado en niveles bajos de AF y altos de Hcis. (203)

#### 2.5.3.6 Variables de riesgo incluidas en el análisis multivariado

Las variables introducidas en la ecuación de regresión logística para el conjunto de los DC, por resultar significativas en el análisis bivariado del conjunto de DC, con la excepción del polihidramnios que fue incluida por consistencia en la literatura, (26) (101) resultaron todas significativas en el análisis multivariado.

Por otra parte, los antecedentes personales de enfermedades crónicas, el consumo deficiente de folatos y el sobrepeso u obesidad materna, coinciden con las variables que resultaron significativamente asociadas a las CCCT, los DTN y las HLP en el análisis bivariado. De igual forma que en el análisis multivariado; la AEM se identificó como un factor de riesgo para las CCCT, los DTN, las HLP y el SD, mientras que las madres adolescentes lo fueron para las HLP y la GS, factores de riesgos estos discutidos en detalle con anterioridad.

Por su parte, el no consumo preconcepcional de AF se asoció significativamente en el análisis bivariado de las CCCT, los DTN y el SD. Factor de riesgo con una gran evidencia

epidemiológica en la literatura, que lo sustenta como un factor de riesgo para los DC folato-sensibles, como fue discutido en el acápite previo.

Los niveles elevados de Alfa fetoproteína (AFP) y el polihidramnios constituyen importantes marcadores bioquímicos y ultrasonográficos, respectivamente, de riesgo materno fetal; los que se relacionan con la presencia de diferentes DC. Los niveles séricos maternos de AFP se elevan en casos de DTN (anencefalia, raquisquisis) y defectos de la pared anterior del abdomen, como la GS, así como otros defectos como el higroma quístico, hidrops fetalis, entre otras. Constituye, además, un predictor del bienestar fetal, al relacionarse con el bajo peso al nacer y la placenta previa, entre otros. (26) (92)

El polihidramnios se asocia también a complicaciones materno-fetales. Entre sus causas se describen los DC fetales, como la obstrucción del tracto gastrointestinal y los defectos del SNC, como los DTN. El polihidramnios se asocia a complicaciones obstétricas, entre las que se encuentran el parto pretérmino, desprendimiento prematuro de membranas, desprendimiento placentario, entre otros. (101)

El porcentaje de clasificación correcta alcanzado por el modelo de regresión logística puede ser considerado como elevado, ya que éstos son considerados aceptables si predicen de forma correcta al menos el 75% de los casos. (204)

Entre las variables introducidas al modelo por resultar significativas en el análisis bivariado y que no quedaron incluidas en la ecuación de regresión se encuentran los antecedentes de DC, la historia de abortos o muertes fetales y los antecedentes familiares de primer grado con algún tipo de DC, todos factores de riesgo genético, con suficiente credibilidad biológica. (21) Su no inclusión en la ecuación pudiera estar en relación con el hecho de que la exposición a factores ambientales tuvo una frecuencia mucho mayor en las madres estudiadas.

De la misma manera, el consumo de cigarrillos, el bajo peso materno, la fiebre en el embarazo y el consumo de antagonistas del AF, todos FR ambientales o nutricionales detectados por el estudio bivariado, no quedaron incluidas en la ecuación de regresión logística. En estas variables, el autor considera que el pequeño número de madres expuestas a uno o varios de estos factores de riesgo, pudiera explicar su no inclusión en la ecuación.

## **2.6 Conclusiones parciales**

1. Existen conglomerados espacio-temporales primarios para determinados defectos congénitos folato-sensibles en Villa Clara, que permiten identificar regiones de mayor riesgo poblacional, novedosos en el contexto de los DC sensibles a la deficiencia materna de AF.

2. La avanzada edad materna, los niveles elevados de Alfafo proteína, el polihidramnios, el periodo intergenésico corto, las madres adolescentes y el sobrepeso materno son los factores que se asocian con mayor riesgo a los DC folato-sensibles en la descendencia en el análisis multivariado, donde el porcentaje de clasificación correcta alcanzado por el modelo, puede considerarse elevado.
3. En el conjunto de defectos congénitos sensibles a la deficiencia materna de ácido fólico una cifra importante de los factores de riesgo coincide con los encontrados para los tipos específicos de defectos congénitos, a la vez que existen especificidades que denotan peculiaridades del desarrollo ontogénico y los mecanismos implicados.

## TABLAS Y FIGURAS DEL CAPÍTULO 2

Tabla 1. Distribución temporal de la prevalencia ajustada según año y tipo de defecto congénito folato sensible. Villa Clara 2013 – 2018.

Años	CCCT		DTN		HLP		GS		SD		Total	
	N	PA	N	PA	N	PA	N	PA	N	PA	N	PA
2013	12	1,50	14	1,75	6	0,75	9	1,13	14	1,75	55	6,89
2014	16	2,02	6	0,76	6	0,76	3	0,38	12	1,52	43	5,45
2015	15	1,90	6	0,76	7	0,88	4	0,50	13	1,64	45	5,67
2016	16	2,16	5	0,67	8	1,08	7	0,94	10	1,35	46	6,21
2017	8	1,08	13	1,77	7	0,95	3	0,41	7	0,95	38	5,16
2018	13	1,71	15	1,99	2	0,27	5	0,66	5	0,66	40	5,31
Total	80	1,73	59	1,28	36	0,78	31	0,67	61	1,32	267	5,79
IC PA	1,09-2,03		0,67-1,99		0,27-1,08		0,38-1,13		0,66-1,75		5,16- 6,89	

CCCT: cardiopatía congénita conotruncal, DTN: defectos del tubo neural, HLP: hendiduras labiopalatinas, GS: gastroquisis, SD: síndrome Down, IC PA: Intervalo de confianza de la prevalencia ajustada. PA: prevalencia ajustada por 1000 nacimientos. Fuente: RECUMAC, RECUPREMAC y base de datos de la investigación.

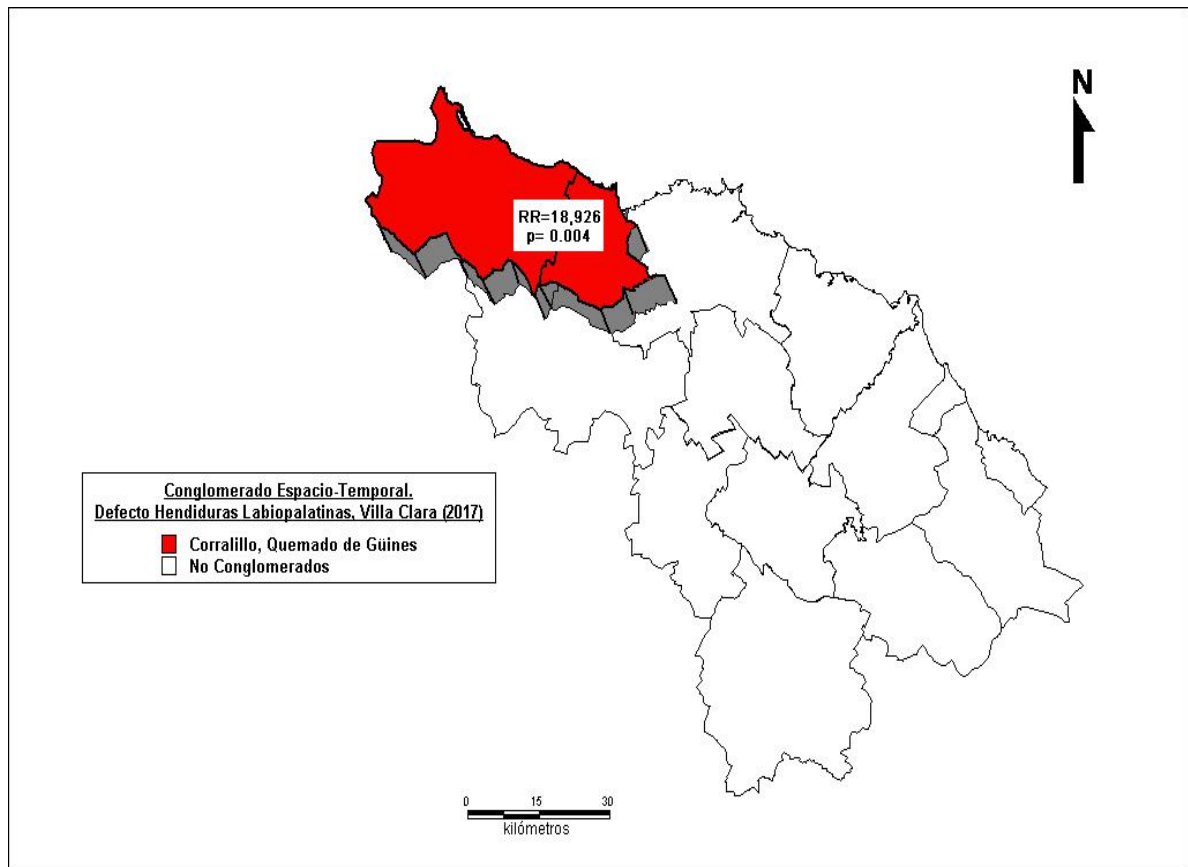


Figura 1. Conglomerado primario espacio-temporal de hendiduras labiopalatinas en el año 2017.

Fuente: Anexo 7

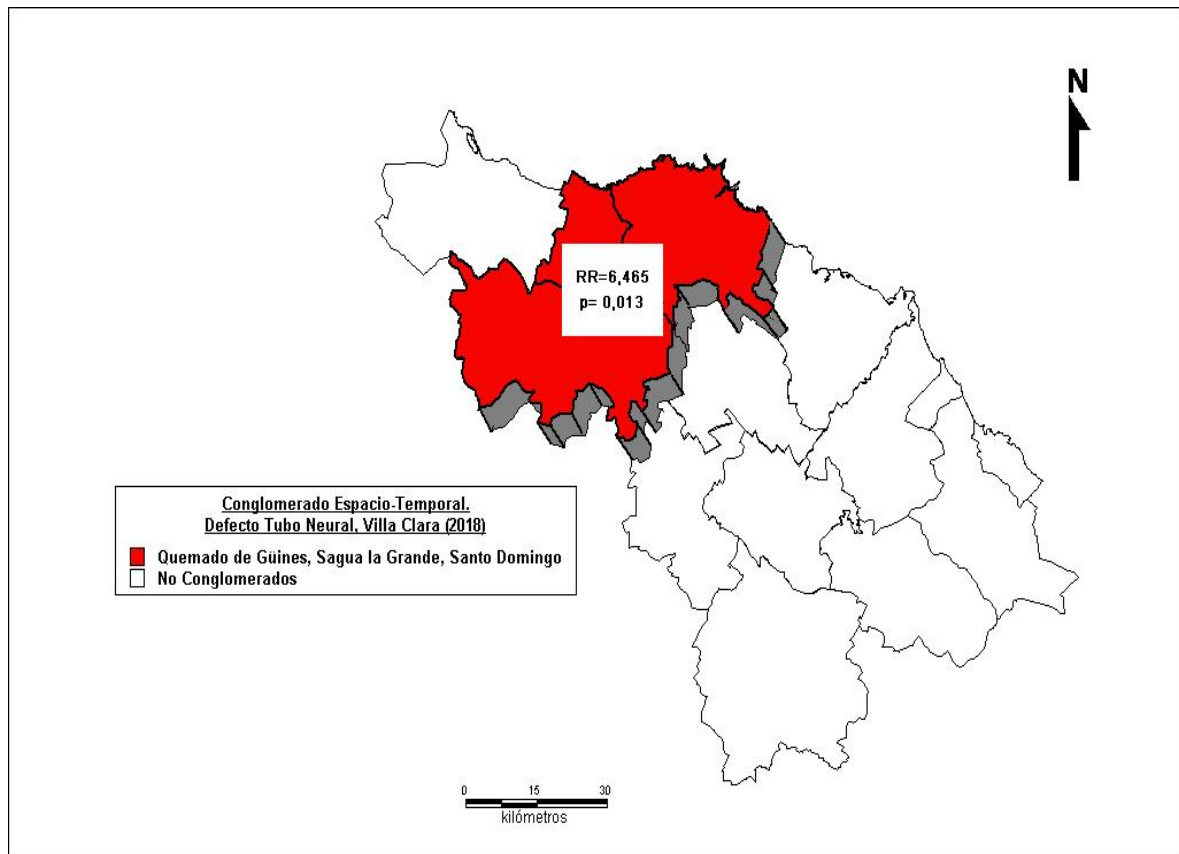


Figura 2. Conglomerado primario espacio-temporal de defectos del tubo neural en el año 2018.

Fuente: Anexo 7

Tabla 2. Factores de riesgos asociados al conjunto de defectos congénitos folato-sensibles. Villa Clara 2013 – 2018.

Factores de riesgo	Casos (n=212)		Controles (n=106)		X <sup>2</sup> de Pearson o TE Fisher		OR		V de Cramer
	N	%	N	%	Valor	Sign.	Valor	CI al 95%	Valor
Consumo medicamentos no habituales	122	57,50	23	21,70	36,61	0,000	4,89	2,86 – 8,36	0,34
Enfermedades crónicas en el embarazo	83	39,20	12	11,30	26,13	0,000	5,04	2,60 – 9,76	0,29
Periodo intergenésico corto	98	46,20	19	17,90	24,34	0,000	3,94	2,24 – 6,93	0,28
No consumo preconcepcional de AF	176	83,30	61	57,50	24,15	0,000	3,61	2,13 – 6,10	0,28
Avanzada edad materna	39	18,40	1	0,90		0,000	23,67	3,20 – 174,9	0,25
Consumo insuficiente de folatos	156	73,60	55	51,90	14,90	0,000	2,58	1,59 – 4,21	0,22
Niveles elevados de AFP	29	13,70	2	1,90		0,001	8,24	1,93 – 35,23	0,19
Sobrepeso u obesidad materna	47	22,22	8	7,50	10,56	0,001	3,49	1,58 -7,69	0,18
Antecedentes de abortos o muertes fetales	31	14,60	3	2,80		0,001	5,88	1,75 – 19,71	0,18
Madre adolescente	47	22,22	8	7,50	10,56	0,001	3,49	1,58 – 7,69	0,18
Antecedentes de consumo de tabletas AC	54	25,50	11	10,40	9,91	0,002	2,95	1,47 – 5,92	0,18
Consumo antagonistas del AF	23	18,80	2	1,90		0,005	6,33	1,46 – 27,37	0,16
APF de DC	28	13,20	5	4,70	5,48	0,019	3,07	1,15 – 8,21	0,13
Bajo peso materno	19	9,00	2	1,90		0,017	5,12	1,17 – 22,41	0,13
Consumo de cigarrillos en el embarazo	23	10,80	4	3,80		0,033	3,10	1,05 – 9,22	0,12
Familiares de I Grado con algún tipo de DC	12	5,70	1	0,90		0,036	6,30	0,81 – 49,12	0,11

AF: ácido fólico, AFP: Alfafofo proteína, APF: antecedentes familiares, DC: defectos congénitos. Fuente: Base de datos de la investigación.



Tabla 3. Factores de riesgo asociados a las cardiopatías congénitas conotruncuales. Villa Clara 2013 – 2018.

Factores de riesgo CCCT	Casos (n=58)		Controles (n=106)		X <sup>2</sup> Pearson o TE Fisher		OR		V de Cramer
	N	%	N	%	Valor	p	Valor	CI al 95%	Valor
Enfermedades crónicas en el embarazo	33	56,90	12	11,30	39,10	0,00	9,64	4,36 – 21,31	0,47
APP de Diabetes pregestacional	6	10,30	0	0,00		0,00			0,26
APP de Hipertensión arterial	7	12,10	1	0,90		0,00	14,41	1,72 - 120,27	0,25
Consumo medicamentos no habituales	39	67,20	24	22,60	31,52	0,00	7,01	3,44 – 14,30	0,44
Consumo de antibióticos	13	22,40	6	5,70	10,27	0,00	4,82	1,72 – 13,48	0,25
Consumo de analgésicos y antiinflamatorios	9	15,50	5	4,70	5,60	0,04	3,71	1,18 – 11,66	0,19
Consumo de esteroides	6	10,30	2	1,90		0,02	6,00	1,17 – 30,76	0,19
Periodo intergenésico corto	30	51,70	19	17,90	20,44	0,00	4,91	2,40 – 10,03	0,35
Consumo deficiente de folatos	50	86,20	61	57,50	14,08	0,00	4,61	1,99 – 10,68	0,29
Sobrepeso u obesidad materna	18	31,00	9	8,50	13,85	0,02	4,85	2,01 – 11,70	0,29
Antecedentes de anemia en el embarazo	10	7,20	2	1,90		0,00	10,83	2,29 – 51,36	0,28
Avanzada edad materna	7	12,10	1	1,90		0,00	14,41	1,73 – 120,3	0,25
APF de DC por vía paterna	7	12,10	2	1,90		0,01	7,14	1,43- 35,59	0,21
Familiares de I Grado con algún tipo de DC	5	8,60	1	0,90		0,02	9,91	1,13 – 86,96	0,20
Antecedentes de abortos o muertes fetales	7	12,10	3	2,80		0,04	4,71	1,17 – 18,99	0,20
Consumo de cigarrillos en el embarazo	8	13,80	4	3,80		0,03	4,08	1,17 – 14,19	0,19
APF de cardiopatías congénitas	7	12,10	3	2,80		0,04	4,70	1,17 – 18,99	0,18
Antecedentes de consumo de tabletas AC	14	24,10	11	10,40	5,49	0,02	2,75	1,16 – 6,54	0,18
No consumo preconcepcional de AF	47	81,00	70	66,00	4,12	0,04	2,20	1,02 – 4,75	0,16

APP: antecedentes patológicos personales, DC: defectos congénitos, APF: antecedentes patológicos familiares, Tabletas AC: tabletas anticonceptivas. AF: ácido fólico. Fuente: Base de datos de la investigación.

Tabla 4. Factores de riesgo asociados a los defectos del tubo neural. Villa Clara 2013 – 2018.

Factores de riesgo DTN	Casos (n=46)		Controles (n=106)		X <sup>2</sup> Pearson o TE Fisher		OR		V de Cramer
	N	%	N	%	Valor	p	Valor	CI 95 %	
APP de enfermedades crónicas	22	47,80	12	11,30	24,62	0,00	7,18	3,12 – 6,53	0,40
Diabetes pregestacional	3	6,50	0	0,00		0,00			0,26
Epilepsia	4	8,70	1	0,90		0,03	10,00	1,09 – 92,10	0,20
Exposición a fuentes de calor	11	23,90	3	2,80		0,00	10,79	2,85 – 40,92	0,34
Consumo de medicamentos no habituales	26	56,50	23	21,70	17,81	0,00	4,69	2,23 – 9,87	0,32
Consumo de antibióticos	14	30,40	6	5,70	17,23	0,00	7,29	2,59 – 20,55	0,34
Consumo de sedantes y sicotrópicos	4	8,70	1	0,90		0,02	10,00	1,09 – 92,10	0,20
Consumo antagonistas del AF	10	21,70	2	1,90		0,00	14,45	3,02 – 69,07	0,34
Consumo de tabletas AC	18	39,10	11	10,40	17,18	0,00	5,55	2,35 – 13,13	0,34
Sobrepeso u obesidad materna	16	34,80	9	8,50	16,14	0,00	5,75	2,31- 14,33	0,33
Presencia de polihidramnios	8	17,40	1			0,00	22,11	2,68 – 182,7	0,32
APP enfermedades agudas en el embarazo	17	37,00	13	12,30	12,35	0,00	4,19	1,82 – 9,65	0,29
Fiebre en el embarazo	9	19,60	3	2,80		0,00	8,35	2,14 – 32,53	0,29
Exposición a productos químicos	13	28,30	8	7,50	11,56	0,00	4,83	1,84 – 12,68	0,28
Niveles elevados de AFP	8	17,40	3	2,80		0,00	7,23	1,82 – 28,68	0,29
APP de abortos o muertes fetales	8	17,40	3	2,80		0,00	7,23	1,82 – 28,68	0,26
Avanzada edad materna	5	10,90	1	1,90		0,01	12,81	1,45 – 112,9	0,23
No consumo preconcepcional de AF	38	82,60	70	66,00	4,28	0,04	2,44	1,03 – 5,78	0,17
Consumo deficiente de folatos	32	69,60	55	51,90	4,10	0,04	2,12	1,02 – 4,42	0,16

AF: ácido fólico, APP: antecedentes patológicos personales, Tabletas AC: tabletas anticonceptivas.

Fuente: Base de datos de la investigación.

Tabla 5. Factores de riesgo asociados a las hendiduras labiopalatinas. Villa Clara 2013 – 2018.

Factores de riesgo HLP	Casos (n=34)		Controles (n=106)		X <sup>2</sup> Pearson o TE Fisher		OR		V de Cramer
	N	%	N	%	Valor	p	Valor	IC 95 %	
Consumo de medicamentos no habituales	22	64,70	23	21,70	21,83	0,00	6,62	2,85 – 15,35	0,40
Consumo de analgésicos y antiinflamatorios	10	29,40	5	4,70		0,00	8,42	2,63 – 2,91	0,34
Consumo de sedantes y sicotrópicos	4	11,80	1	0,90		0,00	14,00	1,51 – 130,01	0,25
APF de hendiduras labio-palatinas	6	17,60	1	0,90	15,12	0,00	22,50	1,60 – 194,64	0,33
APF de DC	9	26,50	5	4,70	13,54	0,00	7,27	2,24 – 23,1	0,31
APF de DC por línea paterna	6	17,60	2	1,90		0,00	11,14	2,13 – 58,24	0,29
Fumadora pasiva en el embarazo	7	20,60	4	3,80		0,00	6,61	1,80 – 24,25	0,27
Periodo intergenésico corto	15	44,10	19	17,90	9,61	0,01	3,62	1,56 – 8,37	0,26
Gestantes menores de 20 años	9	26,50	8	7,50	8,64	0,00	4,41	1,55 – 12,59	0,25
Consumo deficiente de folatos	27	79,90	55	51,90	8,04	0,01	3,58	1,43 – 8,93	0,24
APP de enfermedades crónicas	12	35,50	16	15,10	6,57	0,01	3,07	1,27 – 7,41	0,22
Epilepsia	3	8,80	1	0,90					
APF de DC en familiares de I Grado	3	8,80	1	0,90		0,04	10,16	1,02 – 101,18	0,20
Avanzada edad materna	3	8,80	1	0,90		0,04	10,16	1,02 – 101,18	0,20
Sobrepeso u obesidad materna	8	23,50	9	8,50	5,46	0,03	3,32	1,17 – 9,40	0,20

DC: defectos congénitos, APP: antecedentes patológicos personales, APF: antecedentes patológicos familiares.

Fuente: Base de datos de la investigación.

Tabla 6. Factores de riesgo asociados a la gastrosquisis. Villa Clara 2013 – 2018.

Factores de riesgo GS	Casos (n=30)		Controles (n=106)		X <sup>2</sup> Pearson o TE Fisher		OR		V de Cramer
	N	%	N	%	Valor	p	Valor	IC 95 %	Sig.
Niveles elevados de AFP	16	53,30	3	2,80		0,00	39,24	10,14 – 151,91	0,36
Enfermedades agudas en la gestación	21	70,00	13	12,30	41,57	0,00	16,69	6,31 – 44,16	0,55
Sepsis urinaria	7	23,30	2	1,90		0,00	15,83	3,09 – 81,19	0,36
Síndrome de sepsis vaginal	7	23,30	6	5,70	8,45	0,00	5,07	1,56 – 16,52	0,25
Edad materna menor de 20 años	16	53,30	8	7,50	33,73	0,00	14,00	5,07 – 38,70	0,50
Estado nutricional bajo peso	8	26,70	2	1,90		0,00	18,91	3,76 – 92,50	0,39
Consumo de tabletas anticonceptivas	14	46,70	11	10,40	20,52	0,00	7,56	2,92 – 19,96	0,39
Ingestión de bebidas alcohólicas	10	33,30	5	4,70		0,00	10,10	3,12 – 32,73	0,38
Consumo de cigarrillos en el embarazo	9	30,00	4	3,80	18,60	0,00	10,93	3,08 – 38,84	0,37
Consumo de medicamentos no habituales	19	63,30	23	21,70	18,99	0,00	6,23	2,60 – 14,95	0,37
Consumo de analgésicos y antiinflamatorios	6	20,00	5	4,70		0,01	5,05	1,42 – 17,94	0,23
Amenaza de aborto	8	26,70	3	2,80		0,00	12,49	3,07 – 50,86	0,37
Fumadora pasiva en el embarazo	8	26,70	3	2,80		0,00	12,49	3,07 – 50,86	0,36
Exposición a productos químicos	11	36,70	8	7,50	16,50	0,00	7,09	2,52 – 19,96	0,35
Nuliparidad	22	73,30	39	36,80	12,62	0,00	4,72	1,92 – 1,62	0,31
Periodo intergenésico corto	14	46,70	19	17,90	10,51	0,00	4,01	1,68 – 9,59	0,29

AFP: Alfafofo protefina. Fuente: Base de datos de la investigafión.

Tabla 7. Factores de riesgo asociados al síndrome Down. Villa Clara 2013 – 2018.

Factores de riesgo SD	Casos (n=44)		Controles (n=106)		X <sup>2</sup> Pearson o TE Fisher		OR		V de Cramer
	N	%	N	%	Valor	p	Valor	IC 95 %	
Avanzada edad materna	24	54,50	1	0,90		0,00	126,00	16,11 – 985,37	0,66
Antecedentes de abortos o muertes fetales	13	29,50	3	2,80		0,00	14,40	3,85 – 53,79	0,37
Periodo intergenésico corto	24	54,50	19	17,90	20,39	0,00	5,50	2,53 – 11,92	0,37
Consumo medicamentos no habituales	25	56,80	23	21,70	17,63	0,00	4,75	2,23 – 10,10	0,34
Consumo de sedantes y sicotrópicos	8	18,20	1	0,90		0,00	23,33	2,82 – 193,05	0,33
Consumo de antihistamínicos	8	18,20	2	1,90		0,00	11,56	2,34 – 59,96	0,30
No consumo preconcepcional de AF	39	88,60	70	66,00	7,99	0,01	4,01	1,46 -11,06	0,23
Niveles bajos de AFP	11	25,00	9	8,50	7,33	0,02	3,59	1,37 – 9,43	0,22
Consumo deficiente de folatos	31	70,50	55	51,90	4,38	0,04	2,21	1,04 – 4,69	0,17

AF: ácido fólico, AFP: Alfafofo proteína. Fuente: Base de datos de la investigación.

Tabla 8. Edades medias de las madres de casos con defectos congénitos folato-sensibles y controles. Villa Clara 2013 – 2018.

Tipo DC	Edad media	DS	Rango		Prueba T	
			Mínimo	Máximo	Valor	Sig.
CCCT	26,19	6,95	15	52	-0,656	0,100
DTN	26,91	5,86	15	38	-0,818	0,414
HLP	25,82	5,70	17	39	-1,912	0,058
GS	21,37	3,65	16	31	-7,063	0,000
SD	33,52	7,60	18	45	5,879	0,000
Conjunto DC	27,13	7,18	15	52	-0,687	0,493
Controles	27,65	4,48	18	37		

CCCT: cardiopatía congénita conotruncal, DTN: defectos del tubo neural, HLP: hendiduras labiopalatinas, GS: gastroquiasis, SD: síndrome Down. Fuente: Base de datos de la investigación.

## **CAPÍTULO 3 ESTUDIO DE LA SEGMENTACIÓN NEUTROFÍLICA, NIVELES SÉRICOS DE OLIGOELEMENTOS Y HOMOCISTEÍNA EN MADRES CON DESCENDENCIA AFECTADA POR DEFECTOS CONGÉNITOS FOLATO-SENSIBLES.**

### **3.1 Introducción**

Existen bioelementos que, aunque en cantidades muy pequeñas en el organismo, son nutrientes esenciales. Conocidos como oligoelementos o micronutrientes, realizan funciones indispensables para el mantenimiento de la vida, el crecimiento y desarrollo embrionario y en la regulación epigenética del programa de desarrollo embrionario, por lo que su deficiencia, además de importantes consecuencias hematológicas, se relacionan con la aparición de diferentes DC de elevada frecuencia en humanos. (1)

### **3.2 Objetivos**

En este capítulo, para dar salida al tercer objetivo de la investigación, referido a determinar la asociación entre variables epigenéticas reflejo de deficiencias nutricionales en madres con hijos con DC folato-sensibles; se plantearon como objetivos, identificar la presencia de hipersegmentación neutrofílica en dichas madres y determinar si las concentraciones maternas de algunos oligoelementos y homocisteína constituyen factores de riesgo biológicos en la aparición de estos DC en la descendencia.

### **3.3 Material y Métodos**

#### **3.3.1 Definición de la muestra de estudio**

Para los análisis de la segmentación neutrofílica y la determinación de los niveles séricos de oligoelementos la muestra de 318 madres se dividió en 106 madres de casos incidentes e igual cantidad de madres de casos prevalentes y de controles. De igual forma, para el análisis de las concentraciones homocisteína se consideraron estos mismos tres grupos para la muestra de 100 madres estudiadas, como se muestra en el diagrama de la investigación. (Anexo 1).

#### **3.3.2 Métodos de recolección del dato primario para el estudio de variables analíticas**

Los resultados de todas las determinaciones analíticas también se plasmaron en el cuestionario confeccionado y en la base de datos creada al efecto, ya referida en el capítulo 2.

### 3.3.3 Obtención de las muestras de estudio de parámetros analíticos

A la totalidad de las 318 madres se les tomó una muestra de sangre capilar, previo consentimiento informado. A las madres de los casos incidentes se les realizó la extracción en el momento en que se diagnosticó el DC y como máximo tres meses posteriores.

A madres de los casos prevalentes se les realizó la extracción según se fueron incorporando al estudio, pudiendo haber transcurrido entre uno y tres años entre el momento en que se realizó el diagnóstico y se tomó la muestra. Este periodo de tiempo transcurrido fue utilizado como control interno, en el cual el componente genético, dado por el mismo tipo de DC y otras variables no modificables, permanecía constante y variaba el componente ambiental, dado por las condiciones nutricionales de la mujer en el momento de la extracción.

La variable periodo de tiempo transcurrido, fue controlada mediante el procesamiento de los resultados según año en que se realizó el diagnóstico. Además, los análisis de estas variables se realizaron por separado para casos incidentes y prevalentes y se compararon entre ellos.

A las madres de los controles se les realizó la extracción según se fueron incorporando al estudio y se les realizó durante el primer mes después del parto, con un máximo de tres meses.

### 3.3.4 Estudio de la segmentación nuclear de neutrófilos

Se realizó una extensión sanguínea en dos láminas portaobjetos, se fijaron con etanol y se tiñeron con Giemsa, para realizar un análisis morfológico de la celularidad de la serie blanca en frotis en sangre periférica realizado con un microscopio óptico con lente de inmersión (100 x).

Se contó el número de neutrófilos segmentados en 100 células y se determinó la desviación a la derecha, por tener un número mayor de lóbulos en su núcleo que supera los siguientes valores normales: a) 2 lóbulos 30-35%; b) 3 lóbulos 40-50%; c) 4 lóbulos 15-20%; d) 5 lóbulos 0,5-2%; e) 6 lóbulos 0%. (205) (206)

De acuerdo a los hallazgos morfológicos del frotis sanguíneo se conformaron tres grupos:

Grupo I: casos con segmentación normal (hasta un 35% de neutrófilos con 2 lóbulos, hasta un 50% con 3 lóbulos, hasta un 20% con 4 lóbulos, hasta un 2% con 5 lóbulos y no presencia de segmentados con 6 lóbulos).

Grupo II: casos con hipersegmentación nuclear de neutrófilos con más de 2% con 5 lóbulos.

Grupo III: casos con hipersegmentación con al menos un neutrófilo segmentado con 6 lóbulos. (Anexo 1)

El análisis del frotis de sangre periférica se realizó a ciegas por el investigador (previo entrenamiento en el Laboratorio de Hematología Especial del Hospital Pediátrico José Luis Miranda) en el Laboratorio de Epidemiología Genética de la Unidad de Investigaciones Biomédicas (UNIB) de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara y por una Licenciada en Laboratorio Clínico con experiencia asistencial e investigativa. Todos los casos se confirmaron en el Laboratorio de Hematología Especial del Hospital Pediátrico Universitario “José L. Miranda” de Villa Clara.

### **3.3.5 Determinación de las concentraciones séricas de cinc, cobre, magnesio, hierro y calcio**

A la totalidad de las 318 madres se les extrajo 10 ml de sangre venosa, tras ayuno nocturno de más de seis horas, de ellos cinco ml se almacenaron en tubos estériles que fueron colocados a temperaturas entre 2 y 6°C inmediatamente después de la flebotomía hasta su centrifugación a 3500 rpm, luego se transfirieron 500 µl de suero a tubos estériles de polipropileno los que se conservaron a -20°C hasta su traslado al Laboratorio de Espectrofotometría de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas para la determinación sérica de cinco oligoelementos, mediante la técnica de espectrofotometría de absorción atómica. El traslado de las muestras sanguíneas se realizó en termos refrigerados.

Para la determinación de los oligoelementos se utilizó una solución de Tritón x-100 al 0,003%. Para cada elemento se utilizó una curva patrón; se realizaron tres lecturas por cada muestra y se tomó la media de esos valores. El Zn fue medido a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 213,9 nanómetros (nm), el Cu a 324,8 nm, el Ca a 422, 7 nm, el Mg a 285,2 nm y el Fe a 248,3 nm; según los procedimientos normalizados de operación establecidos por la firma Pye Unicam. (59)

### **3.3.6 Determinación de las concentraciones de Homocisteína**

La totalidad de las 318 muestras sanguíneas tomadas a las madres participantes en el estudio se trasladaron a los laboratorios y una vez allí, el analista fue seleccionando a ciegas cada una de las muestras, una vez que se definió que no se podían estudiar todas, hasta completar las 100 muestras factibles de estudiar.

Con el ánimo de garantizar la validez interna de los resultados las muestras fueron trasladadas a los laboratorios de análisis separadas en tres grupos: casos incidentes, casos prevalentes y controles, identificado cada grupo solo por una letra y cada muestra identificada con un número. Este procedimiento garantizó dos aspectos que introdujeron un componente aleatorio en el



muestreo, primero, la selección a ciegas, sin datos y sin conocimiento del analista y segundo, que todas las muestras tuvieron la misma probabilidad de ser escogidas.

De las muestras sanguíneas obtenidas se transfirieron 5 ml de sangre a tubos estériles de polipropileno 200  $\mu$ L de EDTA como anticoagulante, el plasma fue separado por centrifugación a 35 000 rpm y almacenados a  $-20^{\circ}$  C hasta su análisis en el Laboratorio de Bioquímica del Centro Nacional de Genética Médica, mediante la técnica de Cromatografía líquida de alta resolución o en el laboratorio clínico del Hospital Gineco Obstétrico “Mariana Grajales” mediante métodos colorimétricos. El intervalo de referencia de Hcis para personas adultas cubanas fue establecido por Concepción (86) y fue de 3,82-17,19  $\mu$ mol/L.

### 3.3.7 Variables analíticas incluidas en el estudio

- Segmentación neutrofílica: Referida al número de lobulaciones nucleares de neutrófilos. Valores finales: Segmentación normal (Grupo I), hipersegmentación neutrofílica (Grupo II: presencia de neutrófilos con cinco lobulaciones en más del 2% de los segmentados) y Grupo III: presencia de al menos un neutrófilo con más de seis lóbulos. (205)

- Concentraciones séricas de Zinc: Referida a los valores resultantes de la cuantificación en suero de este oligoelemento por métodos espectrofotométricos. Valores finales: deficiencia de Zn o niveles bajos, niveles normales y niveles elevados. Deficiencia de Zn o hipocincemia (concentraciones séricas por debajo de los valores considerados normales (7,7  $\mu$ mol/L) y niveles elevados de Zn (concentraciones séricas por encima de los valores considerados normales (23,0  $\mu$ mol/L). (59) (207)

- Concentraciones séricas de Cobre: Referida a los valores resultantes de la cuantificación en suero de este oligoelemento por métodos espectrofotométricos. Valores finales: deficiencia de Cu o niveles bajos, niveles normales y niveles elevados. Deficiencia de Cu (concentraciones séricas por debajo de los valores considerados normales (11,0  $\mu$ mol/L) y niveles elevados de Cu o hipercupremia (concentraciones séricas por encima de los valores considerados normales (24,0  $\mu$ mol/L). (59) (207)

- Concentraciones séricas de Calcio: Referida a los valores resultantes de la cuantificación en suero de este oligoelemento por métodos espectrofotométricos. Valores finales: deficiencia de Ca o niveles bajos, niveles normales y niveles elevados. Deficiencia de Ca (concentraciones séricas por debajo de los valores considerados normales (2,02  $\mu$ mol/L) y niveles elevados de Ca (concentraciones séricas por encima de los valores considerados normales (2,60  $\mu$ mol/L). (59) (207)

- Concentraciones séricas de Magnesio: Referida a los valores resultantes de la cuantificación en suero de este oligoelemento por métodos espectrofotométricos. Valores finales: deficiencia de Mg o niveles bajos, niveles normales y niveles elevados. Deficiencia de Mg (concentraciones séricas por debajo de los valores considerados normales ( $1,9 \mu\text{mol/L}$ ) y niveles elevados de Mg (concentraciones séricas por encima de los valores considerados normales ( $2,60 \mu\text{mol/L}$ ). (59) (207)

- Concentraciones séricas de Hierro: Referida a los valores resultantes de la cuantificación en suero de este oligoelemento por métodos espectrofotométricos. Valores finales: deficiencia de Fe o niveles bajos, niveles normales y niveles elevados. Deficiencia de Fe (concentraciones séricas por debajo de los valores considerados normales ( $4,0 \mu\text{mol/L}$ ) y niveles elevados de Fe (concentraciones séricas por encima de los valores considerados normales ( $30,0 \mu\text{mol/L}$ ). (59) (207)

- Niveles sanguíneos de homocisteína: Referida a los valores resultantes de la cuantificación sérica o plasmática de Hcis. Valores finales: deficiencia de Hcis o niveles bajos, niveles normales, niveles de riesgo y niveles elevados (hiperhomocisteinemia). Niveles normales:  $3,82-17,19 \mu\text{mol/L}$ . Niveles de riesgo: concentraciones entre  $15,00 \mu\text{mol/L}$  (11) y  $17,19 \mu\text{mol/L}$  e hiperhomocisteinemia: concentraciones sanguíneas mayores o iguales a  $17,19 \mu\text{mol/L}$ . (86)

### **3.3.8 Técnicas estadísticas empleadas para contrastar los resultados del estudio de la segmentación neutrofílica, los niveles séricos de Zn, Cu, Ca, Mg, Fe y Homocisteína**

Para la descripción de las variables estudiadas se realizaron análisis de distribución de frecuencias, donde se emplearon estadígrafos de asimetría y curtosis para caracterizar la forma de las distribuciones, así como las pruebas no paramétricas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks para verificar la normalidad de la distribución de los datos.

Se usaron estadígrafos de frecuencias para variables cualitativas (porcentaje, razón y tasas) y estadígrafos descriptivos de tendencia central (media aritmética, mediana) y de dispersión (rango y desviación estándar) para las variables cuantitativas.

En las variables cuantitativas en las que se verificó la distribución normal de los datos se utilizó el test Student para grupos independientes y cuando no existió distribución normal se utilizaron pruebas no paramétricas, como el test de U de Mann-Whitney o el Kruskal Wallis, en dependencia de la cantidad de grupos a comparar. se realizaron comparaciones entre los casos

incidentes y controles, entre casos incidentes y prevalentes, y entre casos prevalentes contra controles,

Para evaluar los resultados de la segmentación neutrofílica, de las concentraciones maternas de oligoelementos y Hcis, como variables de riesgo, se realizaron análisis de asociación bivariados clásicos y se compararon los resultados de las madres de los casos con las de los controles y las de casos prevalentes e incidentes contra controles, por separado. Se determinó la significación, OR e IC al 95% con la metodología descrita para las variables epidemiológicas.

Como factores de riesgo se consideraron la presencia de hipersegmentación neutrofílica, los valores bajos de oligoelementos, excepto para el cobre que fueron los valores elevados y en el caso de la Hcis, fueron los niveles de riesgo y la hiperhomocisteinemia. Se efectuó un análisis multivariado, mediante regresión logística binaria por el método condicional, en el que se incluyeron las 318 madres participantes en el estudio y un total de 25 variables (a las 17 variables clínico-epidemiológicas consideradas en el análisis realizado en el capítulo 2, se añadieron la presencia de hipersegmentación neutrofílica y siete variables relacionadas con las concentraciones de micronutrientes y las deficiencias de estos).

Además, las 100 madres a las que se les realizó la determinación de los niveles de Hcis fueron incluidas en un modelo multivariado de regresión logística binaria y procesada por el mismo método, para un total de 27 variables. A las 25 variables epidemiológicas se añadieron la presencia de niveles elevados o de riesgo para la Hcis.

### 3.4 Resultados

#### 3.4.1 Resultados del estudio de segmentación neutrofílica en lámina periférica

Del total de 636 láminas periféricas estudiadas (dos por cada madre de casos incidentes, casos prevalentes y controles), el 92,14% tuvo niveles normales de segmentación nuclear de neutrófilos. Se detectó hipersegmentación neutrofílica en 25 madres de casos y controles, de ellos 15 madres de casos incidentes (60,0%), cuatro en madres de casos prevalentes y seis de controles, distribución que no resultó homogénea ( $p=0,021$ ). No se observaron diferencias significativas al comparar la presencia de hipersegmentación neutrofílica entre las madres de los casos incidentes y prevalentes de conjunto, respecto a las madres del grupo control. (Tabla 1).

En el Anexo 2 se muestra el análisis de la hipersegmentación neutrofílica en las madres de casos prevalentes al considerar diferentes aspectos. Cuando se tuvo en cuenta el año de la

gestación, se encontró una distribución homogénea ( $p=0,326$ ). Los cuatro casos con hipersegmentación se distribuyeron por igual entre 2014 y 2015. No hubo casos con hipersegmentación entre las madres cuyos hijos se diagnosticaron con el año 2013.

Cuando se evaluó la presencia de hipersegmentación con el consumo deficiente de folato en el momento de la toma de la muestra, referido por estas madres, no se encontraron diferencias significativas ( $p= 0,914$ ).

En el análisis de la posible influencia del consumo deficiente de folato, en las madres de los casos prevalentes, entre el momento del diagnóstico del DC en la descendencia y el momento de la extracción de la muestra para estudio, no mostró diferencias ( $p= 0,550$ ).

Cuando la presencia de hipersegmentación neutrofílica se comparó, como un factor de riesgo para dos grupos, se constataron diferencias significativas entre las madres de los casos incidentes y las de los controles ( $p= 0,033$ ) y entre las madres de los casos incidentes y las de los casos prevalentes ( $p=0,010$ ), como se observa en la Tabla 2.

En la Tabla 3 se aprecia que la presencia de hipersegmentación (grupo II) en las madres de los casos incidentes fue tres veces superior respecto a las de los casos prevalentes (9,4% y 2,8%, respectivamente) ( $p= 0,050$ ), similar comportamiento al grupo III (4,7 y 0,9 %). Cuando se analizaron de conjunto los grupos II y III, las diferencias entre las madres de casos incidentes y prevalentes fueron significativas ( $p= 0,008$ ).

La presencia de hipersegmentación entre las madres de casos incidentes respecto a los controles, mostraron diferencias significativas en los grupos III y en ambos de conjunto ( $p=0,029$  y  $p= 0,041$ , respectivamente). Mientras que, la presencia de hipersegmentación (grupos II y III y en su conjunto), entre los casos prevalentes y controles no fueron significativas. (Tabla 3).

Al evaluar la presencia de hipersegmentación neutrofílica en los grupos de DC específicos se encontró que el mayor porcentaje correspondió a las madres de los casos con DTN con 13,0%, seguido de las HLP con 11,8%, y las CCCT con 10,3%. Aunque en todos los casos, excepto en las GS, la frecuencia de hipersegmentación fue superior en las madres de los casos (prevalentes + incidentes) que en las de los controles, no se constató significación asociada a ninguno de los DC folato-sensibles. (Anexo 3).

En el Anexo 4 se presenta la distribución de la segmentación entre las madres de casos incidentes, prevalentes y controles, por separado, para cada uno de los DC estudiados. La

distribución de la hipersegmentación (grupos II y III), no resultó homogénea en los DTN ( $p=0,027$ ), con mayor frecuencia de hipersegmentación en las madres de los casos incidentes (21,7%).

Los resultados del análisis de la comparación de la frecuencia de hipersegmentación para cada uno de los tipos de DC folato-sensibles estudiados, realizada entre las madres de los casos incidentes y prevalentes, entre las madres de casos incidentes respecto a controles y entre las madres de casos prevalentes y controles se muestra en el Anexo 5. Para los DTN las diferencias resultaron significativas entre las madres de los casos incidentes y los controles ( $p=0,026$ ). Las comparaciones en estos mismos grupos no resultaron significativas en las HLP ( $p=0,109$ ), ni en el SD ( $p=0,634$ ). No se realizaron análisis en las GS, no se constató hipersegmentación neutrofílica entre dichas madres.

Las restantes comparaciones efectuadas no mostraron diferencias significativas para ninguno de los defectos.

La frecuencia de hipersegmentación (grupos II y III de conjunto), en los cinco tipos de DC (madres de casos prevalentes e incidentes de conjunto) y los controles (Tabla 4), identificó la mayor frecuencia entre las madres de los casos con DTN (13,04%). No se apreciaron diferencias en la distribución entre los diferentes tipos de DC específicos, ni en el conjunto de DC.

#### **3.4.2 Resultados de las concentraciones séricas de oligoelementos**

En la tabla 5 se observan las concentraciones séricas de los cinco oligoelementos estudiados. La mediana de las concentraciones séricas de Zn en las madres de los casos incidentes fue de  $9,91 \mu\text{mol/L}$  ( $\pm 2,51$ ), de  $11,79 \mu\text{mol/L}$  ( $\pm 1,80$ ) en las de los casos prevalentes y en las del grupo control fue de  $11,95 \mu\text{mol/L}$  ( $\pm 1,86$ ). La mediana de las concentraciones de Cu fueron de  $20,56 \mu\text{mol/L}$  ( $\pm 6,52$ ) en las madres de los casos incidentes, de  $15,84 \mu\text{mol/L}$  ( $\pm 4,50$ ) en las madres de los casos prevalentes y de  $15,52 \mu\text{mol/L}$  ( $\pm 4,71$ ) en las de los controles. Las distribuciones de los niveles séricos entre las madres de los casos incidentes, prevalentes y controles, para los cinco oligoelementos analizados, no fueron homogéneas. (Ver figura 1) En la propia Tabla 5 se observa que la comparación entre las distribuciones de las concentraciones séricas de oligoelementos en el conjunto de madres de los casos prevalentes e incidentes, respecto a las concentraciones en las madres de los controles resultaron no homogéneas, excepto para los niveles de Ca ( $p=0,317$ ).

En el Anexo 6 se muestran las comparaciones de los valores de la mediana de las concentraciones séricas de los cinco oligoelementos entre las madres de los diferentes grupos de estudio y las madres controles. Al comparar las concentraciones entre las madres de los casos incidentes respecto a las de los prevalentes, y entre las madres de los casos incidentes con las de los controles se constataron diferencias significativas para todos los oligoelementos, excepto el Ca. La comparación entre las madres de casos prevalentes respecto a madres controles, no resultó significativa para ninguno de los oligoelementos.

Al comparar las concentraciones séricas de oligoelementos en las madres de los casos prevalentes, según el año de diagnóstico del DC en su descendencia, la distribución de los niveles séricos de los oligoelementos estudiados fue similar. (Anexo 7).

#### 3.4.2.1 Resultados de la determinación de las concentraciones séricas de oligoelementos según grupo de defectos congénitos

En el Anexo 8 se muestra la distribución de las concentraciones séricas de oligoelementos en las madres de los casos (incidentes más prevalentes) con los diferentes tipos de DC. En las madres de productos con CCCT las concentraciones séricas de Zn y Fe resultaron significativamente menores que las concentraciones maternas en los controles. ( $p=0,000$ ), mientras que las concentraciones séricas de Cu se diferenciaron significativamente entre ambos grupos, con las mayores concentraciones identificadas entre las madres de los casos ( $18,33 \pm 6,36 \mu\text{moL/l}$ ).

En las madres con descendencia afectada por DTN las concentraciones de Zn, y Fe fueron significativamente más bajas que las concentraciones maternas en los controles. ( $p=0,008$  y  $p=0,001$ ) mientras que las concentraciones de Cu fueron significativamente más elevadas en el grupo de madres de los casos ( $p=0,000$ ).

En las madres de casos con HLP las concentraciones séricas de Zn, Mg y Fe fueron significativamente más bajas que las concentraciones de las madres de los controles.

Las concentraciones séricas maternas en la GS y el SD no tuvieron diferencias en ninguno de los cinco oligoelementos estudiados respecto a las madres de los controles. (Ver Figura 2)

#### 3.4.2.2 Alteraciones en las concentraciones maternas de oligoelementos como factor de riesgo para el conjunto de los DC y por grupos específicos

En la Tabla 6 se muestra que en el conjunto de DC folato-sensibles, los riesgos por deficiencia materna de Zn, Mg y Fe fueron significativos, al igual que el riesgo asociado a los niveles

elevados de Cu. No se presentó riesgo asociado a la deficiencia materna de Ca. Los valores de los OR se pueden apreciar en la tabla. El mayor riesgo se encontró para la deficiencia múltiple de oligoelementos [OR: 9,24 (2,17- 39,63)].

El Anexo 9 presenta las alteraciones de las concentraciones séricas maternas como factores de riesgo para la aparición de DC folato-sensibles en su descendencia por tipos específicos. Se constató que la hipocincinemia constituyó un factor de riesgo para todos los tipos de DC, excepto la GS. El mayor riesgo se obtuvo en las CCCT [OR: 6,91 (2,54- 18,77)], el resto de los resultados pueden observarse en el referido Anexo. La hipercupremia materna se asoció significativamente con las CCCT [OR: 3,54 (1,37- 9,14)] y los DTN [OR: 5,36 (2,06- 13,94)]. La hipomagnesemia materna, por su parte, constituyó un factor de riesgo para la aparición de DTN y HLP en su descendencia, con el mayor riesgo para este último DC [OR: 10,32 (3,52- 30,25)], mientras que las bajas concentraciones séricas maternas de Fe se asociaron significativamente con la presencia de CCCT y DTN. La deficiencia de dos o más oligoelementos constituyó un factor de riesgo asociado significativamente con la aparición de todos los DC estudiados, excepto para la GS. Los riesgos asociados a esta deficiencia múltiple fueron: para las CCCT (OR: 12,17), DTN (OR: 12,65), HLP (OR: 11,14) y SD (OR: 6,68).

#### **3.4.3 Análisis conjunto de variables epidemiológicas, la hipersegmentación neutrofílica y las concentraciones séricas maternas de oligoelementos como factores de riesgo para DC folato-sensibles en la descendencia**

Al evaluar el efecto conjunto de las variables epidemiológicas y analíticas estudiadas se encontró en un primer análisis multivariado con 25 variables, que el porcentaje global de clasificación correcta fue de 85,8%, 89,2% en los casos y 79,2% en los controles. Las 13 variables incluidas en la ecuación, todas significativas, fueron los antecedentes personales de enfermedades crónicas, periodo intergenésico corto, consumo de tabletas anticonceptivas, niveles elevados de AFP, polihidramnios, sobre peso u obesidad materna, consumo deficiente de folatos, consumo de antagonistas del AF, avanzada edad materna, madre adolescente, no consumo preconcepcional de AF, niveles elevados de Cu y deficiencia múltiple de micronutrientes. (Anexo 10).

#### **3.4.4 Resultados de la determinación de Homocisteína**

En la Tabla 7 se aprecia que la distribución de las concentraciones de Hcis entre madres de casos incidentes, prevalentes y controles no resultó homogénea y que, del mismo modo, cuando

se comparó la distribución de los valores de la mediana de estas concentraciones en las madres de todos los casos unidos respecto a los controles, tampoco fueron homogéneas (10,56  $\mu\text{mol/L}$  y 5,34  $\mu\text{mol/L}$ ,  $p=0,000$ ). (Ver Figura 3).

En el Anexo 11 se observaron diferencias significativas al realizar las comparaciones entre los valores de la mediana de las concentraciones de Hcis entre las madres de los casos incidentes respecto a las madres de los controles ( $p=0,000$ ), madres de casos prevalentes respecto a controles ( $p=0,009$ ) y también entre las madres de casos incidentes respecto a las de los casos prevalentes ( $p=0,023$ ).

Los niveles más elevados en los casos prevalentes se constataron en aquellas mujeres con año de diagnóstico del DC en 2015 (11,28  $\mu\text{mol/L}$ ), aunque la distribución resultó homogénea entre los años ( $p=0,233$ ). (Figura 3).

#### 3.4.4.1 Resultados de la determinación de Homocisteína según tipo de DC.

En la Tabla 8 se observa que los valores de las medianas de las concentraciones de Hcis fueron más elevados en las madres de productos con HPLNS (12,74  $\mu\text{mol/L}$ ), no obstante, existieron diferencias que resultaron significativas respecto a los niveles encontrados en las madres de los controles en todos los tipos de DC, con excepción de la GS ( $p=0,331$ ). (Ver Figura 3).

#### 3.4.4.2 La hiperhomocisteinemia como factor de riesgo para el conjunto de los DC folato-sensibles y según grupo de defectos congénitos

En la Tabla 9, se muestra el análisis de la hiperhomocisteinemia como factor de riesgo. Cuando se analizó para el conjunto de los DC folato-sensibles el OR fue de 10,76 (1,31- 88,47). En el análisis para los DC específicos, se puede observar que la hiperhomocisteinemia constituyó un factor de riesgo para los DTN (OR: 12,25) y para las HLP (OR:19,60).

#### 3.4.4.3 Relación entre la presencia de hiperhomocisteinemia y la hipersegmentación neutrofilica

En la Tabla 10 se muestra la relación entre los marcadores indirectos de la deficiencia de AF: el marcador bioquímico y el hematológico, donde se observa que la Hiperhomocisteinemia tuvo una asociación altamente significativamente con la presencia de hipersegmentación neutrofilica en la lámina periférica.

En los casos con hiperhomocisteinemia hubo 60% de hipersegmentación neutrofilica, que solo estuvo presente en el 6,7% de los casos con Hcis normal.



### **3.4.5 Análisis conjunto de las variables epidemiológicas, hipersegmentación neutrofílica, concentraciones séricas maternas de oligoelementos y de homocisteína como factores de riesgo para DC folato-sensibles en la descendencia**

En el Anexo 12 se presentan los resultados del análisis multivariado donde se incluyeron además de las variables epidemiológicas, la hipersegmentación nuclear de neutrófilos, los niveles alterados de oligoelementos y las variables derivadas de los niveles de riesgo de Hcis y la hiperhomocisteinemia. El porcentaje global de clasificación correcta fue de 91,0%, 94,0% en los casos y 88,0% en los controles. De las nueve variables incluidas en la ecuación, en siete se observó significación estadística, estas fueron: periodo intergenésico corto, antecedentes de abortos espontáneos, consumo deficiente de folatos, avanzada edad materna, madre adolescente, niveles bajos de Zn y umbral de riesgo para la Hcis.

## **3.5 Discusión de los resultados**

### **3.5.1 Segmentación nuclear de neutrófilos en lámina periférica**

La distribución no homogénea de la hipersegmentación neutrofílica entre los diferentes grupos, con diferencias significativas entre las madres de los casos incidentes y prevalentes, quienes comparten el mismo tipo de DC, podría ser atribuido al factor tiempo, dadas las diferencias entre el momento del diagnóstico y el momento del estudio.

La deficiencia de AF puede ser provocada por factores genéticos y nutricionales. Dentro de los primeros se encuentran los SNP de los genes que codifican proteínas con función enzimática que participan diferentes vías del metabolismo del AF y la Homocisteína. A diferencia de las carencias nutricionales, los factores genéticos no son modificados por la influencia del tiempo.

(13) (16)

No se cuenta con evidencia de que las madres de los casos prevalentes hayan presentado hipersegmentación neutrofílica, como reflejo de la deficiencia materna de AF, en el momento en que se diagnosticó el DC en su descendencia, pero, dado que se trata de los mismos DC folato-sensibles que la de los casos incidentes; se infiere que en un porcentaje de los casos que pudieron haber presentado este hallazgo hematológico, desapareció con el transcurso del tiempo, a menos que presentasen alguno de los SNP en genes involucrados en las vías metabólicas del AF y de la Homocisteína.

La identificación de hipersegmentación neutrofílica en un frotis sanguíneo sugiere la deficiencia de AF o de cobalamina, pero a diferencia del AF, no resulta sensible para la detección de la deficiencia temprana de esta última vitamina. (208) (209)

Aunque en la actualidad la deficiencia de estas vitaminas se reconoce en base a la determinación de sus niveles séricos o eritrocitarios, el análisis del frotis sanguíneo continúa siendo una importante herramienta diagnóstica por dos razones fundamentales; primero, porque permite un diagnóstico provisional rápido y, en segundo lugar, porque puede diagnosticar la deficiencia temprana de AF aun cuando los niveles eritrocitarios permanecen normales. (206) La hipersegmentación neutrofílica ha sido considerada como un marcador hematológico indirecto de la deficiencia de AF. (84) (85)

No existe un claro consenso sobre el nivel de folato sérico en que aparece la hipersegmentación neutrofílica, convencionalmente los clínicos usan los niveles menores de 7  $\mu\text{mol/L}$  como guía, debido a que el riesgo de que aparezca anemia macrocítica se incrementa grandemente por debajo de esos niveles, aunque se reconoce que existe una denominada zona gris entre los niveles de 7 y 10  $\mu\text{mol/L}$ . (208)

En el análisis de la comparación entre la presencia de hipersegmentación neutrofílica entre las madres de los casos incidentes y la de los controles, al realizar el estudio del frotis sanguíneo en el mismo momento, se descarta el efecto del factor tiempo y, por ende, se analiza el efecto del DC, por tratarse en todos los casos de DC sensibles a la deficiencia materna de AF, esta deficiencia podría explicar la presencia del DC y de los hallazgos en la segmentación neutrofílica.

Las mayores frecuencias de hipersegmentación, observadas en las madres de los casos de productos con DTN, podría explicarse porque la deficiencia de AF induce la ubiquitinación de la lisina 119 de la histona H2A (H2AK119ub1), uno de los mecanismos epigenéticos que junto a la metilación del ADN y a los cambios conformacionales de la cromatina regulan la expresión génica, y que se ha relacionado con la aparición de diferentes DC folato-sensibles, como los DTN y las CCCT, entre otros. (24) (58)

### **3.5.2 Concentraciones séricas de oligoelementos**

La identificación de la deficiencia materna de cinc, magnesio, hierro, así como los elevados niveles de cobre, como factores de riesgo para la aparición de DC en la descendencia concuerda con lo referido en la literatura científica en relación a que tanto los niveles deficientes como

excesivos de oligoelementos se relacionan con la aparición de DC en humanos, puesto que las alteraciones en la homeostasis de estos oligoelementos esenciales pueden interferir con los diferentes procesos que intervienen en la organogénesis embrionaria.. (61) (168) (210)

Se plantea que debido a que el estatus nutricional del embrión es completamente dependiente del consumo alimentario materno y de su metabolismo, el desbalance nutricional materno durante el primer trimestre del embarazo puede provocar DC, puesto que diversos micronutrientes esenciales, que no pueden ser sintetizados por el organismo en cantidades suficientes, son necesarios para el mantenimiento de la salud, la normal progresión del embarazo y del desarrollo embrionario. (61) (168)

Las concentraciones de todos los oligoelementos fueron menores en el grupo de madres de casos incidentes en relación con las de los casos prevalentes y controles, excepto la concentración de cobre que resultaron superiores. Las causas primarias que subyacen en la deficiencia de micronutrientes son el aporte insuficiente y la pobre biodisponibilidad de micronutrientes. (210)

En la presente investigación la indagación del consumo dietario estuvo limitada al aporte de folatos, sin embargo; en la provincia de Villa Clara se realizó en 2016 una investigación con el objetivo de conocer el consumo alimentario y los hábitos dietéticos y tóxicos en las embarazadas, donde se constató que el 89% de las gestantes consumía leche, 82% pescado y 57% hígado, aunque refirieron una baja frecuencia de consumo; de igual forma, el 98% de las que consumieron frutas solo lo hicieron como promedio una vez a la semana. El 42% de las gestantes consumían con mayor frecuencia carne de cerdo y el 39% de pollo, solamente entre el 5% y el 12% refirieron consumo de carnes rojas. (211)

A consideración del autor, las bajas frecuencias en el consumo dietario de determinados macronutrientes y de fuentes naturales de folatos y oligoelementos identificadas en las embarazadas villaclareñas en el año 2016, guarda estrecha relación con la deficiencia de determinados oligoelementos constatadas en el presente estudio.

A nivel mundial, las deficiencias de micronutrientes más frecuentes en mujeres son las de hierro, vitamina A, iodo, AF y cinc. (63) (212)

Las deficiencias de micronutrientes en las madres incluidas en el presente estudio resultan análogas a las descritas en gestantes vietnamitas, donde la ingesta de folatos, Ca, Fe y Zn estaban por debajo del consumo nutricional recomendado. (210) Se plantea que la deficiencia de

Zn está tan extendida como la deficiencia de Fe y afecta cerca de la mitad de la población mundial. (19) (63) (213)

En una investigación realizada en la localidad de Santa Fe, del municipio habanero de Playa, se constató que las frecuencias de la deficiencia de hierro (estimada por ferritina sérica), cinc y cobre sérico en mujeres en edad reproductiva, fueron de 66,3 % (67/102), 36,2 % (34/94) y 19,1% (18/94), respectivamente. (214)

Las concentraciones sanguíneas de Zn disminuyen en embarazos normales a medida que aumenta la edad gestacional, posiblemente debido a la transferencia placentaria al feto. (215)

El autor considera que el hecho de que los niveles séricos de Zn en las madres que tuvieron descendencia afectada por DC fueran inferiores en comparación con las del grupo control, además del insuficiente aporte dietario, pudiera estar en relación con las interacciones antagónicas que se describen entre los diferentes oligoelementos. (63) (212)

En los últimos años se ha estudiado la existencia de interacciones competitivas entre el Zn, el Fe y el Cu y se ha destacado el antagonismo Fe-Zn como una interacción de importancia biológica potencial para la nutrición humana, sobre todo por la tendencia a prescribir abundante Fe inorgánico a grupos poblacionales específicos como las embarazadas, en los que las necesidades o los riesgos de deficiencia son mayores no solo para el Fe sino también para el Zn. (63) (212)

A nivel de la absorción intestinal, cuando existe deficiencia de Zn, se incrementa la absorción de Cu, y a su vez; los niveles elevados de Cu disminuyen la absorción de Zn y Fe. (212) (215) El Zn es un nutriente esencial para el crecimiento y diferenciación celular en todas las especies, mientras que el Cu es un importante componente de muchas proteínas involucradas en la morfogénesis. (215)

Mientras que el Fe está relacionado con el crecimiento embrionario desde las etapas tempranas del embarazo, se ha demostrado la existencia de complejos receptores específicos para la transferencia del Fe a través del saco de Yolk antes del desarrollo del sistema circulatorio. (145)

(216) También está bien establecido que el Mg constituye un importante elemento para el adecuado desarrollo y bienestar embriofetal. (59)

#### 3.5.2.1 Concentraciones séricas de oligoelementos según grupo de defectos congénitos.

Los niveles de muchos oligoelementos esenciales decrecen durante el embarazo, a menos que se administren como suplemento. Entre ellos se incluyen el Zn, Fe, Ca, Mg, Selenio y posiblemente el Cromo y el Iodo. (217)

Modelos animales han demostrado que los niveles maternos sub óptimos de micronutrientes puede conllevar a un elevado riesgo de DC en la descendencia, incluyendo las CC y DTN. Se reconoce que un consumo dietario deficiente de Zn durante el embarazo produce efectos teratogénicos, produciendo DC como los DTN, CC y HLP en humanos y animales. Por otra parte, se ha visto que la deficiencia de Cu induce a defectos cardiovasculares en ratas, mientras que un exceso de Cu se relacionó con un aumento de la mortalidad de embriones en modelos animales. (59) (169) (213) (218) (219)

Otros estudios también han documentado relación entre las bajas concentraciones séricas maternas de Zn y la presencia de DTN en los recién nacidos. (59) (220) (221)

En el año 2018 investigadores chinos publicaron su descubrimiento, realizado en embriones de ratones, de que la deficiencia de Zn provoca la disrupción del proceso de cierre del tubo neural, a través de la disminución de la ubiquitinación de P53, lo que origina un incremento en la estabilización de P53 y un exceso de apoptosis. (222) Hallazgo que evidencia la relación entre los factores nutricionales y diferentes mecanismos epigenéticos e importantes eventos celulares que resultan claves durante la embriogénesis.

El Zn desempeña un papel fundamental en la estabilización de ciertas macromoléculas y de las membranas celulares, regula la transcripción, se une a proteínas nucleares y forma complejos llamados en dedos de cinc o zinc fingers. Varios genes miembros de la familia Zic, que codifican para proteínas en dedos de cinc, han sido implicados en el origen de los DTN. Así, la pérdida de función de Zic2, Zic3 y Zic5 alteran el proceso de cierre del tubo neural en ratones y originan defectos variables: las mutaciones en Zic2 provocan EB y anencefalia, mientras que mutaciones en Zinc3 y Zinc5 producen anencefalia. (223)

Se constató hipocincinemia en las madres de los casos con CCCT, DTN y HLP, lo que está acorde con lo descrito en la literatura que plantea que estudios epidemiológicos sugieren que la ingesta deficiente de Zn está asociada a un incremento en el riesgo de DC. (59) (218) (220)

Mientras que experimentos en modelos animales han mostrado que la deficiencia materna de Fe se asocia a la presencia de diferentes fenotipos clínicos de DTN en la descendencia. (224) En una investigación realizada con el objetivo de relacionar las concentraciones maternas de

cuatro elementos alcalinos durante el periodo de cierre del tubo neural y la aparición de DTN en 191 madres con descendencia afectada por DTN y 261 madres con hijos sanos se observó que las altas concentraciones de Ca y Mg tuvieron un efecto protector para los DTN. (225)

Excepto en el Cu, las concentraciones de los restantes cuatro oligoelementos estudiados (Zn, Ca, Fe y Mg) resultaron más bajas en las madres de los casos incidentes que en las del grupo control, sin embargo; Kundak (226) al comparar las concentraciones de cinco elementos traza en el primer meconio de neonatos con CCCT encontró concentraciones significativamente superiores de Zn, Fe y Cu entre los recién nacidos con CCCT que entre los recién nacidos sanos, concluyendo que los oligoelementos pueden alterar los mecanismos de reparación del ADN, debido a alteraciones en los patrones de metilación del ADN y de esta forma intervenir en la patogénesis de las CCCT.

La concentración sérica de Cu varía ampliamente y está influida por la edad, el sexo y el estado fisiológico. En las mujeres los valores se incrementan al consumir anticonceptivos orales. El embarazo también ejerce efectos sobre la homeostasis de este oligoelemento, al provocar incremento de sus niveles séricos y disminución de Zn y de Fe, esta inversión de la relación se ha atribuido a la influencia del ambiente hormonal que prima en esta condición, se plantea que se induce la síntesis de ceruloplasmina. (214) En el presente estudio para las HLP las concentraciones maternas bajas de Zn, Fe y Mg se asociaron con la presencia de estos DC en la descendencia, resultado que discrepa de lo observado por Yin (61) quien no encontró asociación entre los niveles séricos maternos de Zn, Cu y Fe y el riesgo de HLP en la descendencia, lo que en opinión del autor, evidencia la gran heterogeneidad de factores de riesgo, además de los nutricionales; implicados en el origen de estos DC.

El Mg es el segundo catión más abundante a nivel intracelular y es esencial en todas las etapas de la vida, desde el periodo embrionario temprano, hasta la adultez. En una investigación realizada con el objetivo de comparar los niveles de Mg en el líquido amniótico y en el suero materno y la presencia de DC, se constató que la probabilidad de que aparezca un DC disminuyó con el incremento de los niveles de Mg, tanto en el líquido amniótico como en el suero materno, el nivel bajo de Mg en líquido amniótico se relacionó con una probabilidad de cerca del 10% en la ocurrencia de DC; mientras que esta probabilidad se duplicó con los bajos niveles séricos maternos de Mg. (227)

Una reciente investigación reveló el papel que desempeña el Mg en la expresión de los genes MSX-1 y PAX-9 durante el desarrollo embrionario temprano del macizo craneofacial, estos son factores de regulación clave en el control de la migración de las células mesenquimatosas durante el periodo inicial del desarrollo maxilar. Los investigadores concluyeron que la disminución combinada de la dosis génica de estos genes en humanos puede incrementar el riesgo de HLP, mientras que el Mg incrementa su expresión y puede resultar de utilidad en la prevención de este tipo de DC. (228)

### 3.5.3 Concentraciones séricas de Homocisteína

En la presente investigación se constataron diferencias en las concentraciones de Hcis entre las madres de los casos y los controles. En todas se trató de una hiperhomocisteinemia ligera, pues en ninguna se sobrepasó los valores de 30  $\mu\text{mol/L}$ . (86) (229)

La deficiencia de folatos o de AF disminuye la habilidad de remetilación de la homocisteína, debido a una inadecuada concentración de 5-metil-tetrahidrofolato, lo que conlleva a una hiperhomocisteinemia, que también puede ser provocada por deficiencia de cobalamina, dado que la vitamina B12 es un cofactor esencial en el ciclo de remetilación que convierte la Hcis en metionina; o por deficiencia de otras vitaminas, como la B6 y la B2. (13) (69) (230) (231)

Vidmar (69) plantea que la deficiencia de AF produce un arresto de las células en la fase S del ciclo celular, lo que limita los procesos de división y proliferación celular que resultan vitales durante el proceso de organogénesis.

Los niveles elevados de Hcis son un sensible indicador del estatus de AF, niveles mayores de 15  $\mu\text{mol/L}$  se correlacionan fuertemente con los niveles séricos de AF inferiores a los niveles fisiológicos normales (niveles séricos de AF por debajo de 10  $\mu\text{mol/L}$ ). (208) (229)

De acuerdo a la literatura, las concentraciones de Hcis durante el embarazo no son constantes y están relacionadas con características geográficas, culturales y sociales de las gestantes. (87) Surmiak (232) encontró una correlación negativa entre los niveles séricos de Hcis y los niveles séricos de AF ( $r = -0,64$ ,  $p = 0,002$ ).

La hiperhomocisteinemia ligera y moderada se relaciona fundamentalmente con enfermedades o trastornos genéticos de origen multifactorial, como los DC folato-sensibles, mientras que las de tipo severo que sobrepasan los 100  $\mu\text{mol/L}$ , generalmente se observan en enfermedades genéticas de origen monogénico, como la deficiencia de cistationina  $\beta$  sintasa o trastornos del metabolismo intracelular de la cobalamina. (86)

Para Smith y Refsum (231) es más apropiado considerar la hiperhomocisteinemia como un biomarcador, puesto que el término “factor de riesgo” a menudo implica un vínculo causal y para ello se requiere mucho más que una sólida evidencia, cumpliendo típicamente con los criterios de causalidad de Bradford Hill. Estos investigadores consideran que es mucho más importante que los datos de los ensayos clínicos demuestren que una reducción de los niveles de Hcis puede prevenir la enfermedad o el DC.

#### 3.5.3.1 La hiperhomocisteinemia como factor de riesgo para el conjunto de los DC folato-sensibles y según grupo de defectos congénitos

En el presente estudio la hiperhomocisteinemia materna se asoció con la presencia de DC folato-sensibles en general y además para los DTN y las HPLNS en la descendencia. Las madres con hiperhomocisteinemia tuvieron un mayor riesgo de tener hijos con DTN, resultado que coincide con el de otros investigadores. (233) (234)

Las concentraciones de Hcis identificadas en el presente estudio son inferiores a las descritas en mujeres indias, en las que se constataron concentraciones medias más elevadas tanto en las madres de los casos como en las del grupo control, ( $15.71 \pm 8.35 \mu\text{mol/L}$  y  $12.87 \pm 5.95 \mu\text{mol/L}$ , respectivamente. (11) Lo que en la opinión del autor pudiera estar relacionado con las diferencias de los patrones alimentarios y de las frecuencias génicas de SNP de genes relacionados con el metabolismo del AF, entre ambas poblaciones.

Los cambios en la expresión génica inducida por la Hcis están relacionados con los mecanismos epigenéticos más conocidos: metilación del ADN y modificación de las histonas, incluyendo la acetilación y la metilación. (24) (79) (235)

Se describen más de 100 posibles modificaciones de las histonas, recientemente investigadores chinos identificaron un nuevo mecanismo de modificación de las histonas, la homocisteinilación. Cuando existe una hiperhomocisteinemia se incrementa este proceso a nivel de la lisina 79 de la histona 3 (H3K79Hcy), estos científicos demostraron que en las células de la cresta neural esta modificación provoca la disminución en la expresión de varios genes relacionados con el cierre del tubo neural, lo que origina DTN. (233)

Uno de los mecanismos que se plantean provocan la aparición de los DTN ante la deficiencia materna de AF es la ubiquitinación de los genes relacionados con el cierre del tubo neural lo que afecta su expresión. (24)



Posteriores estudios comprobaron que muchos de genes relacionados con el cierre del tubo neural, junto al sistema de hormonas tiroideas están regulados por la homocisteinilación de H3K79. Los investigadores concluyeron que, el efecto de los altos niveles de Hcis puede afectar tanto al metabolismo materno de la hormona tiroidea, como al cierre del tubo neural en la embriogénesis; mediante el proceso de homocisteinilación de las histonas. (236)

Otros investigadores plantean que la hiperhomocisteinemia puede provocar que las células de la cresta neural inicien el proceso apoptótico, de acuerdo a experimentos realizados en modelos animales. (70)

Mientras que Guao (74) refiere que los daños celulares generados por la hiperhomocisteinemia resultan de la alteración del estrés oxidativo, al generar especies reactivas del oxígeno, unión al óxido nítrico o por acumulación de su precursor, la S-adenosil homocisteína, la que inhibe el proceso biológico de la transmetilación.

Una consistente evidencia del vínculo entre la hiperhomocisteinemia y la aparición de DTN proviene de China, donde se constató un gradiente poblacional en las concentraciones de Hcis, con los mayores niveles en el norte del país (prevalencia de hiperhomocisteinemia de 34,8%) y los niveles más bajos al sur (prevalencia de hiperhomocisteinemia de 16%). Se describe, además, un conglomerado espacial de DTN que incluye las provincias de la región norte, con una prevalencia cuatro veces superior que en la del sur. (231)

En el presente estudio las mujeres con hiperhomocisteinemia tuvieron un riesgo mucho mayor de tener descendencia con HLP, a tono con lo referido en la literatura respecto a estudios que han demostrado asociación entre la hiperhomocisteinemia y las HLP. (125) (187)

Las concentraciones de Hcis se correlacionan negativamente con las de AF, micronutriente éste que interviene en la proliferación y diferenciación de varios tipos celulares, como el de las células mesenquimatosas que dan origen al maxilar. (23)

En la presente investigación no se constató asociación entre la hiperhomocisteinemia materna y la presencia de CCCT en la descendencia, resultado discordante con lo referido por varios investigadores que identifican a la hiperhomocisteinemia como un factor de riesgo independiente para las CC. (87) (161) (237) (238) Aunque, coincide con lo descrito por Surmiak, (232) quien no observó diferencias significativas entre las concentraciones séricas de Hcis entre las 43 madres de los casos con CCCT y las 43 madres de casos con otros tipos de CC, hallazgos que los investigadores consideran guardó relación con el pequeño tamaño muestral.

### 3.5.3.2 Relación entre la presencia de hiperhomocisteinemia y la hipersegmentación neutrofílica

Las diferencias en relación a la presencia de hipersegmentación nuclear de neutrófilos entre las madres de casos incidentes y las de los controles, reflejan la influencia que sobre la deficiencia materna de AF tiene algún factor genético, presumiblemente el polimorfismo de un solo nucleótido en el gen MTHFR; mientras que la diferencia entre las madres de los casos incidentes y las de los casos prevalentes refleja el efecto del componente nutricional que varía al pasar el tiempo, lo que se corrobora al no constatarse diferencias entre las madres de los casos prevalentes y las de los controles, pues las primeras podrían tener un efecto del factor nutricional modificado con el paso del tiempo y las segundas no parecen poseer el componente genético para la deficiencia de AF; reflejo de ello resulta el hecho de que en las madres en que existió un mayor lapso de tiempo entre el momento en que se diagnosticó el DC (año 2013) y la toma de la muestra biológica para el estudio, en ninguna de ellas se identificó la presencia de hipersegmentación neutrofílica.

Las concentraciones séricas o plasmáticas de Hcis total y la hipersegmentación neutrofílica constituyen marcadores indirectos de los inadecuados niveles de AF. Los que pueden verse afectados por factores genéticos y nutricionales. (230) (231)

En el presente estudio la mayor frecuencia de hipersegmentación neutrofílica se constató en las madres de casos incidentes, en quienes se identificaron también los niveles más elevados de Hcis. Se describe que las concentraciones maternas de Hcis se correlacionan negativamente con los niveles de AF, (232) lo que explicaría la identificación de ambos marcadores en estas mujeres.

### 3.5.6 Análisis de la influencia de variables epidemiológicas y analíticas de conjunto en el riesgo de aparición de los DC folato-sensibles

Las evidencias muestran que el porcentaje de clasificación correcta fue incrementándose a medida que se incorporaban nuevas variables a la ecuación, de un 84% cuando solamente se incluyeron las variables epidemiológicas, a un 86% cuando se comenzaron a incluir en la ecuación las variables analíticas (hipersegmentación neutrofílica y concentraciones de oligoelementos) hasta alcanzar un 91% cuando se consideraron además los niveles de Hcis. Lo que a consideración del autor pone de manifiesto el origen multifactorial de estos DC no sindrómicos, donde se interrelacionan factores de naturaleza ambiental y genética, ya que las mutaciones en el gen MTHFR se relacionan con los niveles elevados de Hcis total, particularmente en las mujeres con bajo consumo de folatos. (87)

### 3. 6 Conclusiones parciales

1. La hipersegmentación neutrofílica constituye un hallazgo que se constata con mayor frecuencia en las madres de los casos incidentes con defectos congénitos folato-sensibles, particularmente en aquellas con descendencia afectada por defectos del tubo neural.
2. Los niveles bajos de cinc y de hierro, la deficiencia múltiple de oligoelementos, junto con los niveles elevados de cobre constituyen factores de riesgo asociados al conjunto de defectos congénitos folato-sensibles y a las cardiopatías conotruncales y los defectos del tubo neural en particular.
3. La hiperhomocisteinemia constituye un factor de riesgo biológico en la aparición de defectos congénitos, sobre todo en los defectos del tubo neural y en las hendiduras labiopalatinas no sindrómicas.
4. Las diferencias existentes entre la frecuencia de hipersegmentación, concentraciones de oligoelementos y homocisteína, entre las madres de casos incidentes y prevalentes pudieran estar en relación con el tiempo transcurrido entre la concepción del producto con defectos congénitos y su evaluación, mientras que en los casos incidentes y los controles estas diferencias pudieran ser reflejo de factores genéticos y epigenéticos, como los nutricionales, lo que constituye un enfoque novedoso en el abordaje de defectos congénitos de etiología multifactorial.
5. La importante relación entre los dos marcadores indirectos de la deficiencia materna de ácido fólico es indicativo de la potencial utilidad de su empleo y de la consistencia del hallazgo de dicha deficiencia en las madres de productos con defectos congénitos folato-sensibles.

## TABLAS Y GRÁFICOS DEL CAPÍTULO 3

Tabla 1. Segmentación neutrofílica en lámina periférica en madres de casos incidentes, prevalentes y controles. Villa Clara 2013 – 2018.

Grupo de segmentación	Casos incidentes		Casos prevalentes		Controles		Total		X <sup>2</sup>	
	N	%	N	%	N	%	N	%	Valor	Sig.
Grupo I	91	85,8	102	96,2	100	94,3	293	92,14	11,60	0,021
Grupo II	10	9,40	3	2,8	6	5,70	19	5,97		
Grupo III	5	4,70	1	0,9	0	0,00	6	1,89		
Total	106	100,0	106	100,0	106	100,0	318	100,0		
Hipersegmentación neutrofílica	15	60,0	4	16,0	6	24,0	25	7,86	8,943	0,011

Hipersegmentación neutrofílica	Casos incidentes + prevalentes		Controles		X <sup>2</sup>		OR	
	N	%	N	%	Valor	Sig.	Valor	95% IC
Hipersegmentación neutrofílica	19	9,00	6	5,7	1,064	0.302	1,64	0,64 – 4,24

Fuente: Base de datos de la investigación.

Tabla 2. Comparación de la frecuencia de hipersegmentación neutrofílica entre las madres de los diferentes grupos de estudio. Villa Clara 2013 – 2018.

Casos incidentes		Controles		X <sup>2</sup>	
N	%	N	%	Valor	p
15	60,00	6	24,00	4,52	0,033
Casos incidentes		Casos prevalentes			
N	%	N	%		
15	60,00	4	16,00	9,16	0,010
Casos prevalentes		Controles			
N	%	N	%		
4	16,00	6	24,00	0,39	0,530

n= 25 Fuente: Base de datos de la investigación.

Tabla 3. Comparación de la frecuencia de los diferentes grados de segmentación neutrofílica entre las madres de casos incidentes, prevalentes y controles. Villa Clara 2013 – 2018.

Grupo de segmentación	Casos incidentes		Casos prevalentes		Prueba de diferencia de proporciones
	N	%	N	%	
Grupo I	91	85,8	102	96,2	0,008
Grupo II	10	9,40	3	2,8	0,050
Grupo III	5	4,70	1	0,9	0,120
Subtotal de Hipersegmentación	15	60,0	4	16,0	0,008
	Casos incidentes		Controles		
Grupo I	91	85,8	100	94,3	0,041
Grupo II	10	9,40	6	5,70	0,314
Grupo III	5	4,70	0	0,00	0,029
Subtotal de Hipersegmentación	15	60,0	6	24,0	0,041
	Casos prevalentes		Controles		
Grupo I	102	96,2	100	94,3	0,539
Grupo II	3	2,8	6	5,70	0,334
Grupo III	1	0,9	0	0,00	0,500
Subtotal de Hipersegmentación	4	16,0	6	24,0	0,539

Fuente: Base de datos de la investigación.

Tabla 4. Comparación de la frecuencia de hipersegmentación neutrofílica en las madres de los casos con diferentes tipos de defectos congénitos folato-sensibles respecto a las de los controles. Villa Clara 2013 – 2018.

Hipersegmentación Neutrofílica		CCCT	DTN	HLP	GS	SD	Conjunto de DC	Controles
Si	N	6	6	4	0	3	19	6
	%	10,34	13,04	11,76	0,00	6,82	8,96	5,70
No	N	52	40	30	30	41	193	100
	%	89,66	86,96	88,24	100,00	93,18	91,04	94,30
X <sup>2</sup>	Valor	1,21	2,41	1,45	1,76	0,07	1,06	
	p	0,271	0,121	0,231	0,184	0,786	0,302	

CCCT: cardiopatía congénita conotruncal, DTN: defectos del tubo neural, HLP: hendiduras labiopalatinas, GS: gastrosquisis, SD: síndrome Down. DC: defectos congénitos. Fuente: Base de datos de la investigación.

Tabla 5. Concentraciones séricas maternas de los cinco oligoelementos en las madres de casos y controles. Villa Clara 2013 – 2018.

Niveles séricos	Casos incidentes		Casos prevalentes		Controles		Kruskal Wallis	Casos incidentes + prevalentes		U de Mann Whitney
	Mediana	95% IC	Mediana	95% IC	Mediana	95% IC	p	Mediana	95% IC	p
Zn	9,91	8,79 – 9,76	11,79	11,22 – 11,92	11,95	11,42 – 12,14	0,000	10,91	10,09 - 10,76	0,001
Cu	20,56	19,69- 22,21	15,84	16,09 – 7,83	15,52	15,85 – 17,66	0,000	18,19	18,15 – 19,76	0,002
Ca	2,16	2,17 – 2,30	2,25	2,24 – 2,37	2,23	2,24 – 2,37	0,010	2,19	2,16 – 2,35	0,317
Mg	0,74	0,72 – 0,77	0,79	0,78 – 0,83	0,80	0,78 – 0,82	0,000	0,77	0,74 – 0,81	0,018
Fe	10,11	7,90 – 11,24	12,30	10,73 – 13,55	10,89	10,79 – 12,76	0,000	10,89	9,74 – 11,97	0,000

Zn: Cinc, Cu: cobre, Ca: calcio, Mg: Magnesio, Fe: hierro. Fuente: Base de datos de la investigación.

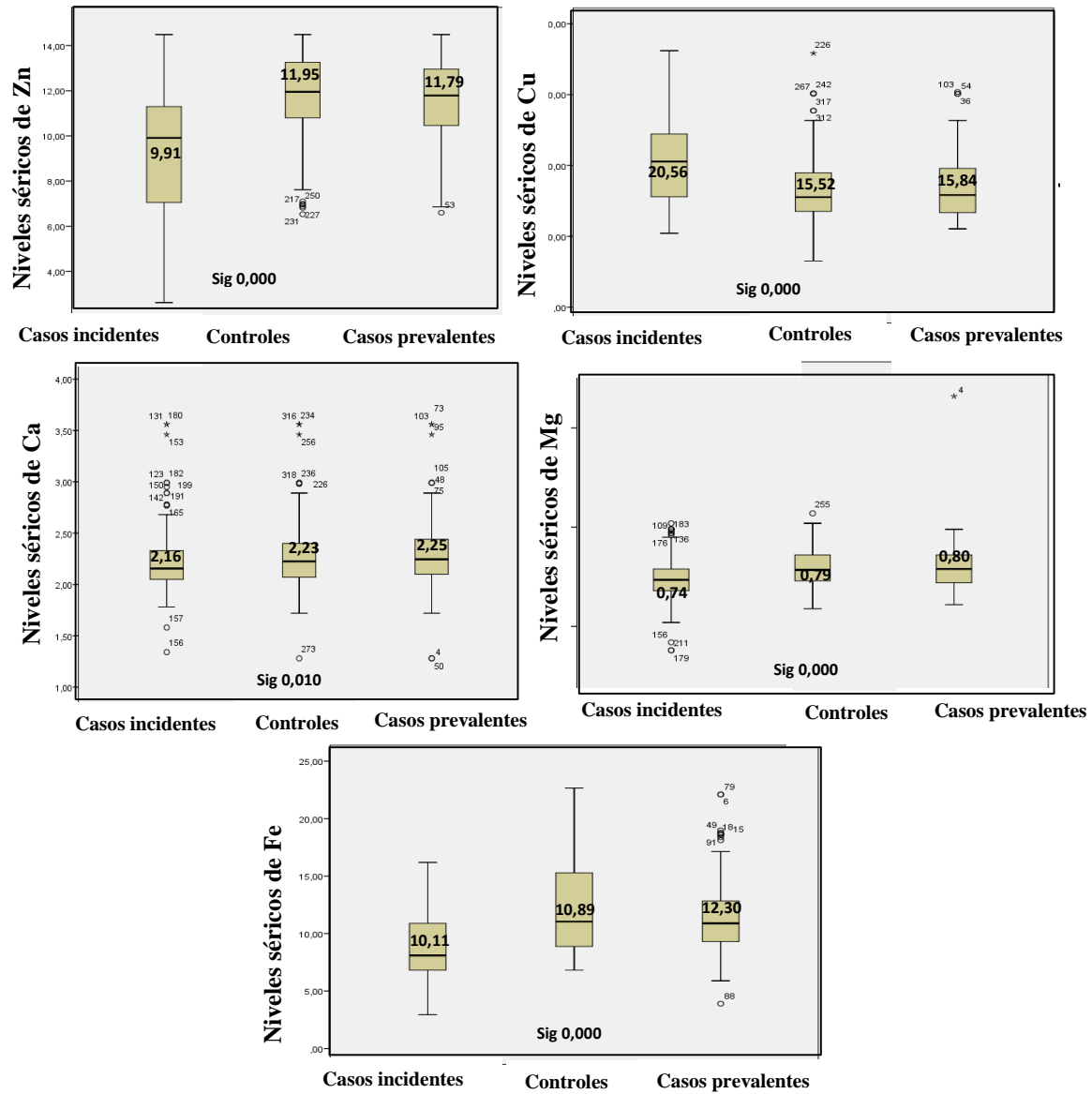


Figura 1. Concentraciones de oligoelementos en las madres de casos y controles. Villa Clara 2013 – 2018.

Zn: Cinc, Cu: cobre, Ca: calcio, Mg: Magnesio, Fe: hierro. Fuente: Tabla 5.



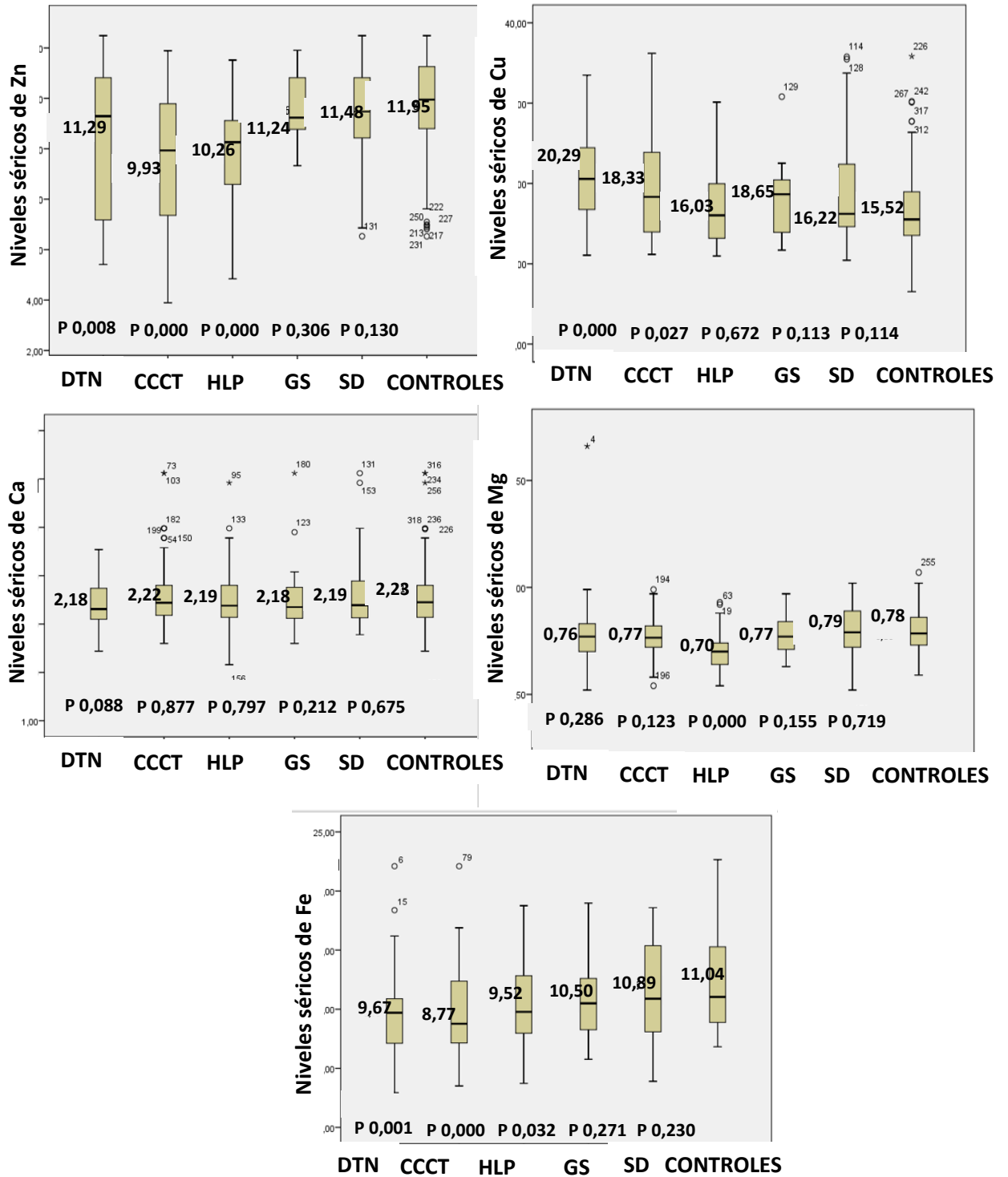


Figura 2. Concentraciones séricas maternas de oligoelementos según tipo de defecto congénito sensible a la deficiencia materna de ácido fólico. Villa Clara 2013 – 2018.

CCCT: cardiopatía congénita conotruncal, DTN: defectos del tubo neural, HLP: hendiduras labiopalatinas, GS: gastroquisis, SD: síndrome Down. Zn: Cinc, Cu: cobre, Ca: calcio, Mg: Magnesio, Fe: hierro. Fuente: Anexo 7.

Tabla 6. Alteraciones en las concentraciones séricas maternas de oligoelementos como factores de riesgo para DC folato-sensibles. Villa Clara 2013 – 2018.

Conjunto de DC	Casos		Controles		X <sup>2</sup> de Pearson (*TE Fisher)		OR	
	No.	%	No.	%	Valor	p	Valor	95% IC
Niveles bajos de Zn	40	18,87	6	5,66	9,963	0,002	3,88	1,59- 9,47
Niveles elevados de Cu	39	18,39	8	7,55	6,60	0,010	2,76	1,24- 6,15
Niveles bajos de Ca	21	9,91	5	4,71	2,53	0,111		
Niveles bajos de Mg	41	19,34	6	5,66	10,50	0,001	3,99	1,64- 9,75
Niveles bajos de Fe	13	6,13	0	0,00		0,006		
Deficiencia múltiple de oligoelementos	32	15,09	2	3,45		0,000	9,24	2,17- 39,63

Zn: Cinc, Cu: cobre, Ca: calcio, Mg: Magnesio, Fe: hierro. Fuente: Base de datos de la investigación.

Tabla 7. Concentraciones séricas maternas de Homocisteína en madres de casos incidentes, casos prevalentes y controles. Villa Clara 2013 – 2018.

Variable	Casos incidentes		Casos prevalentes		Controles		Kruskal Wallis	Casos incidentes + prevalentes		U de Mann Whitney
	Mediana	95% IC	Mediana	95% IC	Mediana	95% IC	p	Mediana	95% IC	p
Niveles de Hcis	11,74	10,19 – 14,99	7,77	6,98 – 11,50	6,39	5,34 – 7,44	0,040	10,56	9,26 – 12,58	0,000

Hcis: homocisteína. Fuente: Base de datos de la investigación.

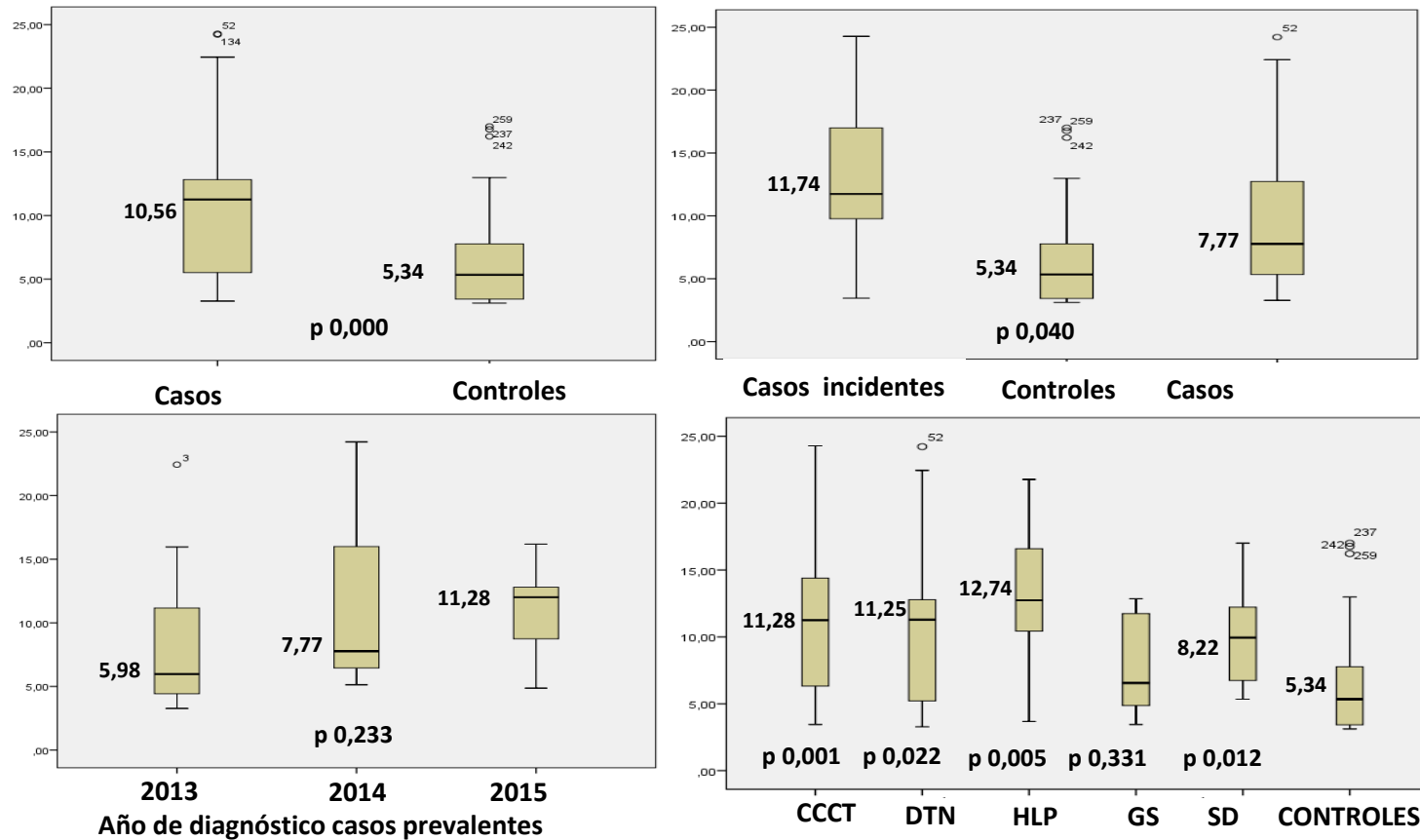


Figura 3. Distribución de las concentraciones séricas maternas de Homocisteína. Villa Clara 2013 – 2018.

CCCT: cardiopatía congénita conotruncal, DTN: defectos del tubo neural, HLP: hendiduras labiopalatinas, GS: gastrosquisis, SD: síndrome Down. Fuente: Base de datos de la investigación.

Tabla 8. Concentraciones séricas de Homocisteína por tipo de DC. Villa Clara 2013 – 2018.

Grupo de DC	Niveles de Homocisteína en los casos		Controles		U de Mann Whitney
	Mediana	95% IC	Mediana	95% IC	p
CCCT	11,28	7,56 – 15,55			0,001
DTN	11,25	8,16 – 15,33	5,34	5,34 –	0,022
HLP	12,74	7,41 – 18,94		7,44	0,005
GS	6,56	3,62 – 11,72			0,331
SD	8,22	6,25 – 11,80			0,012
Conjunto de DC	10,56	9,26 – 12,58			0,000

CCCT: cardiopatía congénita conotruncal, DTN: defectos del tubo neural, HLP: hendiduras labiopalatinas, GS: gastroquisis, SD: síndrome Down. DC: defectos congénitos. Fuente: Base de datos de la investigación.

Tabla 9. Hiperhomocisteinemia como factor de riesgo para los defectos congénitos folato-sensibles. Villa Clara 2013- 2018.

Tipo de DC	Casos		Hiperhomocisteinemia Controles (n=106)		TE Fisher	OR	
	N	%	N	%	p	Valor	CI al 95%
CCCT (n= 58)	3	5,17			0,154		
DTN (n= 46)	3	6,52			0,036	12,25	1,17- 128,4
HLP (n= 34)	2	5,88	1	0,94	0,037	19,60	1,50- 256,3
GS (n= 30)	0	0,00					
SD (n=44)	1	2,27			0,284		
Conjunto de DC (n=212)	9	4,25			0,016	10,76	1,31- 88,47

CCCT: cardiopatía congénita conotruncal, DTN: defectos del tubo neural, HLP: hendiduras labiopalatinas, GS: gastroquisis, SD: síndrome Down. DC: defectos congénitos. Fuente: Base de datos de la investigación.

Tabla 10. Relación entre la hiperhomocisteinemia segmentación neutrofílica.

	Presencia de hiperhomocisteinemia		No presencia de hiperhomocisteinemia		TE Fisher	OR	
	N	%	N	%	P	Valor	CI al 95%
Presencia de hipersegmentación	6	60,00	6	6,70	0,000	21,00	4,63- 95,27
Segmentación normal	4	40,00	84	93,30			
Total	10	100,00	90	100,00			

Fuente: Base de datos de la investigación.

## **CAPÍTULO 4. ESTUDIO DEL POLIMORFISMO C677T DEL GEN MTHFR EN MADRES CON DESCENDENCIA AFECTADA POR DEFECTOS CONGÉNITOS FOLATO-SENSIBLES**

### **4.1 Introducción**

El gen MTHFR codifica la enzima que interviene en la conversión de homocisteína a metionina. Mutaciones en este gen, como el polimorfismo C677T provocan una disminución de un 50% de la actividad enzimática que se manifiesta como un trastorno metabólico: la hiperhomocisteinemia, que entre otras alteraciones se describen efectos teratogénicos embrionarios, los que pueden prevenirse mediante el incremento de la ingesta de un micronutriente esencial: el ácido fólico. (239)

### **4.2 Objetivos**

Para dar salida al cuarto objetivo de la tesis se planteó establecer la relación entre el polimorfismo C677T del gen MTHFR y la aparición de los DC sensibles a la deficiencia materna de ácido fólico, bajo diferentes modelos de asociación genética y su posible interacción con otras variables de riesgo.

### **4.3 Material y Métodos**

#### **4.3.1 Definición de la muestra de estudio**

El ADN disponible de la totalidad de las 318 madres, para el genotipado del SNP C677T del gen MTHFR, se trasladó a los laboratorios donde el analista fue seleccionando a ciegas cada una de las muestras, una vez que se definió que no se podía realizar a todas, hasta completar las 135 muestras factibles de estudiar.

Con el ánimo de garantizar la validez interna de los resultados las muestras fueron trasladadas a los laboratorios de análisis separadas en tres grupos: casos incidentes, casos prevalentes y controles, identificado cada grupo solo por una letra y cada muestra identificada con un número. Este procedimiento garantizó dos aspectos que introdujeron un componente aleatorio en el muestreo, primero, la selección a ciegas, sin datos y sin conocimiento del analista, así como que todas las muestras tuvieran la misma posibilidad de ser incluidas.

#### 4.3.2 Metodología del estudio molecular del polimorfismo C677T del gen MTHFR

##### 4.3.2.1 Obtención del ADN genómico

Para dar cumplimiento al objetivo 4, se procedió a la extracción de ADN genómico a partir de las 318 muestras de sangre disponibles depositadas en tubos cónicos de 50 ml, junto con 200  $\mu$ L de EDTA como anticoagulante. Las muestras se conservaron refrigeradas a 8°C hasta el momento de la extracción de ADN.

En 111 muestras (68 madres de casos y 43 de controles) se obtuvo ADN genómico de leucocitos de sangre periférica por parte del autor en el Laboratorio Multipropósito de la Unidad de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, previo entrenamiento en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Genética de Sancti Spíritus, mediante la técnica de precipitación salina durante toda la noche, con empleo de procedimientos estandarizados. (240)

En las restantes muestras la extracción de ADN leucocitario se realizó de manera automatizada mediante el equipo QIA Symphony SP en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Genética Médica de la Habana, el cual utiliza tecnología de partículas magnéticas. La determinación de la concentración y pureza del ADN fue realizada mediante métodos espectrofotométricos.

Para el análisis de la concentración se obtuvo la absorbancia de la muestra a 260 nm y, para determinar la pureza se utilizó la proporción de las absorbancias obtenidas a 260 nm y 280 nm (260 nm/280 nm). Se consideró un buen nivel de pureza del ADN cuando estos valores estuvieron en un rango 1,5 y 2,0 nm, según lo descrito por otros investigadores. (72)

Se compararon los niveles de concentración y pureza del ADN y fueron adecuados, tanto en las muestras obtenidas por la técnica manual de precipitación salina, como por la automatizada.

##### 4.3.2.2 Caracterización del sistema polimórfico MTHFR C677T

El polimorfismo C677T se estudió mediante PCR/RFLP siguiendo protocolos estandarizados. (72) en los laboratorios de Biología Molecular del Centro para la Investigación y Rehabilitación de las Ataxias Hereditarias “Carlos J. Finlay” de Holguín y del Centro Nacional de Genética Médica de La Habana, En dos muestras se realizó el genotipaje a ciegas en ambos laboratorios. El polimorfismo C677T fue demostrado después de amplificación por PCR con el uso de los siguientes cebadores, descritos por Frost en 1995 y utilizados en estudios previos realizados por investigadores cubanos: Secuencia senso 5'-3': TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA y secuencia antisenso 5'-3': AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG. (72)

La PCR fue realizada en un volumen final de 25 µl utilizando 1 µL de una disolución 1/10 del ADN purificado, en una mezcla de reacción conteniendo 1x el buffer de la polimerasa utilizada, cada deoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) a concentración final de 0,2 µM, MgCl a 1,5 µM, cada cebador a 0,2 µM y 2 unidades de la Taq polimerasa.

La amplificación se realizó en un termociclador MJ Research modelo GIANT, los ciclos de temperatura incluyeron un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por un minuto, hibridación de los cebadores a 68°C por un minuto, y polimerización a 72°C por un minuto, seguido de polimerización final a 72°C por 10 minutos.

La digestión enzimática del fragmento amplificado fue realizada en un volumen final de 30 µl conteniendo 15 µl del producto amplificado en buffer 1X CutSmart de la firma New England Biolabs y 2 unidades de enzima HinfI de la misma firma comercial durante 3 a 5 horas, la cual presenta la secuencia nucleotídica de reconocimiento: 5'- GANTC-3' y reveló un polimorfismo bi-alélico que produjo fragmentos de diferentes tamaños: uno de 198 pb correspondiente al alelo C (con ausencia del sitio de corte para la enzima de restricción) y dos fragmentos de 175 pb y 23 pb correspondientes al alelo T (con presencia del sitio de restricción). (72)

Los fragmentos correspondientes a cada muestra fueron caracterizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% con 0,5 µg/del de bromuro de etidio a 9 V/cm durante 55 minutos, incorporándose en cada corrida electroforética el marcador de peso molecular de 25 pb. Ver imagen de la corrida electroforética en el Anexo 1.

#### **4.3.3 Variables moleculares**

- Alelos MTHFR C677T: Cada una de las dos formas alternativas del polimorfismo C677T del gen MTHFR, según la corrida electroforética. Valores finales: “C” (alelo salvaje) o “T” (alelo mutado).

- Genotipo MTHFR C677T: Combinación dos a dos, de alelos para el polimorfismo C677T, característicos de cada individuo; según la corrida electroforética. Valores finales: “homocigótico 677CC”, “heterocigótico 677CT” u “homocigótico 677TT”. (241) En la Figura 1 se muestra una fotografía de una corrida electroforética donde aparecen los genotipos homocigóticos 677CC y 677TT.



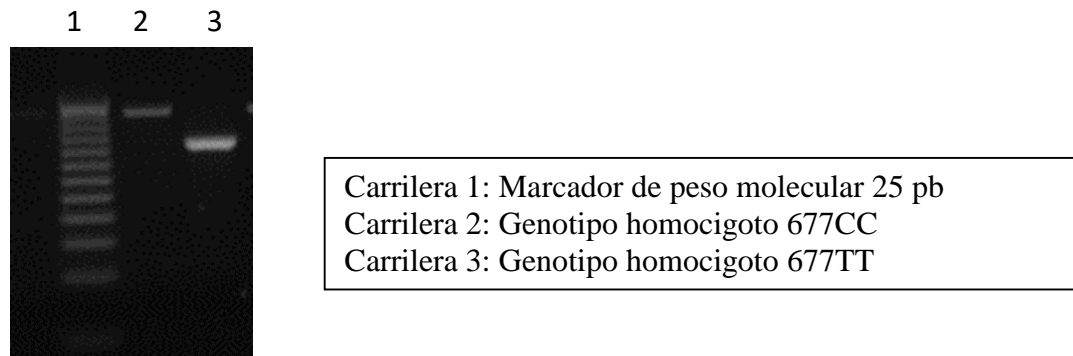


Figura 1. Electroforesis de los productos de restricción con la enzima MTHFR en el polimorfismo C677T.

#### 4.3.4 Técnicas estadísticas empleadas para determinar la existencia de equilibrio génico

Para verificar si el polimorfismo C677T estaba en equilibrio génico de Hardy-Weinberg (EHW) en el grupo total de 173 controles empleados para este análisis, se calculó el Ji cuadrado de bondad del ajuste, para lo que se determinaron las frecuencias alélicas suponiendo EHW, para ello se emplearon las fórmulas habituales: alelo 677C=  $2CC+CT/2n$ , alelo 677T=  $2TT+CT/2n$ . A partir de dichas frecuencias se obtuvieron las frecuencias genotípicas esperadas ( $CC=p^2$ ,  $CT=2pq$  y  $TT=q^2$ ). (241)

Si las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas no mostraban diferencias significativas y el valor del Ji calculado resultaba menor que el tabulado para un nivel de significación  $\alpha = 0,05$  y dos grados de libertad (3,84), se aceptaba la hipótesis nula, la que expresaba que existía EHW.

Dado el limitado número de estudios moleculares que se pudieron realizar en las madres del grupo control procedente del presente estudio (45 muestras y de ellas dos sin resultados), tanto para la comprobación del equilibrio poblacional, como para el análisis de los diferentes estudios de asociación se utilizaron, previa autorización de su investigador principal, los resultados de la genotificación de 130 controles provenientes del único estudio poblacional del que existen evidencias de haber analizado este polimorfismo en Cuba, realizado en Holguín, provincia que junto a Villa Clara y Sancti Spíritus son las únicas tres provincias del país con más del 80% de su población con color de la piel blanco. (152)

Previo a la incorporación de esta muestra al grupo control de este estudio, se valoró la existencia de equilibrio Hardy Weinberg en los controles procedentes de cada provincia por separado.

Se realizó, además, un análisis de las frecuencias genotípicas observadas entre las muestras controles de ambas provincias, para comprobar que no existían diferencias significativas entre las mismas, como requisito para ser empleadas en el análisis de equilibrio génico y en los estudios de asociación genética.

#### **4.3.5 Determinación de las frecuencias génicas y genotípicas en las madres de casos y controles**

La distribución de las frecuencias génicas y genotípicas entre las madres de los casos y las de los controles se comparó mediante la prueba de Ji cuadrado. Se realizó un análisis de la homogeneidad de la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en la totalidad de las madres de los casos y de los controles.

Con el fin de argumentar la apropiada utilización de los controles procedentes del estudio realizado en Holguín, se realizó además un análisis donde se compararon las frecuencias genotípicas entre las madres de los casos y controles procedentes del presente estudio y entre casos del presente estudio y controles de Holguín.

Se determinaron las frecuencias génicas y genotípicas para las muestras de los cinco tipos de DC y se compararon respecto a las frecuencias en madres del grupo control, mediante prueba de Ji cuadrado.

#### **4.3.6 Estudios de asociación genética del polimorfismo C677T del gen MTHFR**

Una vez que se dispuso de los genotipos correspondientes al SNP estudiado en madres de casos y de los controles y comprobada la existencia de equilibrio génico, se procedió a comprobar mediante los diseños de asociación genética establecidos y bajo la hipótesis nula de que ninguno de los dos alelos del polimorfismo se asociaba más a casos que a controles de lo que cabría esperar por el azar. Teniendo en cuenta que es un polimorfismo no funcional, se probaron modelos que establecen asociaciones hipotéticas bajo siete diferentes relaciones de dominancia entre los alelos: cuatro de codominancia y los modelos de dominancia, recesividad y aditivo.

(241)

#### **4.3.7 Relación entre el genotipo y otras variables de riesgo**

Para evaluar la posible interacción de otras variables de riesgo y el genotipo materno del polimorfismo C677T se analizó la presencia de las variables de riesgo: hipersegmentación neutrofílica, umbral de riesgo de la Hcis, hiperhomocisteinemia, niveles bajos o elevados de oligoelementos y deficiencia múltiple de micronutrientes, en la muestra con estudio molecular,

considerando los diferentes genotipos, sin tener en cuenta su condición de madres de casos o de controles, para comparar las frecuencias de dichas variables de riesgos entre los tres genotipos mediante prueba de Ji cuadrado de Kruskal Wallis.

Con estas variables de riesgo se realizó un análisis, según la condición de madre de caso incidente, prevalente y control, solo para la muestra genotipada, para caracterizar la misma y evaluar su similitud respecto al comportamiento de dichas variables en la muestra total.

Se efectuó un análisis multivariado mediante regresión logística binaria por el método condicional, en las 133 madres en las que se obtuvo resultado en el genotipaje del polimorfismo C677T; se analizaron 25 variables epidemiológicas y nutricionales, excepto las relacionadas con los niveles de Hcis y se incluyó la presencia del genotipo de riesgo TT, para un total de 26 variables.

Por último, se realizó un análisis que incluyó a las 83 mujeres en las que se realizó la determinación de los niveles de Hcis y además el genotipaje, incluyendo 28 variables en total.

## 4.4 Resultados

### 4.4.1 Estudio del equilibrio génico en el polimorfismo MTHFR C677T

Las frecuencias genotípicas observadas en el conjunto de 173 controles, aparecen en la Tabla 1, para el genotipo de riesgo 677TT fue de 0,06, mientras que la frecuencia genotípica esperada calculada para este genotipo fue de 0,10. Las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas no mostraron diferencias significativas ( $p=0,22$ ) para la prueba de  $\chi^2$  de bondad de ajuste (valor: 3,41) pues resultó menor que el tabulado para un nivel de significación  $\alpha = 0,05$  y dos grados de libertad (3,84), (241) por lo que se constató la presencia de EHW.

En las madres del grupo control del presente estudio ( $n=43$ ) se constató la existencia de HHW, el valor de  $\chi^2$  de bondad de ajuste fue de 0,77 ( $p=0,72$ ). De igual forma, previo a la incorporación de los 130 controles provenientes del estudio del polimorfismo MTHFR C677T realizado por Almaguer y colaboradores en Holguín (72) se verificó la existencia de EHW ( $\chi^2 = 2,64$  y  $p=0,22$ ). (Anexo 2)

### 4.4.2 Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo MTHFR C677T

En la Tabla 2 se presenta el análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas entre los casos y el total de 173 controles procedentes de ambas provincias, se constató que la frecuencia del genotipo homocigótico mutado (TT) fue de 0,14 en las madres con descendencia afectada por DC folato-sensibles y de 0,06 en las madres del grupo control, diferencias que resultaron

significativas ( $p=0,041$ ). El alelo T tuvo una frecuencia de 0,37 en los casos y 0,32 en los controles. Las frecuencias alélicas entre casos y controles no resultaron diferentes, para ninguno de los dos alelos.

En el Anexo 3 se observa que al comparar las frecuencias de los diferentes genotipos (677TT, 677CT y 677CC) de las madres de los casos y de los 43 controles del presente estudio con resultado del estudio molecular, no se observaron diferencias significativas.

Tampoco se observaron diferencias al comparar las frecuencias de los tres genotipos entre las madres de los casos y de los 130 controles de Holguín, sin embargo; sí se observaron diferencias significativas cuando se comparó la frecuencia del genotipo TT entre las madres de los casos y de los 173 controles procedentes de ambas provincias. (Anexo 3)

#### 4.4.2.1 Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo MTHFR C677T en los diferentes tipos de defectos congénitos sensibles a la deficiencia materna de ácido fólico

Las frecuencias genotípicas más elevadas para el genotipo mutado TT se observaron entre las madres de casos con DTN, seguido de las HLP y las CCCT, mientras que las frecuencias alélicas más altas para el alelo mutado T se constataron entre las madres de hijos con DTN, CCCT y SD. La distribución de frecuencias de los genotipos y los alelos en la muestra de casos con diferentes DC fue homogénea. (Tabla 3)

#### 4.4.3 Estudios de asociación genética del polimorfismo C677T en la muestra total y por defectos congénitos específicos

En la Tabla 4 se muestran los diferentes modelos de asociación genética en el polimorfismo C677T del gen MTHFR en la totalidad de los casos y los controles, donde se observaron diferencias significativas en el modelo de codominancia TT versus (vs) CT [OR 2,57(IC 95% 1,06-6,23) ( $p=0,033$ )] y en el modelo recesivo TT vs CT + CC [OR 2,48 (IC) 95% 1,06 -5,80) ( $p=0,031$ )].

En la Tabla 5 se observa que no existieron diferencias significativas en ninguno de los modelos de asociación genética para las CCCT.

En la Tabla 6 se muestran los estudios de asociación genética para las madres de productos con DTN. Se observaron asociaciones significativas entre el alelo T y estos defectos congénitos, en tres modelos genéticos de codominancia TT vs CC [OR 4,87 (IC 95% 1,31-18,06), (TT vs CT) y (CC vs TT), así como en los modelos de recesividad TT vs CT + CC [OR 3,88 (IC) 95% 1,22-12,35)] y en el modelo aditivo (T vs C). Cuando se analizó la asociación para el modelo

CC vs TT, el OR: 0,21 (IC 95% 0,05-0,76)  $p= 0,011$ , mostró un efecto protector para la ausencia del alelo T.

No se encontró asociación significativa en ninguno de los análisis de los diferentes modelos de asociación genética en las madres de los casos con HLP. (Tabla 7).

En la Tabla 8 se observa que el genotipo de riesgo 677TT no se identificó en ninguna de las madres con descendencia afectada por GS y, solamente en dos de ellas, se constató la presencia del genotipo heterocigótico 677CT. Tampoco se evidenció asociación significativa en ninguno de los modelos analizados. El 80 % de las madres de los casos no presentaron el alelo T, en dosis única ni en doble dosis.

De igual forma, en ninguno de los análisis de los diferentes modelos de asociación genética de las madres de los casos con SD se encontró asociación significativa. (Tabla 9)

#### **4.4.4 Relación entre los genotipos del polimorfismo C677T y otras variables de riesgo**

Al relacionar los diferentes genotipos maternos con las variables de riesgo, con independencia de la condición de ser caso o control, se observó que en todas las variables las frecuencias fueron superiores en el genotipo TT, se constataron diferencias significativas entre la presencia de hipersegmentación neutrofílica, niveles de riesgo de Hcis e hiperhomocisteinemia entre los diferentes genotipos. (Tabla 10).

En el Anexo 4, el análisis de la frecuencia de las variables de riesgo entre las madres de los casos incidentes, prevalentes y en las de los 43 controles procedentes de Villa Clara en las que se realizó el genotipaje del polimorfismo C677T, se constataron diferencias significativas en la hipersegmentación neutrofílica, hiperhomocisteinemia, niveles bajos de Zn, Fe y Mg, niveles elevados de Cu, así como la deficiencia de varios micronutrientes. En todas las variables las diferencias fueron a expensas de mayor frecuencia en los casos incidentes.

Todas estas variables tuvieron el mismo comportamiento en la muestra total de la investigación, entre el conjunto de madres de casos respecto a las de los controles, con excepción de la hipersegmentación neutrofílica.

En la muestra genotipada la presencia del alelo de riesgo, en estado homocigoto o heterocigoto (TT o CT) no fueron diferentes entre madres de casos incidentes, prevalentes y controles. (Anexo 4).

#### 4.4.4.1 Concentraciones maternas de Homocisteína según genotipo del polimorfismo C677T

Las concentraciones de Hcis más elevadas se constataron en las mujeres con el genotipo mutado TT (18,40  $\mu\text{mol/L}$ ), seguido de aquellas con genotipo heterocigótico con la presencia del alelo de riesgo T, mientras que en aquellas con genotipo CC tuvieron niveles de Hcis 3,5 veces más bajos (5,28  $\mu\text{mol/L}$ ), diferencias que resultaron altamente significativas. (Figura 1)

#### 4.4.5 Análisis conjunto de las variables epidemiológicas, analíticas y moleculares

En una primera evaluación conjunta del efecto de 26 variables epidemiológicas, analíticas y el polimorfismo, donde se incluyeron las 133 madres de los casos y controles en las que se obtuvieron resultados del genotipaje, el porcentaje global de clasificación correcta fue de 85,7%; 90,0% en los casos y 76,7% en los controles. De las ocho variables incluidas en la ecuación, cinco resultaron significativas: periodo intergenésico corto, consumo deficiente de folatos, madre adolescente, no consumo preconcepcional de ácido fólico y deficiencia múltiple de micronutrientes. (Anexo 5)

En otro análisis donde se incluyeron, además de las variables anteriores, los niveles de riesgo de Hcis y la hiperhomocisteinemia, para un total de 28 variables en 83 madres que se les realizó la determinación de Hcis y genotipaje, el porcentaje global de clasificación correcta fue de 83,1%; 77,6% en los casos y 91,2% en los controles. De las siete variables incluidas en la ecuación, en cuatro se observó significación estadística, estas fueron: consumo de tabletas anticonceptivas, consumo deficiente de folatos, consumo de otros antagonistas del ácido fólico y umbral de riesgo para la Homocisteína. (Anexo 6)

### 4.5 Discusión

#### 4.5.1 Estudio del equilibrio génico de Hardy Weinberg en el polimorfismo C677T

Las investigaciones que evalúan equilibrio génico y los análisis para detectar asociación genética en diferentes polimorfismos, como regla son realizadas en estudios colaborativos que incluyen muestras procedentes de varias poblaciones, lo que se fundamenta en la necesidad de muestras numerosas. (242) (243) (244) Más recientemente se buscan también diferentes poblaciones para realizar lo que se conoce como estudios de mapeo de mezclas. (245)

Aún con la inclusión del resultado del genotipaje de los controles de dos provincias cubanas, el número de controles resulta bajo al compararlo con estudios multicéntricos que incluyen cifras de tres dígitos o más. (242) (243) (244)

La comprobación de existencia de equilibrio génico en la muestra que se decidió sería utilizada como control, es considerada definitoria para poder efectuar estudios de asociación genética, toda vez que, de no cumplirse este presupuesto, los estudios de asociación no se hubieran podido realizar, por la imposibilidad de ser interpretados cabalmente, ya que no sería posible inferir como cierta la existencia de asociación preferencial del alelo de riesgo al DC en estudio, ni descartar que fuera debida a la presencia de algunos factores que alteran este equilibrio en las poblaciones. (241)

Al comprobarse la existencia de equilibrio de Hardy Weinberg tanto en la muestra control procedente de Villa Clara, como en la muestra control procedente de Holguín por separado, comprobar que no existían diferencias en el comportamiento de ambas muestras controles por separado al compararlas con las madres de los casos de esta investigación, así como el resultado de que no se encontraron diferencias en las frecuencias genotípicas observadas entre los controles de ambas poblaciones, lo que, junto a una composición étnica similar en dichas provincias, permitió disponer de los requisitos necesarios para proceder a la unificación de ambas muestras controles para llevar a cabo el estudio de asociación genética proyectado.

#### **4.5.2 Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C677T**

En el presente estudio, más de la mitad de las personas del grupo control son heterocigotas 677CT y alrededor de un seis por ciento son homocigotas 677TT. La frecuencia alélica del alelo mutado T fue superior en el grupo de casos que en los controles. Resultado similar al encontrado por Nauman (73) en estudio de casos y controles realizado en Pakistán, donde la frecuencia de los genotipos TT y CT fue mayor entre las 109 mujeres con descendencia afectada por DC que en las 100 mujeres del grupo control, también la frecuencia del alelo T fue superior a la del alelo C en los casos.

El gen MTHFR presenta una gran heterogeneidad genética alélica, aproximadamente el 90% de la población europea presenta alguna de las variantes con una frecuencia mayor al 1%. La variante polimórfica más comúnmente estudiada y que más influye en la reducción de la forma biológicamente activa del ácido fólico es la C677T (rs1801133). (69)

La frecuencia de heterocigotos 677CT observada en el grupo control resulta discretamente inferior a la identificada en un estudio poblacional realizado en Colombia (52,6%), mientras que la frecuencia de individuos homocigóticos para el alelo de riesgo T en la población colombiana duplica (13,2%) a la constatada en el presente estudio. (239)

Las personas con genotipo heterocigoto CT y homocigoto TT tienen aproximadamente entre 30-35% y 60- 70% de reducción de la actividad enzimática de MTHFR in vitro, respectivamente. (9) (230)

En las poblaciones indígenas de México y América Central se describen frecuencias muy elevadas del alelo T. En una investigación realizada con el objetivo de explorar una hipótesis evolutiva para esta elevada frecuencia de un alelo que se ha relacionado con efectos clínicos deletéreos, como algunos DC, eventos cardiovasculares y determinados tipos de cáncer los investigadores observaron que la frecuencia del alelo T decrece del Sudeste al Noroeste y se correlacionó significativamente con la longitud, latitud, altitud e intensidad de la irradiación solar. Se plantea hipotéticamente que los altos niveles de folatos característicos de la dieta de estas poblaciones pudiesen mitigar el efecto negativo que pudiera tener la presencia del genotipo homocigótico para el alelo mutado en estas poblaciones. (246)

#### 4.5.2.1 Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C677T en los diferentes tipos de defectos congénitos sensibles a la deficiencia materna de ácido fólico

En las madres de los casos con DTN se observaron las frecuencias genotípicas más elevadas del genotipo homocigoto 677TT, coincidente con lo descrito por Cai, (136) aunque este investigador constató además, que las madres con genotipo heterocigótico 677CT también presentaron riesgo de tener descendencia con DTN.

En el presente estudio se observó que las madres con el alelo mutado 677T tenían un mayor riesgo de tener DTN en la progenie, que aquellas con el alelo salvaje 677C, consistente con lo descrito por otros investigadores, quienes identifican una mayor frecuencia del menor alelo del polimorfismo C6677 en las madres de los casos con DTN que en la de los controles. (73) (247)

Existen, sin embargo; inconsistencias entre los diferentes estudios, para algunos investigadores el polimorfismo MTHFR C677T constituye un factor de riesgo para los DTN y para otros no, lo cual puede estar en relación a diferentes ajustes de las variables, además de que se requieren tamaños muestrales mucho mayores para poder obtener resultados más robustos. (13)

Fang (247) en un estudio de casos y controles comparó las frecuencias genotípicas y alélicas de 152 pacientes con DTN y 169 controles sanos y observaron que para el polimorfismo MTHFR C677T el riesgo de presentar DTN se incrementa significativamente en los pacientes con el alelo T o con el genotipo TT. También en un meta-análisis realizado por investigadores chinos, que incluyó 1500 casos y 1650 controles, concluyeron que el polimorfismo materno MTHFR C677T se asoció significativamente con el riesgo de tener descendencia con DTN. (248)



Por el contrario, en un estudio realizado en el oeste de México no se encontraron evidencias de que el estado de homocigocidad o heterocigocidad materno para la variante polimórfica MTHFR C677T estuviera asociada a la presencia de DTN en la descendencia. (249)

Luego de los DTN, las frecuencias genotípicas más elevadas del genotipo 677TT se observaron entre las madres de los casos con HLP y de las CCCT. El tubo neural, la cavidad oral y el tracto de salida del corazón están embriológicamente relacionados, de hecho, las células de la cresta neural que contribuyen a la formación de los dientes y la región orofacial se originan de las regiones dorsolaterales del tubo neural, mientras que los DC del corazón y de las grandes arterias tienen un origen embriológico común, ya que también derivan de las células cardíacas de la cresta neural y del segundo campo cardíaco. (26) (27) (242)

El paladar hendido y el LL con paladar hendido son DC diferentes pero relacionados, que comparten varios hallazgos clínicos y probablemente agentes causales. (242)

Se han realizado varios estudios que evalúan la asociación del polimorfismo materno MTHFR C677T y la presencia de HLP en la descendencia con resultados contradictorios, así investigadores italianos encontraron que el genotipo 677TT en las madres, incrementó el riesgo de presentar hendidura labial con o sin paladar hendido en la descendencia. (250) Sin embargo, estos mismos investigadores cuando realizaron un estudio de base familiar de tres SNP relacionados con la vía metabólica del AF, entre ellos el MTHFR C677T, en 129 familias italianas y 65 familias asiáticas con PH aislado, no encontraron evidencias de asociación entre este polimorfismo y la presencia del DC en la descendencia. (242)

De igual forma, en un reciente meta-análisis con el objetivo de evaluar la asociación del polimorfismo MTHFR C677T y la presencia de HLP, que incluyó 4710 casos con HLP y 7271 controles, no se encontró asociación entre la presencia este SNP en las madres y la presencia del DC en la descendencia. (251) Incluso en otro estudio, la presencia el alelo 677T de este polimorfismo en niños, pareció tener un efecto protector para la aparición de HLP en una muestra poblacional de Asia. (243)

Debido a que el gen MTHFR desempeña un papel fundamental en el metabolismo del folato mediante la afectación global de los patrones de metilación del ADN, lo que resulta esencial para el desarrollo embrionario y para la formación del sistema cardiovascular, ha centrado la atención como un factor de riesgo genético para las CC. (24) (42) (252)

En la literatura aparecen resultados de múltiples estudios que evalúan la asociación el polimorfismo C677T y la presencia de CC, pero existen controversias a la hora de arribar a conclusiones específicas. (74) En tal sentido, investigadores chinos realizaron un meta-análisis donde concluyeron que el alelo de riesgo T constituye un factor de riesgo genético para la aparición de cardiopatías congénitas en la descendencia. (70)

Las frecuencias génicas para el alelo T y genotípicas para el genotipo homocigótico TT en las madres de los casos con CCCT en el presente estudio son inferiores a las observadas en un estudio de casos y controles de base hospitalaria realizado por Wang, (252) quien identificó una frecuencia alélica para 677T de 0,49 y una frecuencia del genotipo homocigótico TT de 0,31 en madres de casos con CCCT, aunque los autores reconocen que por tratarse de un estudio de base hospitalaria puede no ser representativo de la población general.

Sin embargo, en un meta-análisis de base familiar que incluyó 19 estudios con 4219 casos y 20 123 controles, se encontró una asociación significativa entre el genotipo materno TT y la presencia de CC en la descendencia. [OR: 1,52 (1,09–2,11) p=0,01]. (253)

Una investigación que evaluó la presencia del polimorfismo MTHFR C677T en ambos progenitores, encontró que la presencia del genotipo 677TT, tanto en las madres como en los padres, estuvo asociado al riesgo de presentar un grupo de CC en la descendencia, con excepción de los defectos septales ventriculares. (74)

En el presente estudio las frecuencias génicas más altas para el alelo 677T se observaron en las madres de los casos con DTN y CCCT, seguido de aquellas con descendencia con SD, a tono con lo referido por Guo (74) respecto a que la mutación 677C>T es un factor de riesgo para los DTN y para el SD, lo que se explica por el hecho de que el gen MTHFR resulta clave para el mantenimiento de la heterocromatina, un determinante crucial para la estabilidad genómica y una segregación cromosómica precisa. (65)

La deficiencia de AF y los polimorfismos del gen MTHFR originan alteraciones en la metilación del ADN y en la segregación cromosómica. La hipometilación del ADN centromérico ha sido sugerido como mecanismo causal de la no disyunción meiótica. Las irregularidades en el patrón de metilación de los centrómeros conllevan a la formación aberrante de los cinetocoros, que resulta en una segregación anormal de los cromosomas. (68)

Aunque en la literatura científica no existe un consenso sobre la relación entre los diferentes polimorfismos del gen MTHFR y la aparición de SD, existen estudios en diferentes poblaciones donde se observó asociación (254) y otras en las que no. (255)

La no identificación del genotipo de riesgo 677TT en las madres con descendencia afectada por GS en el presente estudio, puede deberse a que se solamente se genotiparon 10 mujeres con hijos con este DC y la baja frecuencia del alelo mutado en la población.

Existen numerosos artículos en la literatura científica sobre la asociación de este DC folato-sensible y el polimorfismo en estudio, los que se refieren en el próximo epígrafe. El hecho de encontrar un posible efecto protector del alelo C, para las madres de hijos con GS, dado porque el porcentaje de madres con genotipo CC fue mayor entre las madres de los casos que entre las de los controles, es una evidencia indirecta del riesgo asociado al alelo T.

#### 4.5.3 Estudios de asociación genética del polimorfismo C677T

Las asociaciones alélicas encontradas para la presencia del alelo de riesgo 677T, en las madres de productos con DC sensibles a la deficiencia materna de AF, coincide con lo referido en la literatura donde se considera este polimorfismo como riesgo genético para una mayor susceptibilidad de ocurrencia de dichos defectos. (70) (71) (76) La mayoría de los estudios publicados provienen de estudios de DC particulares. (70) (71) (76) (249) (254) No se encontraron evidencias de estudios para el conjunto de cinco DC incluidos en el presente estudio.

La asociación, que se hizo evidente en los modelos de codominancia (TT vs CT) y en el modelo recesivo (TT vs CT + CC), también ha sido la más frecuentemente observada, si bien en estudios de algunos de estos DC (256) (257) y no en la totalidad, como se refirió antes, lo que puede considerarse un enfoque novedoso.

Las evidencias de que las madres de los casos con DTN mostraran diferencias significativas en los modelos de codominancia TT vs CC y TT vs CT, así como en los modelos recesivo y aditivo, indican asociación entre la presencia del alelo T en su estado homocigoto y la aparición de los DTN. El término codominante implica que los tres genotipos (CC, CT y TT) pueden tener diferentes riesgos fenotípicos asociados. (241)

La evidencia de asociación entre el alelo C en estado de homocigocis y la condición de ausencia del DC, en el modelo de codominancia CC vs TT, indica que en el presente estudio la ausencia del alelo de riesgo T se comporta como un factor protector para los DTN.

En un meta-análisis que incluyó 13 estudios que incluyeron 1500 casos (madres con descendencia afectada por DTN) y 1654 controles, donde se observó que el riesgo combinado para los DTN en la descendencia de las madres en el modelo recesivo (TT vs CT+CC) y en el modelo aditivo (T vs C) fue de 1,65 y 1,39; respectivamente. (248)

En los Países Bajos, entre el 14% y el 16% de las madres y entre el 10% y el 15% de los padres con hijos con espina bífida y, entre el 3% al 18% de estos niños presentan el genotipo homocigótico para el alelo de riesgo T, mientras que la incidencia de esta mutación en el gen MTHFR en la población sana es de solo el 5%. (258)

En el presente estudio en ninguno de los análisis de los modelos de asociación genética de las madres de los casos con CCCT se encontró asociación significativa, lo que difiere con lo observado por Shi (13) quien encontró que el polimorfismo materno C677T incrementó significativamente el riesgo de CC en la descendencia en un 524% [OR: 6,24 (2,87- 13,56)] en el modelo recesivo.

De igual forma, en un meta-análisis realizado con el objetivo de evaluar la asociación de este polimorfismo materno con la presencia de CC en la descendencia, se observó un incremento del riesgo en los modelos recesivo [OR: 1,69 (1,25-2,30)], aditivo [OR: 1,32 (1,14- 1,53)], dominante [OR: 1,35 (1,11-1,64)], modelos codominantes heterocigoto (TT vs CT) y homocigoto (TT vs CC) con [OR: 1,20 (1,01-1,41)] y [OR: 1,75 (1,31-2,33)], respectivamente. (256)

En otro meta-análisis se analizó la presencia de este polimorfismo como potencial factor de riesgo, pero en este caso en población pediátrica y se constató asociación entre el polimorfismo MTHFR C677T y la presencia de CC en todos los modelos de asociación genética evaluados. Se concluye que este polimorfismo constituye un factor de riesgo genético asociado a la aparición de CC en la población pediátrica en China. (244)

Otros investigadores, en estudios de interacción gen-ambiente, informan asociación entre el modelo recesivo (TT vs CC+CT) en la descendencia y la ocupación de las madres y el consumo de medicamentos durante la gestación. (257)

La no identificación de significación asociada en las madres con descendencia afectada por HLP en ninguno de los siete modelos de asociación genética realizados, concuerda con investigadores chilenos quienes no encontraron asociación entre el polimorfismo C677T del

gen MTHFR, los niveles de metilación del ADN y la presencia de HLP en 95 casos con este tipo de DC e igual cantidad de controles. (259)

En el Sur de la India, Addulla (260) encontró una baja frecuencia del alelo 677T de este polimorfismo, tanto en el grupo de casos con HLP como en los controles, las frecuencias del genotipo homocigoto 677TT y del heterocigoto 677CT fueron de 16%, tanto en casos como en los controles, no evidenciándose asociación en ninguno de los modelos.

Sin embargo, en un meta-análisis que incluyó a 38 estudios con 6525 niños con HLP y 8606 controles se constató asociación entre el polimorfismo C677T y la presencia de HLP en poblaciones caucásicas y mestizas, pero no en poblaciones asiáticas. (76)

También Rai (78) en un meta-análisis realizado en el año 2015 encontró una fuerte asociación entre el polimorfismo MTHFR C677T y la presencia de HLP en todos los modelos de asociación genética estudiados, excepto para el modelo codominante homocigótico. Modelo aditivo T vs. C [OR = 1,24 (1,1–1,4)], modelo dominante para TT + CT vs. CC: [OR = 1,29 (1,04–1,59)], modelo codominante CT vs. CC: [OR = 1,26 (0,98–1,63)]; modelo recesivo TT vs. CT + CC: [OR = 1,36 (1,05–1,74)]; y modelo codominante para TT vs. CC: [OR = 1,02 (0,74–1,4)].

La no identificación de asociación entre la presencia del polimorfismo C677T en las madres y la presencia de GS en la descendencia en el presente estudio, coincide con Katlan, (261) quien alega que este polimorfismo se asocia a una serie de DC de la línea media, como los DTN, las HLP y la GS.

Múltiples investigaciones han evaluado la asociación entre la presencia de este DC con diferentes factores de riesgo ambientales, aunque como DC de origen multifactorial también se invocan factores genéticos en su origen. (192) (194) Así, Salinas (82) en un meta-análisis donde incluyó siete estudios sobre asociación genética publicados entre los años 1980 y 2017, donde se estudiaron 34 SNP en 24 genes, encontraron asociación significativa en cuatro polimorfismos en tres genes relacionados con la regulación de la tensión arterial, concluyendo que esta evidencia apoya la hipótesis de una disrupción vascular en el origen de este DC.

Otros investigadores describen asociación entre SNP en genes relacionados, además de con la tensión arterial, con los procesos de angiogénesis, migración endotelial y remodelación vascular; concluyendo que estos hallazgos están a tono con lo referido en la literatura respecto

a que las alteraciones placentarias, como la corangiosis y la vacuolización del amniocito, asociado con la hipoxia fetal crónica y la disrupción vascular en casos de GS. (262)

En el genotipaje de las madres con descendencia afectada con síndrome Down, en la presente investigación, no se evidenció asociación en ninguno de los siete modelos genéticos analizados, lo que coincide con un meta-análisis que incluyó cinco estudios, donde el análisis de cuatro modelos de asociación genética sugiere que el polimorfismo MTHFR C677T no contribuyó al riesgo de SD. (263)

Contrario a lo constatado por Rai (68) quien en meta-análisis que incluyó a 3098 madres de casos con SD y 4852 controles, luego de estimar el OR bajo cinco modelos de asociación genética encontró asociación entre el SNP rs1801133 y la presencia de SD en la descendencia en todos los modelos de asociación genética, excepto en el modelo recesivo (para T vs. C, OR=1.26 (1.09–1.46, p=0.001); para TT vs. CC, OR=1.49 (1.13–1.97, p=0.008); para CT vs. CC, OR=1.29 (1.10–1.51, p=0.001); para TT+CT vs. CC, OR=1.35 (1.13–1.60, p=0.0008); y para TT vs. CT+CC, OR=0.76 (0.60–0.94, p=0.01).

Excepto para la avanzada edad materna, los factores de riesgo maternos para la no disyunción meiótica no están bien establecidos. A comienzos del siglo XXI el resultado de un estudio preliminar sugirió que el polimorfismo C677T del gen MTHFR podría ser un factor de riesgo materno para el SD. (264)

Estos resultados sustentan el criterio de que el SNP materno C677T constituye un factor de riesgo para la presencia de SD en la descendencia, por lo que no encontrar asociación en ninguno de los siete modelos analizados en la presente investigación, podría estar motivado por el reducido número de madres a las que se les realizó el genotipaje del polimorfismo.

#### **4.5.4 Relación entre los genotipos del polimorfismo C677T y otras variables de riesgo en el análisis bivariado y multivariado**

El comportamiento similar de las variables de riesgo en los dos estudios de asociación, uno la asociación encontrada en la muestra genotipada entre madres de casos incidentes y prevalentes de conjunto, respecto a las de los controles, y la otra la de los resultados del estudio de asociación en la muestra total entre madres de casos incidentes y prevalentes de conjunto, respecto a las de los controles refleja que no existen evidencias para dudar que la asociación genética significativa encontrada en la muestra genotipada, fuese diferente a lo que cabría

esperar para la muestra conjunta, si se hubiera podido genotipar la totalidad de las madres incluidas en el estudio.

Las variables de riesgo que fueron significativas fueron coincidentes en ambos estudios de asociación; con excepción de la hipersegmentación neutrofílica, variable hematológica considerada como un marcador indirecto de la deficiencia de AF, cuya deficiencia se relaciona con polimorfismos de genes involucrados en su metabolismo, como el MTHFR.

Se han descrito más de 40 polimorfismos del gen MTHFR y entre ellos, el C677T es el más estudiado y clínicamente más importante. (68) (74)

El genotipo mutado TT observado con mayor frecuencia en mujeres con hipersegmentación neutrofílica, niveles de riesgo de Hcis e Hiperhomocisteinemia, se explica porque esta variante polimórfica se ha asociado con una disminución de la actividad enzimática y un incremento de los niveles de Hcis. (68) (74)

En los análisis multivariados, las variables que resultaron significativas, se relacionan con los niveles bajos de AF, como el periodo intergenésico corto, el consumo deficiente de folatos, no consumo preconcepcional de AF, embarazo en la adolescencia, el consumo de tabletas anticonceptivas y de otros antagonistas del AF. Nauman (73) encontró que tanto el genotipo homocigótico materno TT, como el heterocigoto CT, se asociaron significativamente con las bajas concentraciones de AF, comparadas con las madres sin el polimorfismo.

Tanto la deficiencia de AF como de cobalamina pueden generar cambios morfológicos y funcionales en los eritrocitos generando células inmaduras de mayor tamaño, hipersegmentación nuclear de neutrófilos, así como niveles elevados de Hcis. Por ello, la hiperhomocisteinemia, la anemia macrocítica y la hipersegmentación neutrofílica, se consideran indicadores indirectos del estado del folato. (206) (208) (239)

En una investigación realizada en Colombia, el polimorfismo MTHFR C677T se asoció con los bajos niveles séricos de AF y particularmente el genotipo homocigótico TT, aumentó en 2,24 veces la probabilidad de presentar bajos niveles de AF (1,85 – 2,70,  $p < 0,001$ ). (239)

Mientras que, investigadores paquistaníes observaron que la combinación de los genotipos heterocigotos y homocigotos 677CT+TT puede aumentar la probabilidad de deficiencia de AF, con OR= 4,84 (2,80–8,37) en comparación con el genotipo silvestre 677CC. (265)

Sin embargo, la relación entre el polimorfismo MTHFR C677T y los niveles de Hcis total no están del todo claros, para algunos autores la presencia del polimorfismo no se relaciona con los niveles de Hcis, a menos que exista un bajo consumo de folato. (87)

Shi y otros investigadores chinos (13) encontraron que el polimorfismo materno MTHFR rs1801133 se asoció significativamente con los niveles elevados de Hcis, especialmente el genotipo homocigoto 677TT, sin diferencias significativas entre el grupo de mujeres con suplementación de AF o multivitaminas y las que no lo consumían.

En el presente estudio la homogeneidad de la distribución de la deficiencia materna de micronutrientes en los diferentes genotipos, está a tono con lo observado por Nguyen, (266) quien no encontró asociación entre los niveles maternos de micronutrientes y el polimorfismo MTHFR C677T con la presencia de DTN en la descendencia, sin embargo; en la presente investigación en el análisis multivariado la deficiencia de múltiples micronutrientes aparece entre las variables incluidas en el modelo de regresión.

#### 4.5.4.1 Concentraciones maternas de Homocisteína según genotipo del polimorfismo C677T

Las concentraciones más elevadas de Hcis en las madres con el genotipo homocigoto para el alelo mutado (677TT), se relaciona con el hecho de que el polimorfismo MTHFR C677T es una de las causas fundamentales de hiperhomocisteinemia y, entre un 10% a un 20% de los casos con esta condición son individuos homocigotos TT.

Al comparar con el genotipo CC, el genotipo TT solo exhibe entre el 10% al 30% de actividad enzimática, mientras que el genotipo heterocigoto 677CT tiene alrededor de un 60% de función enzimática. (87)

Estos resultados son coherentes con los de un meta-análisis que evaluó la asociación entre este polimorfismo y las concentraciones de AF, se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de AF entre los diferentes genotipos (CC>CT>TT). (267)

Resulta biológicamente plausible considerar que la insuficiente concentración de 5-MTHFR enlentece la remetilación de homocisteína a metionina e incrementa las concentraciones intracelulares de Hcis y sus niveles sanguíneos.

Se ha estudiado la asociación de cambios en la metilación del ADN sitio-específicas y la interacción entre la hiperhomocisteinemia ligera y el polimorfismo MTHFR C677T. En un meta-análisis que incluyó dos estudios de cohorte en Reino Unido y Holanda, encontraron 13



sitios de metilación en ocho diferentes cromosomas asociados con este polimorfismo y los niveles de Hcis.

En los datos del Registro del Reino Unido se observó una correlación negativa entre la metilación genómica y las concentraciones de Hcis, en los sujetos con genotipo CT o TT, pero no en aquellos con genotipo CC, mientras que en la cohorte de Rotterdam no se evidenció asociación entre los niveles de metilación genómica y los niveles de Hcis. (268)

La hipótesis de que la hiperhomocisteinemia ligera debido a mutaciones en el gen MTHFR se asocia a amplios cambios en los patrones de metilación en el ADN no fue confirmada en un estudio de cohorte, donde se evaluaron los niveles de metilación del ADN en leucocitos de individuos de ancestros europeos. (269)

#### **4.5.5 Análisis de la influencia conjunta de variables epidemiológicas, analíticas y del resultado del genotipaje en el riesgo de aparición de los DC folato-sensibles**

Todas las variables que quedaron incluidas en los dos modelos de regresión logística, están relacionadas con deficiencias maternas nutricionales de AF u otros micronutrientes, expresadas como variables nutricionales (periodo intergenésico corto, consumo deficiente de folato, madre adolescente, no consumo preconcepcional de AF, consumo de tabletas anticonceptivas y otros antagonistas de AF), detectadas a través de cuestionario o de resultados analíticos (deficiencia múltiple de micronutrientes y niveles de riesgo de Hcis).

En opinión del autor, la inclusión de estas variables en los modelos, evidencia su fortaleza en la asociación con los DC bajo estudio y su poder discriminante. Las que, por otra parte, se encuentran con mayor prevalencia en la muestra de estudio.

Su consistencia es notoria, al quedar incluidas en todas las ecuaciones de regresión obtenidas en la presente investigación atestiguando la contribución multifactorial en la génesis de estos defectos.

En dichos modelos se había considerado junto a las variables epidemiológicas, nutricionales y analíticas, el genotipo 677TT, con el interés de evaluar el efecto potenciador de éstas y su interrelación en la cadena causal.

La no inclusión del genotipo TT se puede explicar porque no todas las complejas interacciones biológicas que pueden darse en la patogénesis de estos DC, pueden tener una traducción a nivel de un determinado modelo estadístico evaluado. La frecuencia del genotipo TT de 0,14 en las madres de los casos sería otra explicación plausible.

#### 4.6 Conclusiones parciales

- 1- La frecuencia del genotipo homocigótico mutado es mayor en mujeres con descendencia afectada por defectos congénitos folato-sensibles, en particular los defectos del tubo neural, hecho potencialmente relacionado con la disminución descrita para la actividad enzimática de la MTHFR en este genotipo.
- 2- Existe un resultado coherente con la literatura científica respecto a que las madres con genotipo 677TT presentan niveles elevados de homocisteína e hipersegmentación neutrofílica, dado que este genotipo se asocia significativamente con los bajos niveles de ácido fólico y es una de las causas fundamentales de hiperhomocisteinemia.
- 3- Los modelos de interacción alélica de codominancia y recesividad ofrecen mayores oportunidades para la detección de las asociaciones del polimorfismo C677T a los defectos congénitos sensibles a la deficiencia materna de ácido fólico en la provincia de Villa Clara.
- 4- Los análisis multivariados evidencian una importante contribución de variables relacionadas con deficiencia materna de ácido fólico y otros micronutrientes, como el periodo intergenésico corto, el consumo deficiente de folatos, no consumo preconcepcional de ácido fólico, embarazo en la adolescencia, el consumo de tabletas anticonceptivas y de otros antagonistas del ácido fólico, deficiencia múltiple de micronutrientes y niveles de riesgo de Hcis.

## TABLAS Y GRÁFICOS DEL CAPÍTULO 4

Tabla 1. Análisis del equilibrio génico para el polimorfismo C677T en el grupo de controles.

Genotipos	Frecuencia Genotípica Observada		Frecuencia Genotípica Esperada		X <sup>2</sup>	
	N	%	N	%	Valor	p
CC	75	43,35	81	46,82	$x^2 = \sum \frac{(F_o - F_e)^2}{F_e}$	3,41 0,22
CT	87	50,29	75	43,35		
TT	11	6,35	17	9,83		
Total	173	100,00	173	100,00		
$\frac{(F_oCC - F_eCC)^2}{F_eCC}$	0,33					
$\frac{(F_oCT - F_eCT)^2}{F_eCT}$	1,62					
$\frac{(F_oTT - F_eTT)^2}{F_eTT}$	1,46					

F<sub>o</sub>: Frecuencias observadas según genotipo. F<sub>e</sub>: Frecuencias esperadas según genotipo. Fuente: Base de datos de la investigación.

Tabla 2. Frecuencias genotípicas y alélicas en casos y controles. Villa Clara 2013-2018.

Grupos	Genotipos (Frecuencia Genotípica)				Alelos (Frecuencia alélica)		
	CC	CT	TT	n	C	T	N
Casos	37 (0,41)	40 (0,44)	13 (0,14)	90	114 (0,63)	66 (0,37)	180
Controles	75 (0,43)	87 (0,50)	11 (0,06)	173	237 (0,68)	109 (0,32)	346
P	0,793	0,435	0,041		0,242	0,242	

Fuente: Base de datos de la investigación.

Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C677T del gen MTHFR en los diferentes tipos de defectos congénitos. Villa Clara 2013 – 2018.

Fuente: Base de datos de la investigación.

Grupos de DC	Genotipos (Frecuencia Genotípica)				X <sup>2</sup>			Alelos (Frecuencia alélica)			X <sup>2</sup>	
	CC	CT	TT	n	Valor	p	C	T	N	valor	p	
CCCT	8 (0,36)	11 (0,50)	3 (0,14)	22	8,86	0,354	27 (0,61)	17 (0,39)	44	2,61	0,624	
DTN	7 (0,29)	12 (0,50)	5 (0,21)	24			26 (0,54)	22 (0,46)	48			
HLP	8 (0,44)	7 (0,39)	3 (0,17)	18			23 (0,64)	13 (0,36)	36			
GS	8 (0,80)	2 (0,20)	0 (0,00)	10			18 (0,90)	2 (0,10)	20			
SD	6 (0,38)	8 (0,50)	2 (0,12)	16			20 (0,62)	12 (0,38)	32			

Tabla 4. Estudios de asociación genética del polimorfismo C677T del gen MTHFR en las madres de casos y controles. Villa Clara 2013 – 2018.

Modelos de asociación	Genotipos (%)			OR (95% IC)	X <sup>2</sup>	
	TT	CT	CC	TT vs CC	Valor	p
Modelo de Codominancia						
Casos	13 (14,44)	40 (44,44)	37 (41,11)	2,40 (0,97 – 5,85)	3,77	0,052
Controles	11 (6,36)	87 (50,29)	75 (43,35)			
Modelo de Codominancia						
				<b>TT vs CT</b>		
				2,57 (1,06 – 6,23)	4,52	<b>0,033</b>
Modelo de Codominancia						
				<b>CT vs CC</b>		
				0,93 (0,54 – 1,60)	0,06	0,799
Modelo de Codominancia						
				<b>CC vs TT</b>		
				0,41 (0,17 – 1,02)	3,77	0,052
Modelo de Dominancia						
	<b>CT + TT</b>	<b>CC</b>		<b>CT + TT vs CC</b>	0,12	0,727
Casos	53 (58,89)	37 (41,11)		1,09 (0,65 – 1,83)		
Controles	98 (56,65)	75 (43,35)				
Modelo Recesivo						
	<b>TT</b>	<b>CT + CC</b>		<b>TT vs CT + CC</b>	4,65	<b>0,031</b>
Casos	13 (14,44)	77 (85,56)		2,48 (1,06 – 5,80)		
Controles	11 (6,36)	162 (93,64)				
Modelo Aditivo						
	<b>T</b>	<b>C</b>		<b>T vs C</b>	1,41	0,233
Casos	66 (36,67)	114 (63,33)		1,25 (0,86 – 1,83)		
Controles	109 (31,50)	237 (68,50)				

Fuente: Base de datos de la investigación.

Tabla 5. Estudios de asociación genética en las madres de los casos con cardiopatías congénitas conotroncales. Villa Clara 2013 – 2018.

Modelos de asociación	Genotipos (%)			OR (95 % IC)	X <sup>2</sup>	
	TT	CT	CC		Valor	p
<b>Modelo de Codominancia</b>						
Casos	3 (13,64)	11 (50,00)	8 (36,80)	2,56 (0,58 – 11,12)	1,63	0,200
Controles	11 (6,36)	87 (50,29)	75 (43,35)			
<b>Modelo de Codominancia</b>				<b>TT vs CT</b>		
				2,15 (0,52 – 8,94)	1,15	0,282
<b>Modelo de Codominancia</b>				<b>CT vs CC</b>		
				1,19 (0,45 – 3,10)	0,11	0,729
<b>Modelo de Codominancia</b>				<b>CC vs TT</b>		
				0,39 (0,08 – 1,70)	1,63	0,200
<b>Modelo de Dominancia</b>						
	<b>CT + TT</b>	<b>CC</b>		<b>CT + TT vs CC</b>	0,38	0,533
Casos	14 (63,64)	8 (36,80)		1,34 (0,53 – 3,35)		
Controles	98 (56,65)	75 (43,35)				
<b>Modelo Recesivo</b>						
	<b>TT</b>	<b>CT + CC</b>		<b>TT vs CT + CC</b>	1,54	0,214
Casos	3 (13,64)	19 (86,36)		2,32 (0,59 – 9,08)		
Controles	11 (6,36)	162 (93,64)				
<b>Modelo Aditivo</b>						
	<b>T</b>	<b>C</b>		<b>T vs C</b>	0,90	0,341
Casos	17(38,64)	27 (61,36)		1,36 (0,71 – 2,62)		
Controles	109 (31,50)	237 (68,50)				

Fuente: Base de datos de la investigación.

Tabla 6. Estudios de asociación genética del polimorfismo C677T del gen MTHFR en madres de casos con defectos del tubo neural. Villa Clara 2013 – 2018.

Modelos de asociación	Genotipos (%)			OR (95 % IC)	X <sup>2</sup>	
	TT	CT	CC		Valor	p
Modelo de Codominancia				<b>TT vs CC</b>		
Casos	5 (17,00)	12 (50,00)	7 (29,17)	4,87 (1,31 – 18,06)	6,36	<b>0,011</b>
Controles	11 (6,36)	87 (50,29)	75 (43,35)			
Modelo de Codominancia				<b>TT vs CT</b>		
				3,29 (0,97 – 11,13)	3,96	<b>0,046</b>
Modelo de Codominancia				<b>CT vs CC</b>		
				1,48 (0,55 – 3,95)	0,61	0,434
Modelo de Codominancia				<b>CC vs TT</b>		
				0,20 (0,06 – 0,76)	6,36	<b>0,011</b>
Modelo de Dominancia						
	<b>CT + TT</b>	<b>CC</b>		<b>CT + TT vs CC</b>	1,73	0,187
Casos	17 (70,83)	7 (2,17)		1,86 (0,73 – 4,71)		
Controles	98 (56,65)	75 (43,35)				
Modelo Recesivo						
	<b>TT</b>	<b>CT + CC</b>		<b>TT vs CT + CC</b>	5,89	<b>0,015</b>
Casos	5 (20,83)	19 (79,17)		3,88 (1,22 – 12,35)		
Controles	11 (6,43)	162 (93,64)				
Modelo Aditivo						
	<b>T</b>	<b>C</b>		<b>T vs C</b>	3,89	<b>0,048</b>
Casos	22 (45,83)	26 (54,17)		1,83 (0,99 – 3,39)		
Controles	109 (31,50)	237 (68,50)				

Fuente: Base de datos de la investigación.

Tabla 7. Estudios de asociación genética del polimorfismo C677T del gen MTHFR en madres de casos con hendiduras labiopalatinas. Villa Clara 2013 – 2018.

Modelos de asociación	Genotipos (%)			OR (95% IC)		X <sup>2</sup>	
	TT	CT	CC	TT vs CC	Valor	p	
<b>Modelo de Codominancia</b>							
Casos	3 (16,67)	7 (38,89)	8 (44,44)	2,56 (0,58 – 11,12)	1,64	0,200	
Controles	11 (6,36)	87 (50,29)	75 (43,35)				
<b>Modelo de Codominancia</b>				<b>TT vs CT</b>			
				3,39 (0,76 – 15,05)	2,81	0,093	
<b>Modelo de Codominancia</b>				<b>CT vs CC</b>			
				0,75 (0,26 – 2,18)	0,27	0,602	
<b>Modelo de Codominancia</b>				<b>CC vs TT</b>			
				0,39 (0,09 – 1,70)	1,64	0,200	
<b>Modelo de Dominancia</b>							
	<b>CT + TT</b>	<b>CC</b>		<b>CT + TT vs CC</b>	0,008	0,929	
Casos	10 (55,56)	8 (44,44)		0,96 (0,36 – 2,54)			
Controles	98 (56,65)	75 (43,35)					
<b>Modelo Recesivo</b>							
	<b>TT</b>	<b>CT + CC</b>		<b>TT vs CT + CC</b>	2,53	0,111	
Casos	3 (16,67)	15 (83,33)		2,95 (0,74 – 11,73)			
Controles	11 (6,36)	162 (93,64)					
<b>Modelo Aditivo</b>							
	<b>T</b>	<b>C</b>		<b>T vs C</b>	0,32	0,572	
Casos	13 (36,11)	23 (63,89)		1,22 (0,60 – 2,52)			
Controles	109 (31,50)	237 (68,50)					

Fuente: Base de datos de la investigación.

Tabla 8. Estudios de asociación genética del polimorfismo C677T del gen MTHFR en madres de casos con gastrosquisis. Villa Clara 2013 – 2018.

nd: no definido. Fuente: Base de datos de la investigación.

Modelos de asociación	Genotipos (%)			OR (95 % IC)	X <sup>2</sup>	
	TT	CT	CC		TT vs CC	Valor
<b>Modelo de Codominancia</b>						
Casos	0 (0,00)	2 (20,00)	8 (80,00)	0,00 (nd)	1,15	0,284
Controles	11 (6,36)	87 (50,29)	75 (43,35)			
<b>Modelo de Codominancia</b>				<b>TT vs CT</b>		
				0,00 (nd)	0,25	0,617
<b>Modelo de Codominancia</b>				<b>CT vs CC</b>		
				0,22 (0,04 – 1,04)	4,26	0,039
<b>Modelo de Codominancia</b>				<b>CC vs TT</b>		
				Nd (nd)	1,15	0,284
<b>Modelo de Dominancia</b>						
	<b>CT + TT</b>	<b>CC</b>		<b>CT + TT vs CC</b>	5,09	0,023
Casos	2 (20,00)	8 (80,00)		0,19 (0,04 – 0,92)		
Controles	98 (57,65)	75 (43,35)				
<b>Modelo Recesivo</b>						
	<b>TT</b>	<b>CT + CC</b>		<b>TT vs CT + CC</b>	0,67	0,412
Casos	0 (0,00)	10 (100,00)		0,00 (nd)		
Controles	11 (6,36)	162 (93,64)				
<b>Modelo Aditivo</b>						
	<b>T</b>	<b>C</b>		<b>T vs C</b>	4,12	0,029
Casos	2 (10,00)	18 (90,00)		0,24 (0,05 – 1,06)		
Controles	109 (31,50)	237 (68,50)				



Tabla 9. Estudios de asociación genética del polimorfismo C677T del gen MTHFR en madres de casos con síndrome Down. Villa Clara 2013 – 2018.

Modelos de asociación	Genotipos (%)			OR (IC)	X <sup>2</sup>	
	TT	CT	CC	TT vs CC	Valor	p
<b>Modelo de Codominancia</b>						
Casos	2 (12,50)	8 (50,00)	6 (37,50)	2,27 (0,41-12,70)	0,91	0,341
Controles	11 (6,36)	87 (50,29)	75 (43,35)			
<b>Modelo de Codominancia</b>				<b>TT vs CT</b>		
				1,98 (0,37 – 10,52)	0,65	0,419
<b>Modelo de Codominancia</b>				<b>CT vs CC</b>		
				1,15 (0,38 – 3,46)	0,06	0,804
<b>Modelo de Codominancia</b>				<b>CC vs TT</b>		
				0,44 (0,08 – 2,45)	0,91	0,341
<b>Modelo de Dominancia</b>						
	<b>CT + TT</b>	<b>CC</b>		<b>CT + TT vs CC</b>	0,20	0,651
Casos	10 (62,50)	6 (37,50)		1,28 (0,44 – 3,67)		
Controles	98 (56,65)	75 (43,35)				
<b>Modelo Recesivo</b>						
	<b>TT</b>	<b>CT + CC</b>		<b>TT vs CT + CC</b>	0,86	0,354
Casos	2 (12,50)	14 (87,50)		2,10 (0,42 – 10,45)		
Controles	11 (6,36)	162 (93,64)				
<b>Modelo Aditivo</b>						
	<b>T</b>	<b>C</b>		<b>T vs C</b>	0,48	0,487
Casos	12 (37,50)	20 (62,50)		1,31 (0,62 – 2,76)		
Controles	109 (31,50)	237 (68,50)				

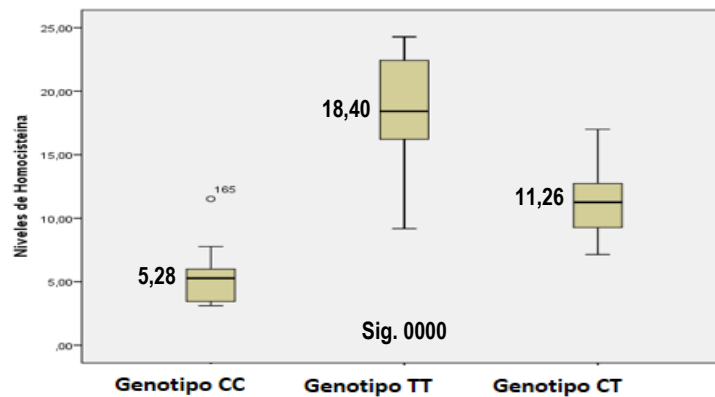
Fuente: Base de datos de la investigación.

Tabla 10. Relación entre los genotipos y otras variables de riesgo en el conjunto de madres de casos y controles villaclareños. Villa Clara 2013 – 2018.

Variables	Genotipo TT n= 16		Genotipo CC n= 56		Genotipo CT n= 61		X <sup>2</sup>	
	N	%	N	%	N	%	Valor	p
Hipersegmentación neutrofílica	9	56,25	1	1,79	5	8,20	37,96	0,000
Umbral de riesgo para Hcis	3	18,75	0	0,00	11	18,03	17,78	0,001
Hiperhomocisteinemia	9	56,25	0	0,00	1	1,64	43,53	0,000
Niveles bajos de Zn	4	25,00	7	12,50	12	19,67	1,805	0,405
Niveles altos de Cu	5	31,25	5	8,93	10	16,39	5,015	0,081
Niveles bajos de Ca	1	6,25	5	8,93	2	3,28	1,650	0,438
Niveles bajos de Mg	4	25,00	7	12,50	5	8,20	3,402	0,183
Niveles bajos de Fe	1	6,25	3	5,36	4	6,56	0,076	0,963
Deficiencia múltiple de micronutrientes	2	12,50	5	8,93	5	8,20	0,287	0,866

Fuente: Base de datos de la investigación.

Figura 1. Concentraciones de homocisteína según genotipo del polimorfismo C677T del gen MTHFR en madres de casos y controles. Villa Clara 2013 – 2018.



Genotipos	Valores de la determinación de Hcis		X <sup>2</sup> de Kruskal Wallis	
	Mediana	95 % IC	Valor	p
677CC	5,28	4,46-5,66	63,68	0,000
677CT	11,26	10,10-11,71		
677TT	18,40	15,92-21,13		

Fuente: Base de datos de la investigación.

## CONCLUSIONES

- 1- Se constata una discreta tendencia ascendente de las cardiopatías conotruncales y de los defectos del tubo neural, por otra parte, la identificación de conglomerados de hendiduras labiopalatinas en Corralillo y Quemado de Guines y para defectos del tubo neural, que abarca los municipios de Quemado de Güines, Santo Domingo y Sagua la Grande muestra una distribución espacial no homogénea, con existencia de regiones de alto riesgo poblacional que deben ser evaluadas.
- 2- Las evidencias de factores de riesgo particulares para cada uno de los defectos congénitos folato-sensibles estudiados, así como otros comunes a varios de ellos, indican el elemento constante de estos defectos, dado por la deficiencia materna de folato, a la vez que cada uno posee mecanismos dismorfogénicos diferentes, que actúan sobre vías de señalización celular distintas.
3. En estos defectos congénitos hay una importante participación de control epigenético, mostrada en la presente investigación a través de las asociaciones a variables nutricionales, hemoquímicas y hematológicas, que apoyan la etiología multifactorial de los defectos congénitos folato-sensibles. Las evidencias aportadas por los análisis de las mismas, en los tres grupos definidos en el diseño metodológico, constituye un aporte a la comprensión del papel diferencial del componente ambiental y genético en estos defectos congénitos.
4. A pesar de que la cantidad de casos y controles que pudieron genotiparse con el polimorfismo C677T fue relativamente pequeño, las evidencias mostradas por los modelos de asociación genética de codominancia y recesividad ofrecen oportunidades para detectar su relación con los DC sensibles a la deficiencia materna de AF en la provincia de Villa Clara. La asociación del alelo 677T con otras variables de riesgo como la hiperhomocisteinemia y la hipersegmentación neutrofílica reflejan la disminución de la actividad enzimática en las mujeres homocigóticas y los bajos niveles de ácido fólico en las mismas.

## RECOMENDACIONES

1. Diseñar investigaciones para la determinación de las concentraciones de oligoelementos en el agua y en el suelo de los municipios donde se identificaron conglomerados espaciales y espacio-temporales de defectos congénitos folato-sensibles.
2. Diseñar un programa informático de un modelo matemático predictivo que tenga en cuenta las variables incluidas en las diferentes ecuaciones de regresión logística del presente estudio, para predecir el riesgo de ocurrencia de los defectos congénitos folato-sensibles en gestantes de Villa Clara.
3. Realizar otros estudios para profundizar en las concentraciones maternas de homocisteína, que consideren su repercusión sobre otros defectos congénitos, y la relación con la edad materna, el sexo fetal y el consumo materno de folato entre otras variables, que se han descrito relacionadas a la misma.
- 4- Realizar investigaciones en el ámbito de la epidemiología genética, que profundicen en los diseños de investigación causales, para indagación de variables epidemiológicas y nutricionales, con el empleo del diseño metodológico utilizado en la presente investigación, con la utilización de casos incidentes y prevalentes, a fin de eliminar la repercusión del efecto provocado por los sesgos del tiempo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mai C, Isenburg J, Canfield M, Meyer R, Correa A, Alverson C, et al. National population-based estimates for major birth defects, 2010-2014. *Birth Defects Res.* 2020;111(18):1420–35.
2. OMS. Anomalías congénitas [Internet]. *Mediacentre 370.* 2020 [citado 23 Feb 2022]. p. 1–5. Disponible en: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs370/es/birth defects](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs370/es/birth%20defects). *Pediatr Res.* 2018;81(2):282–5.
4. Taiwo TE, Cao X, Cabrera RM, Lei Y, Finnell RH. Approaches to studying the genomic architecture of complex birth defects. *Prenat Diagn.* 2021;40(9):1047–55.
5. OMS. Malnutrición. WHO. Biblioteca electrónica de documentación científica sobre medidas nutricionales (eLENA). [Internet]. 2018 [cited 2022 Jan 23]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>
6. Hernández P, Ramirez L. Algunos aspectos clínicos, paraclínicos y epidemiológicos en recién nacidos con malformaciones congénitas. *Arch Médico Camagüey.* 2022;26:8711–21.
7. Anuario Estadístico de Salud [Internet]. Biblioteca Virtual de Salud. 2019 [citado 23 Feb 2022]. p. 47 ed. Disponible en: <http://bvscuba.sld.cu/anuario-estadistico-de-cuba/>
8. Noa M. Informes de Balance Anual Centro Provincial de Genética Médica de Villa Clara. Santa Clara; 2019.
9. Taboada N. Implication of molecular and cellular mechanisms in congenital defects sensitive to folate deficiency. *EC Gynaecol.* 2021;10(6):57–68.
10. Murphy M, Westmark C. Folic Acid Fortification and Neural Tube Defect Risk: Analysis of the Food Fortification Initiative Dataset. *Nutrients.* 2020;12(247–259).
11. Deb R, Arora I, Samtani R, Garg G, Saksena D, Sharma N, et al. Folic acid, dietary habits, and homocysteine levels in relation to neural tube defects: A case–control study in North India. *Birth Defects Res.* 2018;110(14):1148–52.
12. Fox E, Jones R, Samanta R, Summers C. Characterising the transcriptome of hypersegmented human neutrophils. *Open Res.* 2021;6:343–59.
13. Shi H, Yang S, Lin N, Huang P, Yu R, Chen M, et al. Study on maternal SNPs of MTHFR gene and HCY level related to congenital heart diseases. *Pediatr Cardiol.*

- 2021;42(1):42–6.
14. Sosiawan A, Kurniati M, Dewi R, Hadi A, Nuraini I, A'yun Q, et al. An analysis of the MTHFR gene and clinical phenotypes in familial non-syndromic cleft palate. *J Int Dent Med Res.* 2020;13(3):1160–4.
  15. Mitchell LE. Maternal effect genes : Update and review of evidence for a link with birth defects. *Hum Genet Genomics Adv.* 2022;3(1):1067–80.
  16. Siddeek B, Simeoni U. Epigenetics provides a bridge between early nutrition and term health and a target for disease prevention. *Acta Paediatr.* 2022;1:1–8.
  17. Schwartz S. Cracking the epitranscriptome. *RNA.* 2016;(22):169–74.
  18. Keats E, Haider B, Bhutta Z. Multiple-micronutrient supplementation for women during pregnancy (Review). *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;(3):1–126.
  19. Santander S, Giménez M, Ballestín B, Luesma M. Is supplementation with micronutrients still necessary during pregnancy? A Review. *Nutrients.* 2021;13:3134–43.
  20. Man B, Dunn L. The declaration of Helsinki on medical research involving human subjects: a review of seven revisión. *J Nep Heal Res Counc.* 2020;17(4):548–52.
  21. Taboada N, Lardoeyt R. Validación de un cuestionario sobre factores de riesgo para defectos congénitos. *Rev Cuba Investig Biomédicas.* 2019;38(4):1–18.
  22. GHE cause categories and ICD-10 codes [Internet]. GHE cause categories and ICD-10 codes. 2017 [citado 23 Feb 2022]. Disponible en: [http://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/en/index.html](http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/en/index.html).
  23. Bendahan ZC, Escobar LM, Castellanos JE, González C. Effect of folic acid on animal models, cell cultures, and human oral clefts : a literature review. *Egypt J Med Hum Genet.* 2020;21:62–70.
  24. Taboada N. Factores epigenéticos involucrados en el origen de defectos congénitos relacionados con la deficiencia materna de ácido fólico y otros micronutrientes. *Acta Med Cent.* 2019;13(3):439–54.
  25. Kancherla V, Black R. Historical perspective on folic acid and challenges in estimating global prevalence of neural tube defects. *Ann NY Acad Sci.* 2018;1414:20–30.
  26. Moore, Keith L; Persaud T. *Embriología Clínica.* 8<sup>va</sup> ed. Barcelona:Elsevier; 2011.338 p.
  27. Taboada N. Avances en el conocimiento de las bases moleculares y celulares de las cardiopatías congénitas . Parte 2 y última : Cardiopatías congénitas. *CorSalud.*

- 2019;11(4):307–16.
28. Sahin D, Mermer S. Array comparative genomic hybridisation results of non-syndromic children with the conotruncal heart anomaly. *Cardiol Young*. 2022;20:1–6.
  29. Lu F, Xue P, Wang J, Yu B, Liu J. Estimating the frequency of causal genetic variants in foetuses with congenital heart defects: a Chinese cohort study. *Orphanet J Rare Dis*. 2022;17(2):167–80.
  30. Bourouba R, Houcher B, Akar N. Risk factors of neural tube defects : A reality of Batna region in Algeria. *Egypt J Med Hum Genet*. 2018;19(3):225–9.
  31. Forci K, Bouaiti EA, Alami MH, Alaoui AM, ;Izgua AT. Incidence of neural tube defects and their risk factors within a cohort of Moroccan newborn infants. *BCM Pediatr. BMC Pediatrics*; 2021;21:124–34.
  32. Taboada N, Herrera M, Hernández G, Ledesma G. Spatiotemporal distribution of non-syndromic orofacial clefts in Villa Clara Province, Cuba, 2013 – 2018. *MEDICC Rev*. 2021;23(2):2013–8.
  33. Balbis C, Cabrera C. La fisura labiopalatina no es inevitable. *MEDISUR*.2017;16(1):1–3.
  34. Taboada N, Algora A, Herrera M, De la Torre M, Piedra O, Anoceto E. Prevalence and associated anomalies in Gastroschisis and Omphalocele cases in Villa Clara, Cuba: A 30-Year Series from 1990 to 2019. *Biomed J Sci Tech Res*. 2021;36(3):28543–51.
  35. Taboada N, Algora A, Noche G, Herrera M, González L, Anoceto E. Prenatal Diagnosis of Congenital Anterior Abdominal Wall Defects in Villa Clara, Cuba, 1994 - 2019: A Retrospective Analysis. *EC Gynaecol*. 2019;10(6):8–18.
  36. Talita C, Duarte J, Silva S, Coppedé F, Almeida M. Association between MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms and maternal risk for Down syndrome: A protocol for systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2022;101:1–6.
  37. Ferrero M, Alonso F, Cendán I, Roca J. Tendencias del síndrome de Down en Cuba, su relación con edad materna y tasa de fecundidad. *Rev Cubana Pediatr*. 1998;70(3):141–7.
  38. Söylemez F. Phenotypes associated with Down syndrome and causative genes. *Intech Open*. 2022;1–12.
  39. Glinianaia S, Morris J, Best K, Santoro M, Coi A, Armaroli A, et al. Long-term survival of children born with congenital anomalies: A systematic review and meta-analysis of population-based studies. *PLOS Med*. 2020;19(9):e1003356.

40. Cruz Q, Benítez C, Marcheco T. Comportamiento clínico epidemiológico de las anomalías congénitas mayores más frecuentes en Cuba 2010-2016 [Internet]. Genet Comunit. 2017 [citado 23 Feb 2022]. Disponible en:  
<http://www.geneticacomunitaria2017.sld.cu/index.php/gencom/2017/paper/view/426/0>
41. Abdelrahman O, Diab R. Prevalence and pattern of congenital heart disease among children in Khartoum State, Sudan: A reflection of the current cardiac profile. *Cereus*. 2022;14(1):21196–208.
42. Taboada N. Avances en el conocimiento de las bases moleculares y celulares de las cardiopatías congénitas. Parte 1 de 2 : Morfogénesis cardíaca. *CorSalud*. 2019;11(3):233–40.
43. Fazekas P, Fekete M, Szunyogh C, Cseh K, Péntzes M. Parental occupational exposure and congenital heart diseases in a Hungarian case – control study. *Int Arch Occup Environ Health*. 2021;94(3):515–27.
44. Martinez H, Weakland A, Bailey L, Botto L, De-regil L, Brown K. Improving maternal folate status to prevent infant neural tube defects : working group conclusions and a framework for action. *Ann NY Acad Sci*. 2018;1414:5–19.
45. Ba G, Jun W, Ling C, Hong H, Ting G. Prevalence and time trends of spina bifida in fourteen cities located in the Liaoning province of northeast China, 2006-2015. *Oncotarget*. 2017;8(12):18943–48.
46. de Joung M, Nawijn E, Verkaik K. Contribution of voluntary fortified foods to micronutrient intake in The Netherlands. *Eur J Nutr*. 2022;1:1–15.
47. Silva M, Balderrama I, Wobeto A, Werneck R, Azevedo A. The impact of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on oral health-related quality of life. *J Appl Oral*. 2018;26:1–6.
48. Bhat V, Moront M, Bhandari V. Gastroschisis : A state-of-the-art Review. *Children*. 2020;7:302–20.
49. Halder P, Pal U, Ganguly A, Ghosh P, Ray A, Sarkar S, et al. Understanding etiology of chromosome 21 nondisjunction from gene × environment models. *Sci Rep*. 2021;22390–403.
50. Landes S, Turk M, Finan J. Factors associated with the reporting of Down syndrome as the underlying cause of death on US death certificates. *J Intellect Disabil Res*.



- 2022;66(5):457–70.
51. Méndez R, Suárez U, García M, Barrios A, Morales E, Soriano M. Estado actual del diagnóstico prenatal en Cuba: las causas de la baja prevalencia del síndrome Down. *An Acad Ciencias Cuba*. 2016;42(4):297–309.
  52. Vonasek J, Asdahl P, Heyman M, Källén K, Hasle H. Late mortality and morbidity among long-term leukemia survivors with Down syndrome: A nationwide population-based cohort study. *Pediatr Blood Cancer*. 2018;71(5):292–7.
  53. Herrera M. Genética y epidemiología del Síndrome de Down en Villa Clara. [tesis doctoral] Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara; 2004.
  54. Wang Q, He C, Mei J, Xu Y. Epidemiology of birth defects in Eastern China and the associated risk factors. *Med Sci Monit*. 2022;28:e933782.
  55. Dolk H, McCullough N, Callaghan S, Casey F, Craig B, Given J, et al. Risk factors for congenital heart disease : The Baby Hearts Study , a population-based case- control study. *PLoS One*. 2020;15(2):1–22.
  56. Slavec L, Karas K, Locatelli I. Genetic markers for non-syndromic orofacial clefts in populations of European ancestry: a meta-analysis. *Sci Repos*. 2022;12:1214–28.
  57. Yi K, Ma Y, Wang W, Zhang X, Gao J, He S, et al. The roles of reduced folate carrier-1 (RFC1) A80G (rs1051266) polymorphism in congenital heart disease: A meta-analysis. *Med Sci Monit*. 2021;27:e929911.
  58. Pei P, Yu J, Shen J, Li X, Wu J, Wang S, et al. Folate deficiency induced H2A ubiquitination to lead to downregulated expression of genes involved in neural tube defects. *Epigenetics Chromatin*. *BioMed Central*; 2019;12:69–81.
  59. Taboada N, Mollineda A, Herrera M. Serum copper, zinc, calcium and magnesium levels in mothers with offspring affected by neural tube defects: a case-control study. *Rev Cuba Invest Biomed*. 2019;38(1):1–9.
  60. Li H, Zhang J, Niswander L. Zinc deficiency causes neural tube defects through attenuation of p53 ubiquitylation. *Development*. 2018;145(24):dev 169797.
  61. Yin S, Chengrong W, Jing W, Lei J, Jufen L, Linlin W, et al. Selected essential trace elements in maternal serum and risk for fetal orofacial clefts. *Sci Total Environment*. 2020;712:6542–53.
  62. Keats E, Akseer N, Thurairajah P, Cousens S, Bhutta Z. Multiple-micronutrient

- supplementation in pregnant adolescents in low- and middle-income countries: a systematic review and a meta-analysis of individual participant data. *Nutr Rev.* 2022;80(2):141–56.
63. WHO. Antenatal care recommendations for a positive pregnancy experience. Nutritional interventions update: Multiple micronutrient supplements during pregnancy. Geneva: World Health Organization; 2020. 68 p.
  64. Bourque D, Meng L, Dougan S, Momoli F, Riddell C, Walker M, et al. Gastroschisis in Ontario, Canada: 2012–2018. *Birth Defects Res.* 2021;113(14):1044–51.
  65. Lim KK, Teo HY, Tan YY, Zeng YB, Tsz U, Lam F, et al. Fission yeast Methylenetetrahydrofolate Reductase ensures mitotic and meiotic chromosome segregation fidelity. *Int J Mol Sci.* 2021;22:639–51.
  66. 5,10-METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE; MTHFR [Internet]. OMIM. 2018 [citado 23 Feb 2022]. Available from: <http://www.omim.org/entry/607093>
  67. Castrense S, Babbi G, Baldazzi D, Martelli P, Casadio R. A glance into MTHFR deficiency at a molecular level. *Int J Mol Sci.* 2022;23(1):167–86.
  68. Rai V, Yadav U, Kumar P, Yadav SK, Mishra OP. Maternal Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism and Down Syndrome Risk : A Meta- Analysis from 34 Studies. *PLoS One.* 2014;9(9):552–67.
  69. Vidmar G, Šmid A, Kuželi NK, Trontelj J, Gersak K. Folate insufficiency due to MTHFR deficiency is bypassed by 5-Methyltetrahydrofolate. *Journal Clin Med.* 2020;9:2836–54.
  70. Liu P, Ding B, Zhang J, Mei X, Li F, Wu P, et al. Association between MTHFR C677T polymorphism and congenital heart disease. *Int Heart J.* 2020;61:553–61.
  71. Makhmudi A, Sadewa A, Aryandono T, Chatterjee S, Heij H, Gunadi H. Effects of MTHFR c.677C>T, F2 c.20210G>A and F5 Leiden polymorphisms in gastroschisis. *J Invest Surg.* 2016;29(2):88–92.
  72. Almaguer M. Asociación de los polimorfismos C677T y A1298C con la Ataxia espinocerebelosa tipo 2. *Premio Anual de Salud.* Holguín; 2017. p. 43.
  73. Nauman N, Jalali S, Shami S, Rafiq S, Grobe G, Hilger A, et al. Low maternal folate concentrations and maternal MTHFR C677T polymorphism are associated with an increased risk for neural tube defects in offspring: a case-control study among Pakistani

- case and control mothers. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2018;27(1):253–60.
74. Guo Q, Wang H, Tie L, Li T, Xiao H, Long J, et al. Parental genetic variants , MTHFR 677C > T and MTRR 66A > G, associated differently with fetal congenital heart defect. *Biomed Res Int. Hindawi;* 2017;17:476–83.
  75. Neogi B, Singh S, Pallepogula D, Pant H, Reddy K, Bharti P, et al. Risk factors for orofacial clefts in India: A case–control study. *Birth Defects Res.* 2017;109:11284–91.
  76. Amooee A, Dastgheib S, Niktabar A, Noorishadkam M, Lookzadeh M, Mirjalili S, et al. Association of Fetal MTHFR 677C > T Polymorphism with Non-Syndromic Cleft Lip with or without Palate Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Fetal Pediatr Pathol.* 2021;40(4):337–53.
  77. Coppédé F. The genetics of folate metabolism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome and associated congenital heart defects. *Front Genet.* 2015;6:216–23.
  78. Rai V. Strong association of C677T polymorphism of Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene with nosyndromic Cleft Lip/Palate (nsCL/P). *Indian J Clin Biochem.* 2018;33:5–15.
  79. Taboada N, Herrera M. Mecanismos epigenéticos y vía de señalización Notch en el origen de diferentes defectos congénitos. *Rev Medicentro.* 2018;22(3):197–207.
  80. Serra C, Cuscó I, Homs A, Flores R, Torán N, Pérez L. DNA methylation abnormalities in congenital heart disease. *Epigenet.* 2015;10(2):167–77.
  81. Wilson R, Connor D. Maternal folic acid and multivitamin supplementation: International clinical evidence with considerations for the prevention of folate-sensitive birth defects. *Prev Med Reports.* 2021;24:1617–29.
  82. Salinas V, Salinas R, Cerda R, Martínez de Villarreal L. Genetic variants conferring susceptibility to gastroschisis: a phenomenon restricted to the interaction with the environment? *Pediatr Surg Int.* 2018;34:505–14.
  83. Geng Y, Gao R, Chen X, Liu X, Liao X, Li Y, et al. Folate deficiency impairs decidualization and alters methylation patterns of the genome in mice. *Mol Hum Reprod.* 2015;21(11):844–56.
  84. Ferraro S, Panzeri A, Panteghini M. Tackling serum folate test in European countries within the health technology assessment paradigm: request appropriateness, assays and health outcomes. *Clin Chem Lab Med.* 2017;28(55):1262–75.

85. Gilflix B. Utility of measuring serum or red blood cell folate in the era of folate fortification of flour. *Clin Biochem.* 2014;47(7–8):533–8.
86. Concepción A, Camayd V, Vento B, Fernández M, Hernández E, Marín P, et al. Reference values of plasma homocysteine in Cuban children and adults. *J Lab Med.* 2020;44(4):191–5.
87. Dai C, Fei Y, Li J, Shi Y, Yang X. A novel review of Homocysteine and pregnancy complications. *Biomed Res Int.* 2021;397–411.
88. Taboada N. Una aproximación histórico-religiosa, jurídica y bioética al aborto provocado de causa genética. *Acta Med Cent.* 2018;12(1):81–92.
89. Sun H. Prenatal diagnosis of congenital heart defects: echocardiography. *Transl Pediatr.* 2021;10(8):2210–24.
90. Salehi D, Fricke K, Bhat M, Arheden H, Liuba P, Hedstrom E. Utility of fetal cardiovascular magnetic resonance for prenatal diagnosis of complex congenital heart defects. *JAMA Netw Open.* 2021;4(3):5338–50.
91. Vásques Y. Características clínicas y epidemiológicas de pacientes pediátricos con cardiopatía congénita intervenidos quirúrgicamente en el Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja 2014-2015 [Internet]. 2018 [cited 2022 Feb 14]. Disponible en: [http://www.repositorioacademico.usmp.edu.pe/bitstream/usmp/3479/3/vasquez\\_ysaf.pdf](http://www.repositorioacademico.usmp.edu.pe/bitstream/usmp/3479/3/vasquez_ysaf.pdf)
92. Llambia L, Castillo D, Frontela V, Hernández M, Cordero A. Programa de Alfetoproteína en suero materno, municipio Pinar del Río, 2008 – 2012. *Rev Ciencias Médicas.* 2018;22(6):1024–32.
93. Cruz R, Chavelas F, Martínez M, Aguilar K, Gámez A, Luna J, et al. Open fetal microneurosurgery for intrauterine spina bífida repair. *Fetal Diag Ther.* 2021;148:163–73.
94. Ferreira R, Rodrigues C, Goncalves L, de Abreu D, Naves W, Ruano R. Gastroschisis: a systematic review of diagnosis, prognosis and treatment. *J Matern Neonatal Med.* 2021;1–14.
95. Redondo E, González C, D’Alessandro P, Boglione M, Reusmann A, Barrenechea M. Gastroschisis: deferred closure with releasing incisions. A case report. *Cir Pediatr.* 2022;35(1):42–5.
96. Torres P, González C, Toledo P, Muñoz V, Gil R, Reyes N, et al. Improving cognitive

- visual motor abilities in individuals with Down syndrome. *Sensors*. 2019;19:3984–4004.
97. Kulldorff M. SaTScan v7.01 software for the spatial and space-time statistics [Internet]. 2018 [citado 23 Feb 2022]. Disponible en: [www.satscan.org](http://www.satscan.org)
  98. Nuñez G, Delgado R, Simancas R. Tendencias y análisis espacio-temporal de la mortalidad por diabetes mellitus en Ecuador, 2001-2016. *Rev Cuba Salud Public*. 2020;46(2):1–17.
  99. Rodríguez S, Mustelier O. Sistema automatizado CERES + para la evaluación del consumo de alimentos. *Rev Cuba Aliment Nutr*. 2013;23:208–20.
  100. Navarro M. Estudio clínico, epidemiológico y etiopatogénico de las cardiopatías congénitas en Villa Clara. [tesis doctoral] Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara.; 2013.
  101. Alcázar Zambrana J. *Obstetricia y Ginecología*. Quito: Editorial Médica Panamericana; 2017. 474 p.
  102. Hedermann G, Hedley PL, Thagaard IN, Christiansen M. Maternal obesity and metabolic disorders associate with congenital heart defects in the offspring : a systematic review. *MedRxiv*. 2020;16(5).
  103. Aldersley, T; Lawrenson, J; Human, P; Shaboodien, G; Cupido, B; Comitis G et al. PROTEA , A Southern African Multicenter Congenital Heart Disease Registry and Biorepository: Rationale , Design , and Initial Results. *Front Pediatr*. 2021;9:1–10.
  104. Atli EI, Kalkan R. Investigation of genetic alterations in congenital heart diseases in prenatal period. *Glob Med Genet*. 2021;26:15–28.
  105. Cardiopatía conotruncal. *Soc Argentina Ultrason en Med y Biol* [Internet]. 2020 [citado 23 Feb 2022]. Disponible en: <https://saumb.org.ar/adiag/d/33>
  106. Kalisch-smith JI, Ved N, Szumska D, Munro J, Troup M, Harris SE, et al. Maternal iron deficiency perturbs embryonic cardiovascular development in mice. *Nat Commun*. 2021;12:3447–64.
  107. Diaz-Frias J, Guillaume M. *Tetralogy of Fallot*. Treasure Island: StatPearls Publishing; 2022. 234 p.
  108. Valentín RA, Vidal TLA, Perdomo A. Caracterización de las cardiopatías congénitas en la provincia de Matanzas. Estudio de trece años. *Rev Med Electr*. 2018;40(5):40–6.
  109. Liu Y, Chen S, Zühlke L, Black G, Choy M, Li N, et al. Global birth prevalence of

- congenital heart defects 1970-2017: updated systematic review and meta-analysis of 260 studies. *Int J Epidemiol.* 2019;48:455–63.
110. North Caroline State Center for Health Statistics. [Internet]. Internet. 2021 citado 23 Feb 2022]. Disponible en: <https://schs.dph.ncdhhs.gov/data/bd/frequency.htm>
  111. Stefanovic S, Etchevers HC, Zaffran S. Outflow tract formation — Embryonic origins of Conotruncal Congenital Heart Disease. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2021;8(42):0–16.
  112. Lahiri S, Gil W, Daria S, Joshua G, Parul J, Redmond B, et al. Genetic abnormalities / syndromes significantly impact perioperative outcomes of conotruncal heart defects. *Ann Pediatr Cardiol.* 2020;13(1):38–45.
  113. Herrera A, Pérez T, Gómez R. Defectos congénitos en la Provincia Artemisa , en el período 2011-2015. *Panor Cuba y Salud.* 2018;13(Esp):165–7.
  114. Sánchez D, Ferreiro R, Llamas P, Rodríguez T, Rizo L, Yasell R, et al. Comportamiento clínico epidemiológico de los defectos congénitos en La Habana. *Rev Cubana Pediatr.* 2016;88(1):34–42.
  115. Mutambo P, Siapiila P. The frequency and distribution of neural tube defects (NTDs) at Arthur Davison Children Hospital (ADCH), Ndola Zambia. *Int J Neurol Phys Ther.* 2021;7(2):20–9.
  116. Huang Y, Ren A, Wang L, Jin L, Lin S, Li Z, et al. Casp8 hypomethylation and neural tube defects in association with polycyclic aromatic hydrocarbon exposure. *Clin Epigenet.* 2019;11:1–12.
  117. Avagliano L, Massa V, George TM, Qureshy S, Bulfamante G, Finnell RH. Overview on Neural tube defects: from development to physical characteristics. *Birth Defects Res.* 2020;111(19):1455–67.
  118. Gashaw A, Shine S, Yimer O, Wodaje M. Risk factors associated to neural tube defects among mothers who gave birth in North Shoa Zone Hospitals, Amhara Region, Ethiopia 2020 : Case control study. *PLoS One.* 2021;16(4):1–12.
  119. Shilpa K, Ranganath P SS. Frequency of anencephaly and its associated anomalies. *Int J Anat Res.* 2018;6(2–3):5294–300.
  120. Golalipour M, Najafi L, Keshtkar A. Prevalence of anencephaly in Gorgan, northern Iran. *Arch Iran Med.* 2010;13(1):34–7.
  121. Akhtar, M; Qaiser, Q; Latif A. Antenatal diagnosis of anencephaly to determine the

- prevalence and its correlation with folic acid deficiency by using peripheral blood picture in District Poonch, Azad Kashmir. *Methods*. 2016;10(2):1–3.
122. Gedefaw A, Teklu S, Tadesse BT. Magnitude of Neural Tube Defects and Associated Risk Factors at Three Teaching Hospitals in Addis Ababa , Ethiopia. *Biomed Res Int. Hindawi*; 2018;1–10.
  123. Impellizzeri A, Giannantoni I, Polimeni A, Barbato E, Galluccio G. Epidemiological characteristic of Orofacial clefts and its associated congenital anomalies : retrospective study. *BMC Oral Health*. 2019;19:290–9.
  124. Campos C, Díaz G, Gil L, Mendoza C, González B. Evaluación de guías de manejo para pacientes con labio y / o paladar hendido Evaluation of management guidelines for cleft lip and / or palate patients. *Rev Cubana Estomatol*. 2019;56(3):1–14.
  125. Rafik A, Nadifi S. Updating genetics polymorphisms of non-syndromic clefts lip-palates. *Am J Mol Biol*. 2018;8:178–85.
  126. Delgado D, Lantigua C, Cruz M, Díaz F, Berdasquera C, Rodríguez P. Prevalencia de defectos congénitos en recién nacidos. *Rev Cuba Med Gen Integr*. 2007;23(3):22–31.
  127. Cisneros D, Castellanos O, Romero G, Cisneros DC. Caracterización clínico epidemiológica de pacientes con malformaciones labiopalatinas. *MEDISAN*. 2013;17(7):1039–46.
  128. Fan D, Wu S, Liu L, Xia Q, Tian G, Wang W. Prevalence of non-syndromic orofacial clefts: based on 15,094,978 Chines perinatal infants. *Oncotarget*. 2018;9(17):13981–90.
  129. Herrera M. Cohorte de malformaciones congénitas y discapacidad cognitiva en la atención genética comunitaria en Villa Clara. *XL Premio Anual de la Salud*; 2015.
  130. Kadir A, Mossey PA, Blencowe H, Moorthie S, Lawn J, Mastroiacovo P, et al. Systematic Review and Meta-Analysis of the Birth Prevalence of Orofacial Clefts in Low- and Middle-Income Countries. *Cleft Pal Craniofacial J*. 2017;54(5):571–81.
  131. Marín R. Evolución a 10 años de la gastrosquisis en un hospital de tercer nivel. [tesis] Universidad Autónoma de Nuevo León.; 2021.
  132. Benavides L, Barboza A. Prevalencia al nacimiento de síndrome de Down, según edad materna en Costa Rica, 1996-2016. *Act Med Cost*. 2019;61(4):177–82.
  133. Taboada N, Herrera M, Hernández G, Hernández H. Geospatial and temporal clustering of Folic Acid- Sensitive Congenital Defects in Villa Clara province, Cuba. *Biomed J Sci*

- Tech Res. 2020;29(5):22818–26.
134. Márquez B, Valle R, García G, Díaz NF, Molina A. Maternal Diabetes and Fetal Programming Toward Neurological Diseases: Beyond Neural Tube Defects. *Front Endocrinol.* 2018;13:664–75.
  135. Alem B, Leul W, Berhe Y, Magana T, Mulugeta A, Asfaw S, et al. Maternal risk factors associated with neural tube defects in Tigray regional state of Ethiopia. *Brain Dev.* 2019;41(1):11–8.
  136. Cai C, Fang Y, Shu J, Zhao L, Zhang R, Cao L. Association of neural tube defects with maternal alterations and genetic polymorphisms in one-carbon metabolic pathway. *It J Pediatr.* 2019;45:1–7.
  137. Jin X, Ni W, Wang G, Wu Q, Zhang J, Li G, et al. Incidence and risk factors of congenital heart disease in Qingdao : a prospective cohort study. *BMC Public Health.* 2021;21:1044–54.
  138. El-Chouli M, Hognason M, Bang C, Malmborg M, Ahlehoff O, Torp P, et al. Time trends in simple congenital heart disease over 39 years: A Danish nationwide study. *J Am Heart Assoc.* 2021;(Supp):1–27.
  139. Molapour H, Dastgiri S, Esmaeili ED. Prevalence and time trend of congenital heart defects: a registry-based study in Iran. *MedRxiv.* 2021. p. 1–10.
  140. Alebel A, Alemu A. Magnitude and Associated Factors of Neural Tube Defects in Ethiopia : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Glob Pediatr Heal.* 2020;7:1–14.
  141. Souza SWD, Copp AJ, Greene NDE, Glazier JD. Maternal Inositol Status and Neural Tube Defects : A Role for the Human Yolk Sac in Embryonic Inositol Delivery. *Adv Nutr.* 2021;12:212–22.
  142. Romero P, Orive R, Reyes R, Llanes M, MO P. Caracterización de los defectos del tubo neural en embarazadas de Las Tunas, estudio de cuatro años. *Rev Electr.* 2016;41(5).
  143. Wald NJ, Morris JK, Blakemore C. Public health failure in the prevention of neural tube defects : time to abandon the tolerable upper intake level of folate. *Public Heal Rev. Public Health Reviews;* 2018;39(2):1–11.
  144. FAO. Intercambio Global de Datos de Fortificación [Internet]. Internet. 2019 [cited 2022 Jan 23]. Disponible en: <https://fortificaciondatos.org>
  145. Tong H, Walker N. Current levels of coverage of iron and folic acid fortification are



- insufficient to meet the recommended intake for women of reproductive age in low- and middle-income countries. *J Glob Heal*. 2021;11:182–6.
146. Caffrey A, McNulty H, Irwin RE, Walsh CP. Maternal folate nutrition and offspring health : evidence and current controversies. *Proc Nutr Soc*. 2019;78:208–20.
  147. Given JE, Loane M, Garne E, Nelen V, Barisic I, Randrianaivo H, et al. Gastroschisis in Europe – A case-malformed-control study of medication and maternal illness during pregnancy as risk factors. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2017;31:549–59.
  148. Anderson J, Calganski L, Cheng Y, Stark R, Saadai P, Stephenson J, et al. Epidemiology of gastroschisis: A population-based study in California from 1995-2012. *J Pediatr Surg*. 2018;53(12):2399–403.
  149. Bugge M, Drachmann G, Kern P, Jørgensen EB, Eiberg H, Et A. Abdominal wall defects in Greenland 1989 – 2015. *Birth Defects Res*. 2017;109:836–42.
  150. Giust C, de Sousa S, de Abreu L, Daminello R. Increasing prevalence , time trend and seasonality of gastroschisis in Brazil. *Sci Reprod*. 2019;9:14491–144910.
  151. Chen M, Chen J, Chen Y, Tsai Y, Lee C. Low and decreased prevalence of congenital abdominal wall defect. *J Pediatr Surg*. 2020;54(9):1958–64.
  152. ONEI [Internet]. Oficina Nacional de Estadística e Información. República de Cuba. 2022 [citado 23 Feb 2022]. Disponible en: <http://www.onei.gob.cu/mapa/provincia/villa-clara>
  153. Ward MH, Rena RJ, Brender JD, de Kok TM, Weyer PJ, Nolan BT, et al. Drinking water nitrate and human health : An Updated Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(1557-):1557–88.
  154. Woday T, Mulunch K, Birara A. Determinants of Neural Tube Defects among newborns in Amhara Region, Ethiopia: A Case-Control Study. *Int J Pediatr*. 2020;8:1–9.
  155. Eshete M. Pattern of Orofacial Clefts at A Tertiary Care Hospital in Ethiopia. *Ethiop J Heal Sci*. 2019;31(6):1175–84.
  156. Oluwafemi RO, Abiodun MT. Incidence , Spectrum and Outcome of Congenital Anomalies Seen in a Neonatal Intensive Care Unit in Southern Nigeria. *Niger Postgr Med*. 2019;26:239–43.
  157. Janitz AE, Dao HD, Campbell JE, Stoner JA, Jennifer D. Distribution of congenital anomalies by race/ethnicity and geospatial location in Oklahoma, 1997–2009. *Birth*

- Defects Res. 2021;112(3):262–9.
158. Groisman B, Gili J, Giménez L, Poletta F, Bidondo MP, Barbero P, et al. Geographic clusters of congenital anomalies in Argentina. *J Community Genet.* 2016;10:276–82.
  159. Padrón A, Santos S, Vázquez M, Torres G, Barberis P. Diabetes y malformaciones congénitas. Cienfuegos, 2005-2015. *Medisur.* 2019;17(5):7–14.
  160. Alyousif SM, Aldokhel FT, Alkhanbashi OK, Alqahtani MHA, Aladawi A, Ashmawi A, et al. The incidence of congenital heart defects in offspring among women with diabetes in Saudi Arabia. *Cureus.* 2021;13(3):14225–35.
  161. Joshi RO, Chellappan S, Kukshal P. Exploring the role of maternal nutritional epigenetics in congenital heart disease. *Curr Dev Nutr.* 2020;(4):16–167.
  162. Ludvigsson I, Neovius M, Soderling J, Gudbjornsdottis S, Svensson A, Franzén S, et al. Periconceptual glycaemic control in woman with type 1 diabetes and risk of major birth defects: population based cohort study in Sweden. *BMJ.* 2018;362:2638–48.
  163. Depla A, De Wit L, Steenhuis T, Slieker MG, Voormolen D, Scheffer P. Effect of maternal diabetes on fetal heart function on echocardiography : systematic review and meta-analysis. *Ultr Obstet Gynecol.* 2021;57(2020):539–50.
  164. Grieger JA, Bianco-Miotto T, Grzeskowiak L, Leemaqz S, Poston L, Mccowan LM, et al. Metabolic syndrome in pregnancy and risk for adverse pregnancy outcomes : A prospective cohort of nulliparous women. *PLOS Med.* 2018;15(12):1–16.
  165. Lei Y, Ludorf KL, Yu X, Benjamin RH, Gu X, Lin Y, et al. Maternal Hypertension-Related Genotypes and Congenital Heart Defects. *Am J Hypert.* 2021;34(1):82–91.
  166. Weber K, Mayo J, Carmichael S, Stevenson D, Winn V, Shaw G. Occurrence of selected structural birth defects among women with preeclampsia and other hypertensive disorders. *Am J Epidemiol.* 2018;187(4):668–76.
  167. Sewda A, Agopian A, Goldmuntz E, Hakonarson H, Morrow B, Musfee F, et al. Gene-based analyses of the maternal genome implicate maternal effect genes as risk factors for conotruncal heart defects. *PLoS One.* 2020;15(6):1371–88.
  168. Martinelli M, Palmieri A, Carinci F, Scapoli L. Non-syndromic cleft palate : An overview on human genetic and environmental risk factors. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:79–82.
  169. Kalisch S, Ved N, Burnaby S. Environmental risk factors for Congenital Heart Disease.

- Cold Spring Harb Perspect Biol. 2020;12:234–52.
170. Liu X, Ding G, Yang W, Feng X, Li Y, Liu H, et al. Maternal body mass index and risk of congenital heart defects in infants: A dose-response meta-analysis. *Biomed Res Int. Hindawi*; 2019;14:796–812.
  171. Obesity and overweight fact sheet [Internet]. World Health Organization. 2021 [citado 23 Feb 2022]. Disponible en: [www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight)
  172. Hassan AM. Prevalence, associated factors, and outcome of Neural Tube Defects: A retrospective study. *Biomed Pharmacol J.* 2021;14(2):725–32.
  173. Schaefer-Graf U, Napoli A, Nolan CJ. Diabetes in pregnancy : a new decade of challenges ahead. *Diabetol.* 2018;61:1012–21.
  174. Orbain M, Jhonson J, Nance A, Romeo A, Silver M, Martínez L, et al. Maternal diabetes-related malformations in Utah: A population study of birth prevalence 2001–2016. *Birth Defects Res.* 2021;113(2):326–42.
  175. Kashif T, Fathima N, Usman N, Qaseem A, Jayaraj JS. Women with epilepsy : Anti-epileptic drugs and perinatal outcomes. *Cureus.* 2019;11(9):1–10.
  176. Kohl A, Golan N, Cinnamon Y, Genin O, Chefetz B, Sela D. A proof of concept study demonstrating that environmental levels of carbamazepine impair early stages of chick embryonic development. *Environ Int.* 2019;129(June):583–94.
  177. Chen Q, Gan Y, Wang K, Li Q. PregTox: A Resource of knowledge about drug fetal toxicity. *Biomed Res Int.* 2022;12:146–53.
  178. Vosler D. Comparative risk of major congenital malformations with 8 different antiepileptic drugs: A prospective cohort study of the EURAP Registry. *Epilepsy Curr.* 2019;19(2):83–5.
  179. Haghghi MM, Wright CY, Ayer J, Urban MF, Pham MD. Impacts of high environmental temperatures on congenital anomalies: A systematic review. *Int J Env Res.* 2021;18:4910–25.
  180. Waller DK, Hashmi SS, Hoyt AT, Duong HT, Tinker, Sarah C, Gallaway MS, et al. Maternal report of fever from cold or flu during early pregnancy and the risk for noncardiac birth defects, National Birth Defects Prevention Study, 1997–2011. *Birth Defects Res.* 2019;110(4):342–51.

181. Silva M, Rodríguez V, Panizo B, Rondón P. Defectos congénitos del sistema nervioso central diagnosticados en Las Tunas entre 2016 y 2019. *Rev Electr.* 2020;45(6).
182. Acs L, Banyai D, Nemes B, Nagy K, Acs N, Banhidy F, et al. Maternal-related factors in the origin of isolated cleft palate-A population-based case-control study. *Orthod Craniofacial Res.* 2020;23(2):174–80.
183. Levin M, Sadler T, Healy D. elective Serotonin reuptake inhibitor use during pregnancy and major malformations: The Importance of Serotonin for embryonic development and the effect of Serotonin inhibition on the occurrence of malformations. *Bioelectricity.* 2019;1(1):18–29.
184. Kutbi H, Wehby GL, Uribe LMM, Romitti PA, Carmichael S, Shaw GM, et al. Infant and child health maternal underweight and obesity and risk of orofacial clefts in a large international consortium of population-based studies. *Int J Epidemiol.* 2017;46(1):190–9.
185. Garduño GM, Omar H, Hidalgo M, Javier L, Arizmendi D, Cruz EC. Estudio epidemiológico de pacientes con labio y paladar fisurado en dos centros especializados. *Rev Odontol Mex.* 2020;24(4):268–75.
186. Bandyopadhyay N, Singh S, Pallegogula DR, Pant H, Kolli SR, Et A. Risk factors for orofacial clefts in India : A case – control study. *Birth Defects Res.* 2017;109:1284–91.
187. Nwaze C, Adebayo O, Adeoye A, Akinmoladun V. Orofacial clefts and cardiovascular risk and diseases: The causal relationship and associations. *Ann Ibadan Postgrad Med.* 2020;18(Cleft Supplement):S28–34.
188. Sato Y, Yoshioka E, Saijo Y, Miyamoto T, Sengoku K, Azuma H, et al. Population attributable fractions of modifiable risk factors for nonsyndromic orofacial clefts: A prospective cohort study from the Japan environment and children’s study. *J Epidemiol.* 2021;1–8.
189. Yin X, Li J, Li Y, Zou S. Maternal alcohol consumption and oral clefts: a meta-analysis. *Surgery.* 2019;57(9):839–46.
190. Stallings E, Isenburg J, Short T, Russell D, Kirby S, Romitti P, et al. Population-based birth defects data in the United States, 2012– 2016: A focus on abdominal wall defects. *Birth Defects Res.* 2019;111(18):1436–47.
191. Kirby R. The prevalence of selected major birth defects in the United States. *Semin Perinatolgy.* 2017;41(6):338–44.

192. Oakes MC, Porto M, Chung JH. Advances in prenatal and perinatal diagnosis and management of gastroschisis. *Semin Pediatr Surg.* 2020;27(5):289–99.
193. Feldkamp ML, Arnold KE, Krikov S, Reefhuis J, Almli LM, Moore CA, et al. Risk of gastroschisis with maternal genitourinary infections : the US National birth defects prevention study 1997 – 2011. *BMJ Open.* 2019;9:1–9.
194. Shalaby A, Obeida A, Khairy D, Bahaaeldin K. Assessment of gastroschisis risk factors in Egypt. *J Pediatr Surg.* 2020;55(2):292–5.
195. Anderson KN, Lind JN, Simeone RM, Bobo W V, Mitchell AA, Riehle-colarusso T, et al. Maternal use of specific antidepressant medications during early pregnancy and the risk of selected birth defects. *JAMA Psich.* 2020;77(12):1246–55.
196. Elmerdahl F, Ernst A, Brix N, Braskhøj L, Roos L, Ramlau H, et al. Risk of adverse pregnancy outcomes at advanced maternal age. *Obstet Gynecol.* 2018;131(3):457–63.
197. Kang J, Wu J. Trends in maternal age distribution and the estimated live birth and population prevalence of Down’s syndrome in China: 1985-2012. *MedRxiv.* 2021;7:1–18.
198. Huete G, Otalola B. Demographic assessment of Down syndrome : A systematic review. *Int J Env Res Public Heal.* 2021;18:352–64.
199. Lagnier M, Lopes J, Esperidon S, Costa F, Brancato C. Down syndrome in Brazil: occurrence and associated factors. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(1):1–11.
200. Coppedè F. Risk factors for Down syndrome. *Arch Toxicol.* 2016;90(12):2917–29.
201. More SJ, Bampidis V, Bragard C, Halldorsson TI, Bennekou SH, Koutsoumanis K, et al. Guidance on aneuploidy assessment. *EFSA J.* 2021;19(8):6770–97.
202. Kirsch V, Pacchierotti F, Parry EM, Russo A, Eichenlaub R, Adler I. Risks of aneuploidy induction from chemical exposure: Twenty years of collaborative research in Europe from basic science to regulatory. *Mutat Res.* 2019;779:126–47.
203. Vanegas M, Moran J. Complicaciones materno fetales en el embarazo con periodo intergenésico corto en gestantes y neonatos. [tesis doctoral]. Universidad de Guayaquil. Ecuador; 2020.
204. Hernández L, Montes F. Modelo predictivo del riesgo de abandono escolar en educación media superior en México. *CienciaUAT.* 2020;15(1):75–85.
205. Retamales C. Recomendaciones para la interpretación del frotis sanguíneo del

- subprograma de morfología sanguínea [Internet]. Instituto Salud Pública Chile; 2014 [citado 23 Feb 2022]. p. 1–20. Disponible en: [http://www.ispch.cl/sites/default/files/interpretacion\\_frotis\\_sanguineo - 14052013A.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/interpretacion_frotis_sanguineo_-_14052013A.pdf)
206. Bain BJ. Diagnosis from the Blood Smear. *N Engl J Med*. 2005;353:498–507.
207. Lehman H, Henry J. SI Units. In: *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 22th ed. Philadelphia; 2021. p. 1449.
208. Devalia V, Hamilton MS, Molloy AM. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. *Br J Hematol*. 2014;(166):496–513.
209. Okazaki Y, Watabu T, Endo K, Oiwa H. Hypersegmented neutrophils in Methotrexate toxicity. *Intern Med*. 2018;57:1055–6.
210. Nguyen CL, Van Hoang D, Thi H, Van H, Khat C, Minh P, et al. Low dietary intakes of essential nutrients during pregnancy in Vietnam. *Nutrients*. 2018;10:1025–38.
211. Oliva I, González Y, Marcheco B, Carminate D, de la Torre M. Consumo alimentario y hábitos dietéticos y tóxicos en embarazadas de la Provincia de Villa Clara. *Act Med Centr*. 2020;14(2):142–51.
212. Caniglia EC, Zash R, Swanson SA, Smith E, Sudfeld C, Finkelstein JL, et al. Iron, folic acid, and multiple micronutrient supplementation strategies during pregnancy and adverse birth outcomes in Botswana. *Lancet Glob Heal*. 2022;10(6):e850–61.
213. Yin S, Wang C, Wei J, Jin L, Liu J, Wang L, et al. Selected essential trace elements in maternal serum and risk for fetal orofacial clefts. *Sci Total Env*. 2020;10(4):712–23.
214. Gómez A, Pita G, García C, Bacallao G, Ordáz A, Salazar Y, et al. Deficiencia de cinc en mujeres en edad reproductiva , La Habana , Cuba. *Rev Cuba Salud Pública*. 2020;46(4):1–19.
215. Yang J, Kang Y, Chang Q, Zhang Q, Liu X, Zeng L, et al. Maternal zinc, copper and selenium intakes during pregnancy and congenital heart defects. *Nutrients*. 2022;14:1055–68.
216. Molloy AM, Einri CN, Jain D, Laird E, Fan R, Wang Y, et al. Is low iron status a risk factor for Neural Tube Defects? *Birth Defects Res*. 2014;100:100–6.
217. Adams JB, Sorenson JC, Pollard EL, Kirby JK, Audhya T. Evidence-based recommendations for an optimal prenatal supplement for women in the U.S., Part Two : Minerals. *Nutrients*. 2021;13:1849–77.

218. Hu H, Liu Z, Li J, Li S, Tian X, Lin Y, et al. Correlation between Congenital Heart Defects and maternal copper and zinc concentrations. *Birth Defects Res (Part A)*. 2014;100(17):965–72.
219. Hui C, Gao J. Maternal serum zinc concentration and neural tube defects in offspring: a meta-analysis. *J Matern Neonatal Med*. 2020;12(4):682–701.
220. Yin S, Wang C, Wei J, Wang D, Jin L, Liu J. Essential trace elements in placental tissue and risk for fetal neural tube defects. *Environ Int*. 2020;139:688–701.
221. Yan L, Wang B, Li Z, Liu Y, Huo W, Wang J, et al. Association of essential trace metals in maternal hair with the risk of neural tube defects in offspring. *Birth Defects Res*. 2017;109:234–43.
222. Li H, Zhang J, Niswander L. Zinc deficiency causes neural tube defects through attenuation of p53 ubiquitylation. *Development*. 2018;145(13):797–816.
223. Nikolopoulou E, Galea GL, Rolo A, Greene ND, Andrew J. Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development*. 2017;144(4):552–66.
224. Stokes B, Sabatino J, Zohn I. High levels of iron supplementation prevents neural tube defects in the *Fpn1(ffe)* mouse model. *Birth Defects Res*. 2017;109:81–91.
225. Bin W, Huo W, Liu Y, Zhu Y, Xie J, Li Z, et al. Are concentrations of alkaline earth elements in maternal hair associated with risk of neural tube defects? *Sci Total Environ*. 2017;609:694–700.
226. Kundak AA, Pektas A, Zenciroglu A, Ozdemir S, Barutcu UB, Orun UA. Do toxic metals and trace elements have a role in the pathogenesis of conotruncal heart malformations. *Cardiol Young*. 2017;27(2):312–7.
227. Kocylowski R, Grzesiak M, Gaj Z, Lorenc W, Bakinowska E, Barańkiewicz D, et al. Associations between the level of trace elements and minerals and folate in maternal serum and amniotic fluid and congenital abnormalities. *Nutrients*. 2019;11:328–41.
228. Manojkanna K, Chandana C, Priya V, Gayathri R. Role of magnesium in the expression of MSX-1 and PAX9 molecules during early tooth development. *Drug Invent Today*. 2018;10(Esp):2743–6.
229. Wang L, Wu X, Peng Y, Yang Q, Chen X, Zhu Y, et al. Quantitative analysis of homocysteine in liquid by terahertz spectroscopy. *Biomed Opt Express*. 2020;11(5):2570–7.

230. Aydin A, Orhan V. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and clinical importance in epilepsy patients using valproic acid , carbamazepine and levetiracetam. *J Lab Med.* 2017;41(3):147–51.
231. Smith A, Refsum H. Homocysteine – from disease biomarker to disease prevention. *J Intern Med.* 2021;290:826–54.
232. Surmiak P, Baumert MB, Paprotny M. Abnormal Biomarkers of Homocysteine Metabolism in Neonates with Conotruncal Heart Defects. 2017;2017.
233. Zhang Q, Bai B, Mei X, Wan C, Cao H, Li D, et al. Elevated H3K79 homocysteinylolation causes abnormal gene expression during neural development and subsequent neural tube defect. *Nat Commun.* 2018;9:3436–52.
234. Yang M, Li W, Wan Z, Du Y. Elevated homocysteine levels in mothers with neural tube defects: a systematic review and meta-analysis. *Fetal Neonatal Med.* 2017;30:2051–7.
235. Kaján J, Jakubowski H. Dysregulation of epigenetic mechanisms of gene expression in the pathologies of hyperhomocysteinemia. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):3140–54.
236. Hong G, Guao J, Wang F, Hua B, Yong Q, Zheng P, et al. Higher serum homocysteine and lower thyroid hormone levels in pregnant women are associated with neural tube defects. *J Trace Elem Med Biol.* 2021;68:814–28.
237. Sahin U, Gulumser C, Kocaman E, Varan B, Baraytar N, Yanit F. Maternal and cord blood homocysteine, vitamin B12, folate, and B-type natriuretic peptide levels at term for predicting congenital heart disease. *J Matern Neonatal Med.* 2020;33(2649–2656).
238. Lai G, Wang L, Li Z, Zhao Y. Homocysteine downregulates cardiac homeobox transcription factor NKX2. *Hear Circ Physiology.* 2020(6):1380–6.
239. Herrera M, Muñoz A, Parra S. Factores determinantes del estado nutricional del folato y el rol de la variante genética C677T de la enzima metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHFR). *Rev Chil Nutr.* 2016;43(4):336–45.
240. Martín D. Caracterización fenotípica y genética del síndrome de Smith Lemli Opitz en Cuba. [tesis doctoral] Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara; 2015.
241. Lardoeyt R, Taboada N, Vázquez V, Marcheco B, Rojas I, Herrera M, et al. Fundamentos de Genética Médica Poblacional. La Habana: ECIMED; 2016. 366 p.
242. Carinci F, Palmieri A, Scapoli L, Cura F, Borelli F, Morselli PG, et al. Non-syndromic cleft palate : Association analysis on three gene polymorphisms of the folate pathway in



- Asian and Italian populations. *Mol Biol Dentistry*. 2019;33:1–15.
243. Martinelli M, Girardi A, Cura F. Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Asian populations: Association analysis on three gene polymorphisms of the folate pathway. *Arch Oral Biol*. 2016;61:79–82.
244. Yuan Y, Yu X, Niu F, Lu N. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase as a potential risk factor for congenital heart disease. *Medicine (Baltimore)*. 2017;23:757–65.
245. Hernandez T, Rodriguez I, Guillen B, Rodriguez H, Lorenzo J, Corrales A, et al. Admixture mapping of sepsis in european individuals with african ancestries. *Front Med*. 2022;8(9):1–11.
246. Reyes L, Godfrey D, Ming J, McLean C, González F, Madrigal L. The distribution in native populations from Mexico and Central America of the C677T variant in the MTHFR gene. *Am J Hum Bliology*. 2021;17:2356–69.
247. Fang Y, Zhang R, Zhi X, Zhao L, Cao L, Wang Y, et al. Association of main folate metabolic pathway gene polymorphisms with neural tube defects in Han population of Northern China. *Childs Nerv Syst*. 2018;34:725–9.
248. Zhang C, Huo J, Sun J, Huang J, Piao W, Et A. Meta-analysis on relationship between the Chinese maternal MTHFR gene polymorphism(C677T) and neural tube defects in offspring. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2018;47(2):312–7.
249. Aranda S, Bobadilla M, Corona R, Cuero Q, Santana H, Baldomero L, et al. MTHFR C677T and A1298C variants in Mexican mestizo infants with neural tube defects from Western Mexico. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2021;61(5):188–92.
250. Pezzetti F, Martinelli M, Scapoli L. Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat*. 2004;24:104–5.
251. Moslem M, Golchin N, Safaei M, Rezaei F, Abbasi H, Sadegh M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is not associated with the risk of nonsyndromic cleft lip / palate : An updated meta-analysis. *Sci Rep*. 2020;10:1531–44.
252. Wang X, Wei H, Tian Y, Wu Y, Luo L. Genetic variation in folate metabolism is associated with the risk of conotruncal heart defects in a Chinese population. *BMC*

- Pediatr. BMC Pediatrics; 2018;18:287–95.
253. Li Z, Jun Y, Zhong B, Jie L, Jian M. Association between MTHFR C677T polymorphism and congenital heart disease. A family-based metaanalysis. *Herz*. 2015;40(Suppl):160–7.
  254. Cyril C, Rai P, Chandra N, Gopinath P, Satyamoorthy K. MTHFR gene variant C677T, A1298C and association with Down syndrome: A case-control study from South India. *Indian J Hum Genet*. 2009;15:60–4.
  255. Kokotas H, Grigoriadou M, Mikkelsen M, Giannoulia K, Petersen M. Investigating the impact of the Down syndrome related common MTHFR 677C>T polymorphism in the Danish population. *Dis Markers*. 2009;27:279–85.
  256. Zhang R, Huo C, Wang X, Dang B, Mu Y, Wang Y. Two Common MTHFR Gene Polymorphisms ( C677T and A1298C ) and Fetal Congenital Heart Disease Risk : An Updated Meta- Analysis with Trial Sequential Analysis. *Cell Physiol Biochem*. 2018;45:2483–96.
  257. Wang L, Yang B, Zhou S, Gao H, Wang F, Zhou J, et al. Risk factors and methylenetetrahydrofolate reductase gene in congenital heart disease. *J Thorac Dis*. 2018;10(1):441–7.
  258. Yu Y, Jia C, Shi Q, Zhu Y, Liu Y. Hyperhomocysteinemia in men with a reproductive history of fetal neural tube defects. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(2):16–8.
  259. Cáceres R, Salamanca C, Krause B, Recabarren A, Pantoja R, Leiva N, et al. Nonsyndromic orofacial clefts in Chile : LINE-1 methylation and MTHFR variants. *Epigenomics*. 2020;12(20):1783–91.
  260. Abdulla R, Kudkuli J, Kapoor S, Prabhu V, Shetty P, Aziz NZ. Single - nucleotide polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase gene in a South Indian cohort with nonsyndromic cleft lip with or without palate. *J Oral Maxillofac*. 2020;24:453–8.
  261. Katlan B, Kesici S, Bayrakci B. Association of fetal MTHFR polymorphism with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Crit Care Med*. 2021;22(Suppl 1):724–5.
  262. Litman EA, Robinson TD, Munshi UK, Whyte C. Journal of Pediatric Surgery Case Reports Left-sided gastroschisis : A case report and review of the literature. *J Pediatr Surg Case Reports*. 2018;36(July):50–3.
  263. Vandana R. Fetal MTHFR C677T polymorphism confers no susceptibility to Down

- syndrome: Evidence from meta-analysis. *Egypt J Med Hum Genet.* 2018;19(2):53–8.
264. Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down Syndrome. *Am J Hum Genet.* 2000;67:623–30.
265. Yakub M, Moti N, Parveen S, Chaudhry B, Azam I, Iqbal M. Polymorphisms in MTHFR, MS and CBS genes and homocysteine levels in a Pakistani population. *PLoS One.* 2012;7(3):3222–34.
266. Nguyen M, Lupo P, Northrup H, Morrison A, Cirino A, Sing A. Maternal gene micronutrient interactions related to one carbon metabolism and the risk of myelomeningocele among offspring. *Birth Defects Res.* 2017;109(2):99–105.
267. Tsang B, Devine O, Cordero A, Marchetta C, Mulinare J, Mersereau P, et al. Assessing the association between the methylenetetrahydrofolate reductase ( MTHFR ) 677C-T polymorphism and blood folate concentrations : a systematic review and meta-analysis of trials and observational studies. *Am J Clin Nutr.* 2015;101(6):1186–94.
268. Nash A, Mandaviya P, Dib M, Uitterlinden A, van Meurs J, Heil S, et al. Interaction between plasma homocysteine and the mthfr c.677c > t polymorphism is associated with site-specific changes in DNA methylation in humans. *FASEB J.* 2018;33:833–43.
269. Mandaviya P, Joehanes R, Aïssi D, Kühnel B, Marioni R, Truong V, et al. Genetically defined elevated homocysteine levels do not result in widespread changes of DNA methylation in leukocytes. *PLoS One.* 2017;12:472–86.

## AUTOBIBLIOGRAFÍA

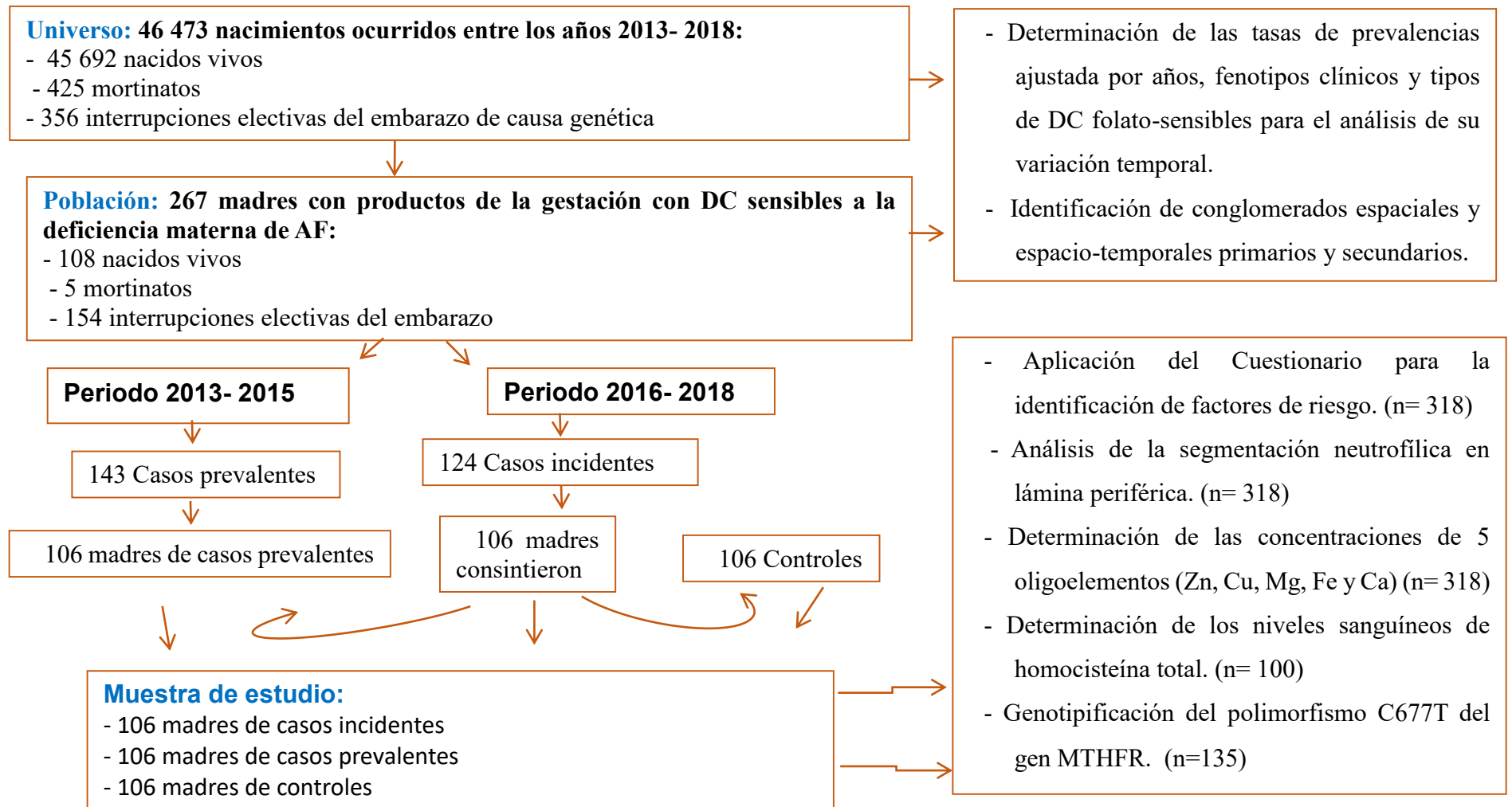
- 1- Taboada Lugo N, Lardoeyt Ferrer R, López Cárdenas M, Arcas Ermeso G. Uso de medicamentos durante el embarazo y su posible efecto teratogénico. *Rev Cubana Med Gen Integr.* 2004;20(4):1–10.
- 2- Taboada Lugo N, Lardoeyt Ferrer R, Quintero Escobar K, Torres Sánchez Y. Propuesta de una metodología de asesoramiento genético prenatal para la prevención de defectos congénitos inducidos por medicamentos. *Rev Cubana Med Gen Integr.* 2004;20(5–6):1–12.
- 3- Taboada Lugo N, León Mollinedo C, Martínez Chao Z, Díaz Inufio O, Quintero Escobar K. Comportamiento de algunos factores de riesgo para malformaciones congénitas mayores en el municipio de Ranchuelo. *Rev Cubana Obstet y Ginecol.* 2006;32(2):1–13.
- 4- Taboada Lugo N, Lardoeyt Ferrer R. Primer estudio epidemiológico de los defectos congénitos en Asmara, Eritrea. Periodo septiembre 2015-Julio 2007. *Rev Cubana Genet Comunit.* 2008; 2(2): 29-36.
- 5- Taboada Lugo N, Rodríguez Licea A, Acosta Camacho O, Pérez Estévez O, Díaz Seranega R, Rodríguez Vivar LJ, et al. Caracterización clínico genética del síndrome Down en el Estado Plurinacional de Bolivia. *Rev Cubana Genet Comunit.* 2011;5(2–3):82–8.
- 6- Taboada Lugo N, Bravo Téllez O, Licea Rodríguez MA, Acosta Camacho O, Pérez Estévez O, Díaz Saraniega R, et al. Discapacidad intelectual: aproximación a las principales causas en el Estado Plurinacional de Bolivia. *Rev Cubana Genet Comunit.* 2011;5(2–3):50–6.
- 7- Taboada Lugo N, Bravo Téllez O, Licea Rodríguez MA, Acosta Camacho O, Pérez Estévez O, Díaz Saraniega R, et al. Caracterización etiológica, clínica y genética de las discapacidades mayores en el Estado Plurinacional de Bolivia. *Rev Cubana Genet Comunit.* 2011;5(2–3):70–7.
- 8- Orihuela Mercado O, Taboada Lugo N, Lardoeyt Ferrer R, Quintero Escobar K. Prevalencia y caracterización clínico genética del síndrome de Down en la zona Paitití del municipio Trinidad, Departamento Beni, Bolivia; 2012. *Rev Investig Inf Salud.* 2014;21(9):17–27.
- 9- Taboada Lugo N. Papel del ácido fólico, zinc y cobre en la prevención primaria de los defectos congénitos. *Rev Cubana Med Gen Integr.* 2016;35(4).

- 10- Lardoeyt Ferrer R, Taboada Lugo N, Vázquez Sánchez V, Marcheco Teruel B, Rojas Betancourt I, Herrera Martínez M, et al. Fundamentos de Genética Médica Poblacional. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2016. 366 p.
- 11- Taboada Lugo N, Herrera Martínez M, Algora Hernández AE, Noche González G, Noa Machado MD. Conglomerados espacio-temporales de DTN y niveles maternos de AFP en Villa Clara ( 2011-2015 ). Rev Cubana Obstet Ginecol. 2016;42(4):451–63.
- 12- Taboada Lugo N, Lardoeyt Ferrer R. Impacto de la consanguinidad en recién nacidos con defectos congénitos en Asmara, Eritrea. En: Fundamentos de Genética Médica Poblacional. La Habana.: ECIMED; 2016. p. 191–4.
- 13- Taboada Lugo N. Consideraciones éticas en el diagnóstico prenatal y el asesoramiento genético. Hum Med. 2017;17(1):2–16.
- 14- Taboada Lugo N. El zinc y el cobre : micronutrientes esenciales para la salud humana. Rev Acta Med Centro. 2017;11(2):79–89.
- 15- Taboada Lugo N. El consentimiento informado en la práctica asistencial e investigativa de la Genética Clínica. Rev Acta Med Centro. 2017;11(3):88–100.
- 16- Taboada Lugo N. Dilemas éticos en la interrupción del embarazo por malformaciones congénitas. Hum Med. 2017; 17(1): 17-30.
- 17- Taboada Lugo N, Mollineda Trujillo A, Herrera Martínez M, Algora Hernández A, Noche González G, Noa Machado M. Niveles séricos de zinc y cobre en madres con descendencia afectada por defectos del tubo neural. Rev Cubana Pediatr. 2017;89(3):299–309.
- 18- Taboada Lugo N. La vía de señalización Notch en el origen de algunas malformaciones congénitas. Rev Cubana Ginecol Obstet. 2018; 44(3): 1-17.
- 19- Taboada Lugo N. Una aproximación histórico-religiosa , jurídica y bioética al aborto provocado de causa genética. Rev Acta Med Centro. 2018;12(1):81–92.
- 20- Taboada Lugo N, Herrera Martinez M. Mecanismos epigenéticos y vía de señalización Notch en el origen de diferentes defectos congénitos. Rev Medicentro Elect. 2018;22(3):197–207.
- 21- Taboada Lugo N. Avances en el conocimiento de las bases moleculares y celulares de las cardiopatías congénitas . Parte 1 de 2 : Morfogénesis cardíaca. Rev CorSalud. 2019;11(3):233–40.
- 22- Taboada Lugo N. Avances en el conocimiento de las bases moleculares y celulares de las

- cardiopatías congénitas . Parte 2 y última : Cardiopatías congénitas. Rev CorSalud. 2019;11(4):307–16.
- 23- Taboada Lugo N. Factores epigenéticos involucrados en el origen de defectos congénitos relacionados con la deficiencia materna de AF y otros micronutrientes. Rev Acta Med Centro. 2019;13(3):439–54.
- 24- Taboada Lugo N, Algora Hernández AEA, Noche González G, Herrera Martínez M, González Herrera L, Anoceto Armiñana E. Prenatal Diagnosis of Congenital Anterior Abdominal Wall Defects in Villa Clara, Cuba, 1994 - 2019: A Retrospective Analysis. EC Gynaecol. 2019;10(6):8–18.
- 25- Taboada Lugo N, Mollineda Trujillo Á, Herrera Martínez M. Serum copper, zinc, calcium and magnesium levels in mothers with offspring affected by neural tube defects: a case-control study. Rev Cubana Investig Biomed. 2019;38(1):1–9.
- 26- Taboada Lugo N, Lardoeyt Ferrer R. Validación de un cuestionario sobre factores de riesgo para los defectos congénitos. Rev Cubana Investig Biomed. 2019;38(4):1–11.
- 27- Taboada Lugo N, Herrera Martínez M, Hernández González G, Hernández Ledesma H. Geospatial and temporal clustering of Folic Acid- Sensitive Congenital Defects in Villa Clara province, Cuba. Biomed J Sci Tech Res. 2020;29(5):22818–26.
- 28- Taboada Lugo N, Herrera Martínez M, Hernández González G, Ledesma Hernández H. Spatiotemporal distribution of non-syndromic orofacial clefts in Villa Clara Province, Cuba, 2013 – 2018. MEDICC Review. 2021;23(2):2013–8.
- 29- Taboada Lugo N, Algora Hernández AEA, Herrera Martínez M, De la Torre Santos ME, Piedra Morales O, Anoceto Armiñana E. Prevalence and associated anomalies in Gastroschisis and Omphalocele cases in Villa Clara , Cuba : A 30-Year Series from 1990 to 2019. Biomed J Sci Tech Res. 2021;36(3):28543–51.
- 30- Taboada Lugo N. Implication of molecular and cellular mechanisms in congenital defects sensitive to folate deficiency. EC Gynaecol. 2021;10(6):57–68.
- 31- Taboada Lugo N, Algora Hernández AE, de la Torres Santos ME, Herrera Martínez M, Noche González G, Arcas Ermeso G. Aberraciones cromosómicas y defectos congénitos asociados al onfalocele. Rev Acta Med Centro.2022; 16(2): 207-219.

## ANEXOS INTRODUCCIÓN

### ANEXO 1. Diagrama de la investigación.



## ANEXO 2. Cuestionario para la identificación de factores de riesgo.

### I-Datos personales y demográficos:

FUM: \_\_\_\_\_ Caso: \_\_\_ Control: \_\_\_ Tipo de DC \_\_\_\_\_ Fenotipo clínico \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ 1- Edad de la madre en el momento de la concepción: \_\_\_\_\_ 2- Edad del padre: \_\_\_\_\_ 3- Consejo Popular de residencia: \_\_\_\_\_ 4- Municipio: \_\_\_\_\_  
5- Residencia: Urbana\_\_ Semiurbana\_\_ Rural\_\_ 6- Escolaridad terminada: Primaria\_\_ Secundaria u Obrero Calificado\_\_ Técnico Medio o Preuniversitario\_\_ Universitaria\_\_ 7- Ocupación: Estudiante\_\_ Ama de casa\_\_ Trabajadora o cuentapropista\_\_ Especificar actividad laboral: \_\_\_\_\_

### II- Antecedentes patológicos personales:

D Mellitus (Tipo: \_\_\_) Distiroidismos: Tipo: \_\_\_\_\_ Epilepsia\_\_ A Bronquial (Grado: \_\_\_\_\_) HTA\_\_ Síndrome de mala absorción\_\_ Enfermedades autoinmunes: Tipo: \_\_\_\_\_ Procesos oncoproliferativos: Tipo: \_\_\_\_\_ Otras enfermedades: \_\_\_\_\_ No sabe \_\_\_\_\_

**III- Historia Genética:** 1- Antecedentes de MC previos en la familia (Nacidos vivos o TVE): No\_\_ Si\_\_ Línea materna\_\_ Línea paterna \_\_. Descripción: \_\_\_\_\_ Relación de parentesco entre el afectado y el RN: \_\_\_\_\_ 2- Antecedentes de hijos previos con MC en la pareja (Nacidos vivos o IEE): No \_\_ Si\_\_ Descripción: \_\_\_\_\_ Hijo de la madre\_\_ Hijo del padre\_\_ 3- Consanguinidad parental: No\_\_ Si\_\_ Grado de parentesco: \_\_\_\_\_ No sabe \_\_\_\_\_

### IV- Historia obstétrica:

1- Embarazo gemelar: Si\_\_ No\_\_ 2- Periodo intergenésico: \_\_\_\_\_ Primigesta: \_\_\_ 3- Antecedentes de abortos espontáneos: No\_\_ Si\_\_ Cantidad \_\_\_\_\_ 4- Usó tabletas anticonceptivas previo a este embarazo: No\_\_ Si\_\_ No recuerda (NR) \_\_\_ 5- Niveles de AFP en suero materno: Normal\_\_ Bajo\_\_ Elevado\_\_ No recuerda (NR) \_\_\_ 6- Niveles de líquido amniótico por US: Normal\_\_ Bajo\_\_ Elevado\_\_ No recuerda (NR) \_\_\_ 7- En algún momento del embarazo tuvo RCIU: Si\_\_ No\_\_ Trimestre: \_\_\_ No recuerda \_ 8- En algún momento del embarazo tuvo bajo peso: Si \_\_ No\_\_ Sobre peso: Si \_\_ No\_\_ NR\_\_ 9- Índice de masa corporal (según Historia Clínica Obstétrica): \_\_\_\_\_ No reflejada \_\_\_\_\_

### V- Enfermedades asociadas:

1- Agudas: Sepsis urinaria\_\_ Sepsis vaginal\_\_ Hiperemesis gravídica \_\_ IRA\_\_ \_\_\_ ITS Especificar tipo: \_\_\_\_\_ Arbovirosis (Zica u otras)\_\_ Especificar tipo: \_\_\_\_\_ TORCHS:\_\_\_ Especificar tipo: \_\_\_\_\_ Enfermedad hipertensiva gravídica:\_\_\_ Otras enfermedades:\_\_\_ Especificar:\_\_\_\_\_ 2- Crónicas: Anemia\_\_ Otras enfermedades\_\_ Especificar: \_\_\_\_\_ No recuerda \_\_\_\_\_



**VI- Ingestión de ácido fólico (AF):**

1- Tomaba tabletas de AF antes del embarazo: Si\_\_\_ No\_\_\_ Tiempo (en meses) antes del embarazo: \_\_\_\_\_ No recuerda \_\_\_ 2- Tomó AF durante el embarazo: No \_\_\_ Si \_\_\_ No recuerda \_\_\_ Desde el comienzo del embarazo\_\_\_ Después de los 3 meses de embarazo\_\_\_ Edad gestacional (en meses) en que tomó AF: \_\_\_\_\_ No recuerda\_\_\_ Cantidad en miligramos que consumió: 1mg\_\_\_ 5mg\_\_\_ Otra: \_\_\_ Nunca lo consumió\_\_\_

3- Frecuencia y cantidad con que ingiere alguno de los siguientes alimentos ricos en folatos desde tres meses antes de la concepción y hasta el final del primer trimestre del embarazo. (Especificar cada vez la unidad de medida en porciones o raciones, unidades o vasos)

Descripción de los alimentos	Consumo			Frecuencia de consumo			Descripción de la unidad de medida	Número de veces
	Si	No	NR	Diaria	Semanal	Mensual		
Higado de pollo								
Higado de res								
Higado de carnero								
Berro								
Perejil								
Yema de huevo								
Maní								
Lechuga								
Espinaca								
Acelga								
Habichuela								
Chicharos								
Frijoles								
Lentejas								
Leche de vaca								
Jugo de naranja								
Jugo de Fruta B.								

3.1- Frecuencia y cantidad con que ingiere alguno de los siguientes alimentos ricos en folatos desde tres meses antes y hasta el momento de la toma de muestras biológicas. (Especificar cada vez la unidad de medida en porciones o raciones, unidades o vasos)

Descripción de los alimentos	Consumo			Frecuencia de consumo			Descripción de la unidad de medida	Número de veces
	Si	No	NR	Diaria	Semanal	Mensual		
Higado de pollo								
Higado de res								
Higado de carnero								
Berro								
Perejil								
Yema de huevo								
Maní								
Lechuga								
Espinaca								
Acelga								
Habichuela								
Chicharos								
Frijoles								
Lentejas								
Leche de vaca								
Jugo de naranja								
Jugo de Fruta B.								

4- Historia de consumo antes del embarazo (hasta 6 meses) y/o durante el primer trimestre de alguno de los medicamentos antagonistas del AF siguientes: Sulfaprim\_\_\_ Metotrexate\_\_\_ Fenitoina\_\_\_ Fenobarbital\_\_\_ Sulfadiazina\_\_\_ Otros\_\_\_ Especificar: \_\_\_\_\_ No recuerda \_\_\_

**VII- Exposición a agentes físicos durante el embarazo:**

1- Exposición directa a radiaciones ionizantes: Si\_\_\_ No\_\_\_ Tipo: \_\_\_\_\_ Edad gestacional (en meses) en que se expuso a las radiaciones: \_\_\_\_\_ No recuerda\_\_\_ 2- Exposición directa a fuentes de calor (Incluye laboral o doméstico): Si\_\_\_ No\_\_\_ Tipo(s) de fuentes de calor: \_\_\_\_\_ Edad gestacional (en meses) en que se expuso al calor: \_\_\_\_\_ No recuerda\_\_\_ 3- Antecedentes de fiebre durante el embarazo: Si\_\_\_ No\_\_\_ No recuerda\_\_\_ Temperatura (en grados centígrados):\_\_\_ Días de duración: \_\_\_\_\_ No recuerda\_\_\_ Duración en horas de la fiebre cada día: \_\_\_\_\_ Causa probable de la fiebre: \_\_\_\_\_ Edad gestacional (en meses) en que tuvo la fiebre: \_\_\_\_\_ No recuerda\_\_\_

**VIII- Exposición a agentes químicos durante el embarazo:**

1- Ingestión de bebidas alcohólicas durante el embarazo: Si\_\_\_ No\_\_\_ No recuerda\_\_\_ Tipo(s) de bebida(s): \_\_\_\_\_ No recuerda\_\_\_ Cantidad ingerida cada vez: \_\_\_\_\_ No recuerda\_\_\_ Frecuencia de consumo semanal: \_\_\_\_\_ No recuerda\_\_\_ Edad gestacional (en meses) en que consumió la(s) bebida(s): \_\_\_\_\_ No recuerda\_\_\_ 2- Consumo de tabaco durante el embarazo: Si\_\_\_ No\_\_\_ Fumadora pasiva: Si\_\_\_ No\_\_\_ Cantidad de cigarrillos al día: \_\_\_\_\_ No recuerda\_\_\_ Frecuencia de consumo semanal: \_\_\_\_\_ No recuerda\_\_\_ Edad gestacional (en meses) en que fumó: \_\_\_\_\_ No recuerda\_\_\_ 5- Consumo de otros medicamentos durante el embarazo (considerando además vacunas no habituales o anestesia general) Si\_\_\_ No\_\_\_ No recuerda\_\_\_ Si recuerda el tipo(s) de medicamento, dosis usada y duración del tratamiento en cada caso: Edad gestacional (en meses) en que tomó cada medicamento: \_\_\_\_\_

**IX- Resultados de Exámenes complementarios realizados:**

Segmentación neutrofílica: Grupo I: \_\_\_\_\_ Grupo II: \_\_\_\_\_ Grupo III: \_\_\_\_\_

Niveles de Hcis \_\_\_\_\_

Niveles de Oligoelementos:

Zinc: \_\_\_\_\_

Cobre: \_\_\_\_\_

Calcio: \_\_\_\_\_

Magnesio: \_\_\_\_\_

Hierro: \_\_\_\_\_

Genotipo Polimorfismo C677T \_\_\_\_\_

### **ANEXO 3. Modelos de consentimiento informado.**

#### **Modelo de Consentimiento Informado para la participación en el estudio**

Yo: \_\_\_\_\_

Después de haber recibido una detallada información por parte del especialista de Genética sobre las características y objetivos de la presente investigación y luego de haberme garantizado una completa confidencialidad en relación a toda la información que se obtenga sobre mi estado nutricional o de salud, la que no será divulgada a terceros y se usará solo con fines científicos.

Así como el derecho que me asiste a conocer los resultados de todas las determinaciones que se me realizarán, así como el de abandonar la investigación en el momento que así lo considere.

Expreso mi conformidad en participar completamente voluntaria en esta investigación, a que se me aplique el cuestionario de factores de riesgo en el embarazo, y de igual modo declaro mi disposición para que se me tome una muestra de sangre para la determinación de los niveles de Homocisteína y de algunos minerales o elementos químicos relacionados con el desarrollo adecuado del embarazo. Así como el análisis de la celularidad en un frotis sanguíneo como un indicador de los niveles de ácido fólico, vitamina que desempeña un importante papel en el desarrollo normal del embarazo.

Firma \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

#### **Modelo de Consentimiento Informado para el estudio de ADN**

Yo: \_\_\_\_\_

Expreso mi conformidad de que se me tome una muestra de sangre para la extracción de ADN y se realice la evaluación de posibles alteraciones en uno de los genes que interviene en el metabolismo de ácido fólico, así como doy\_\_\_\_\_, no doy\_\_\_\_\_ mi acuerdo de que se conserve dicha muestra para que se estudien otros genes relacionados con esta deficiencia que no son posibles estudiar en este momento, pero que pudieran ser factibles en el futuro.

Firma \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

## ANEXOS CAPÍTULO 2

**ANEXO 1.** Definición y operacionalización de variables clínicas, epidemiológicas y de riesgo.

1- Conglomerados: Se define como una agregación de casos en el espacio, en el tiempo o en el espacio y en el tiempo. (32) Valores finales: conglomerado temporal, espacial o espacio-temporal.

### 2- Variables clínicas:

- CCCT: Se definió como la presencia de defectos estructurales congénitos no sindrómicos que afectan el tracto de salida y las grandes arterias. Valores finales: tronco arterioso común, interrupción del arco aórtico, d-transposición de grandes arterias, doble salida del ventrículo derecho, defectos septales conoventriculares, tetralogía de Fallot y la atresia pulmonar o combinaciones de ellos. (27)

- DTN: Se definió como la presencia de DC del cráneo y/o la columna, por defectos en la fusión del tubo neural, de origen multifactorial. Valores finales: anencefalia, espina bífida abierta y encefalocele. (26)

- HLP: Se definió como la hendidura del labio superior y/o del paladar de origen no sindrómico. Valores finales: Labio leporino (LL) o fisurado con paladar hendido (PH), LL sin PH y PH. (32)

- Gastrosquisis: Se definió como el defecto aislado de la pared abdominal con extrusión intestinal a través de un defecto paraumbilical, no recubierto por membrana, pudiendo acompañarse de alteraciones intestinales, como necrosis, atresia, perforación o vólvulos. (26) (34)

- SD: Se definió como los casos con trisomía libre o total del cromosoma 21.

### 3- Variables epidemiológicas:

- Edad materna y paterna: Se define como la edad biológica de la madre y el padre en el momento de la concepción. Valor final: edad en años.

- Municipio de residencia: Se consideró el municipio donde estuvo residiendo la madre durante el periodo preconcepcional y del embarazo, con independencia de la dirección legal que consta en el documento de identidad. Valor final: uno de los trece municipios de Villa Clara.

- Lugar de residencia: Se describen como indicadores de urbanidad la densidad poblacional, extensión territorial e infraestructuras. Valores finales: Residencia urbana, semiurbana y rural. (152)

- Escolaridad: Se tomó como indicador el último nivel de enseñanza terminado. Valores finales: primaria, secundaria u obrero calificado, técnico medio o preuniversitario y universitaria.

- Ocupación: Se consideró la realización de un trabajo en virtud de un contrato por el que se recibe un salario. Valores finales: Ama de casa (cuando no existía ningún vínculo laboral) y trabajadora.

### 3- Variables de riesgo:

- Factores de riesgo modificables:

- Enfermedades maternas agudas: Enfermedades ocurridas durante el embarazo y generalmente de corta duración de etiología infecciosa. Valores finales: ninguna, sepsis respiratoria, urinaria, vaginal u otras.

- Enfermedades maternas crónicas: Enfermedades de larga duración, usualmente mayor de seis meses, ocurridas antes o durante el embarazo. Valores finales: ninguna, diabetes mellitus, hipertensión arterial (HTA), distiroidismos, epilepsia, asma bronquial u otras enfermedades.

- Diabetes: gestantes con diagnóstico de diabetes pregestacional (tipo I y tipo II) y cualquier estado de hiperglucemia en el primer trimestre de la gestación (considerado por encima de 4,4  $\mu\text{mol/L}$ ). (100) Valores finales: antecedentes o no de diabetes.

-HTA: gestante con diagnóstico de HTA crónica, y cualquier estado con cifras de tensión arterial consideradas elevadas durante el primer trimestre de la gestación (dos tomas mayores o igual a 140/90 mm Hg, con un intervalo de seis horas, o una única toma de 160/110 mm Hg. (100) Valores finales: Antecedentes o no de hipertensión arterial.

-Distiroidismo: gestantes con diagnóstico clínico de trastornos metabólicos en los niveles de las hormonas tiroideas. Valores finales: hipotiroidismo e hipertiroidismo.

-Epilepsia: gestantes con diagnóstico clínico de la enfermedad. Valores finales: Antecedentes o no de epilepsia.

-Asma bronquial: gestantes con diagnóstico clínico de cualquier grado de la enfermedad. Valores finales: Antecedentes o no de asma bronquial.

- Consumo de bebidas alcohólicas: Consumo referido de bebidas alcohólicas en el primer trimestre del embarazo, con independencia del tipo, cantidad y frecuencia ingerida. Valores finales: Consumo de bebidas o no consumo.

- Exposición al humo de cigarrillos: Consumo de cigarrillos por parte de la gestante o de sus convivientes con una periodicidad diaria. Valores finales: No fumadora, fumadora activa, fumadora Pasiva.

- Exposición a radiaciones ionizantes: Exposición a cualquier fuente de radiaciones ionizantes durante el primer trimestre del embarazo. Valores finales: exposición o no exposición a Rx.

- Exposición a productos químicos: Exposición de productos químicos de uso laboral o doméstico durante el primer trimestre del embarazo. Valores finales: exposición o no exposición a productos químicos.

- Hipertermia: Presencia de fiebre mantenida por más de tres días y mayor de 38°C, o exposición a fuentes de calor en el primer trimestre del embarazo. Valores finales: fiebre en el embarazo, exposición a fuente de calor doméstico o laboral.

- Consumo de medicamentos no habituales: Consumo de cualquier medicamento en el primer trimestre del embarazo, excepto las tabletas de AF, Prenatal, Muferr o Fumarato Ferroso.

- Factores de riesgo no modificables:

- Edades maternas extremas: Se consideró a las edades maternas no incluidas en el rango comprendido entre los 16 y 34 años de edad. Valores finales: madre adolescente: menor o igual a 15 años, avanzada edad materna: mayor o igual a 35 años. (53)

- Edad materna menor de 20 años: Esta variable fue dicotomizada para el análisis particular de las madres de los casos con GS, de acuerdo a consistencia con la literatura científica. (34) (64)

- Avanzada edad paterna: Edad paterna mayor o igual a 45 años. (100) Valores finales. Avanzada edad paterna o no avanzada edad paterna.

- Sexo fetal: Se definió como la condición orgánica que distingue lo masculino de lo femenino según el examen físico, la entrevista a la madre o la revisión del RECUPREMAC y el RECUMAC. Valores finales: masculino y femenino.

- Factores de riesgo nutricionales: Características o trastornos relacionados con la nutrición, tanto por macro, como micronutrientes. Se incluyen las siguientes:

- Alteraciones del peso materno: Resultado de la valoración nutricional durante el embarazo, de acuerdo al índice de masa corporal (IMC). Valores finales: Bajo peso (IMC inferior a 18,0%), sobre peso (IMC mayor o igual a 25,5%) y obesidad (IMC mayor o igual a 30%). (100)

- Anemia en el embarazo: Valores de hemoglobina por debajo de 11 g/dl en el primer trimestre del embarazo. (100) Valores finales: Antecedentes de anemia o no antecedentes de anemia.

- Deficiencia o niveles elevados de uno o más micronutrientes: Valores por debajo o por encima de los límites de corte considerados normales. (Ver definición de variables hematológicas y bioquímicas)

- Consumo deficiente de folatos: Consumo diario de alimentos ricos en folatos por debajo de los niveles recomendados en el embarazo (450 µg/ día), de acuerdo al resultado de la encuesta semicuantitativa de consumo de alimentos y del programa informático CERES +. (99) Valores finales: Consumo deficiente de folatos o consumo adecuado de folatos.

- No consumo preconcepcional de ácido fólico (AF): No consumo referido, al menos un mes antes del embarazo, de suplementos de ácido fólico. Valores finales: Consumo preconcepcional o no de AF.

- Periodo intergenésico corto: Se definió como el periodo menor a los 24 meses entre la fecha de ocurrencia del último evento obstétrico y la fecha de concepción del siguiente embarazo, según fecha de última menstruación. (101) Valores finales: Presencia o no de periodo intergenésico corto.

- Consumo de antagonistas del AF: Consumo de alguno de los medicamentos con conocido efecto antifolínico. (Metotrexate, Sulfraprim, Sulfadiazina, Anticonvulsivantes, Metformina). (21) Valores finales: Consumo o no de antagonistas de AF.

- Consumo de tabletas anticonceptivas: Consumo referido de tabletas anticonceptivas hasta comienzos del embarazo. Valores finales: Consumo o no de tabletas anticonceptivas.

- Factores de riesgo genético:

- Antecedentes familiares de DC o enfermedades genéticas: Presencia de al menos un familiar con cualquier DC o enfermedad genética de una de las tres etiologías genéticas reconocidas. (241) Valores finales: antecedentes familiares de primer, segundo o tercer grado, antecedentes por vía materna, paterna o ambas.

- Historia de abortos espontáneos o muertes fetales: Se refiere a la historia de pérdidas fetales espontáneas. Valores finales: Abortos espontáneos (antes de las 20 semanas de embarazo) y muertes fetales (después de las 20 semanas del embarazo). (101)

- Presencia de consanguinidad parental: Se refiere a la cualidad de descender del mismo antepasado que otra persona. Se incluyó la presencia de consanguinidad hasta un tercer grado de parentesco entre los miembros de la pareja. (241) Valores finales: Presencia o no de consanguinidad.

- Marcadores de riesgo materno fetal:

- Oligoamnios: Se refiere al volumen deficiente de líquido amniótico con un índice de líquido amniótico (ILA) por debajo de 8 cm. (100) Valores finales: Presencia o no de oligoamnios.

- Polihidramnios: Se definió como el aumento del volumen de líquido amniótico, con un ILA con valores iguales o superiores a 25 cm. (100) Valores finales: Presencia o no de polihidramnios.

- Restricción del crecimiento intrauterino (RCIU): Se refiere a la incapacidad del feto para alcanzar su potencial genético de crecimiento biológicamente determinado, de acuerdo al resultado de la biometría fetal o flujometría doppler. (101) Valores finales: Presencia o no de RCIU.

- Gemelaridad: producto de la concepción procedente de un embarazo múltiple. (100) Valores finales: Presencia o no de gemelaridad.

- Niveles alterados de Alfafoeto proteína (AFP): Se refiere a los valores séricos de AFP no incluidos en el rango normal entre 0,5 a 2,00 múltiplos de la mediana. Valores finales: AFP baja y AFP elevada. (92)

**ANEXO 2.** Frecuencias y prevalencias de los diferentes grupos de DC folato-sensibles según años y condición al nacer. Villa Clara 2013-2018.

Estadísticas vitales				Conjunto de DC								CCCT								DTN								
Años	NV	NM	Total	IEE	NV	TP	NM	TP	IEE	%	Total	PA	NV	TP	NM	TP	IEE	%	Total	PA	NV	TP	NM	TP	IEE	%	Total	PA
2013	7909	73	7982	69	20	2,53	2	27,40	33	60,0	55	6,89	4	0,51	1	13,7	7	58,3	12	1,50	2	0,25	0	0,00	12	85,7	14	1,75
2014	7825	63	7888	51	23	2,94	0	0,00	20	46,5	43	5,45	11	1,41	0	0	5	31,2	16	2,02	0	0,0	0	0,00	6	100	6	0,76
2015	7886	54	7940	65	21	2,66	0	0,00	24	53,3	45	5,67	7	0,89	0	0	8	53,3	15	1,89	1	0,13	0	0,00	5	83,3	6	0,76
2016	7339	70	7409	56	19	2,59	2	28,57	25	54,4	46	6,21	6	0,82	2	28,6	8	50,0	16	2,16	2	0,27	0	0,00	3	60,0	5	0,67
2017	7277	83	7360	59	13	1,79	0	0,00	25	65,7	38	5,16	3	0,41	0	0	5	62,5	8	1,08	2	0,27	0	0,00	11	84,6	13	1,77
2018	7456	82	7538	56	12	1,61	1	12,20	27	67,5	40	5,31	6	0,80	0	0	7	53,8	13	1,72	3	0,40	1	12,20	11	73,3	15	1,99
<b>Total</b>	<b>45692</b>	<b>425</b>	<b>46117</b>	<b>356</b>	<b>108</b>	<b>2,36</b>	<b>5</b>	<b>11,76</b>	<b>154</b>	<b>57,7</b>	<b>267</b>	<b>5,79</b>	<b>37</b>	<b>0,81</b>	<b>3</b>	<b>7,1</b>	<b>40</b>	<b>50,0</b>	<b>80</b>	<b>1,73</b>	<b>10</b>	<b>0,22</b>	<b>1</b>	<b>2,35</b>	<b>48</b>	<b>81,36</b>	<b>59</b>	<b>1,28</b>

Años	HLP								GS								SD							
	NV	TP	NM	TP	IEE	%	Total	PA	NV	TP	NM	TP	IEE	%	Total	PA	NV	TP	NM	TP	IEE	%	Total	PA
2013	5	0,63	0	0,00	1	16,6	6	0,75	0	0,00	1	13,7	8	88,9	9	1,13	9	1,14	0	0,00	5	35,7	14	1,75
2014	5	0,64	0	0,00	1	16,6	6	0,76	0	0,00	0	0,00	3	100,0	3	0,38	7	0,89	0	0,00	5	41,6	12	1,52
2015	5	0,63	0	0,00	2	28,6	7	0,88	1	0,13	0	0,00	3	75,0	4	0,50	7	0,89	0	0,00	6	46,2	13	1,64
2016	7	0,95	0	0,00	1	12,5	8	1,08	0	0,00	0	0,00	7	100,0	7	0,94	4	0,55	0	0,00	6	60,0	10	1,35
2017	6	0,82	0	0,00	1	14,3	7	0,95	0	0,00	0	0,00	3	100,0	3	0,41	2	0,27	0	0,00	5	71,4	7	0,95
2018	2	0,27	0	0,00	0	0,00	2	0,27	0	0,00	0	0,00	5	100,0	5	0,66	1	0,13	0	0,00	4	80,0	5	0,66
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>0,66</b>	<b>0</b>	<b>0,00</b>	<b>6</b>	<b>16,67</b>	<b>36</b>	<b>0,78</b>	<b>1</b>	<b>0,02</b>	<b>1</b>	<b>2,35</b>	<b>29</b>	<b>93,55</b>	<b>31</b>	<b>0,67</b>	<b>30</b>	<b>0,66</b>	<b>0</b>	<b>0,00</b>	<b>31</b>	<b>50,82</b>	<b>61</b>	<b>1,32</b>

DC: defectos congénitos, CCCT: cardiopatías congénitas conotruncales, DTN: defectos del tubo neural, HLP: hendiduras labiopalatinas, GS: gastroquiasis, SD: síndrome Down. Fuentes:

Departamento de estadísticas de la Dirección Provincial de Salud, Villa Clara y RECUMAC y RECUPREMAC, Base de datos de la investigación.



**ANEXO 3.** Frecuencia y prevalencia ajustada por años según fenotipo específico de defecto congénito folato sensible. Villa Clara 2013-2018.

	2013			2014			2015			2016			2017			2018			Total		
	N	%	PA	N	%	PA	N	%	PA	N	%	PA	N	%	PA	N	%	PA	N	PA	
T Fallot	4	33,33	0,50	5	31,25	0,63	4	26,67	0,50	3	18,75	0,40	3	37,50	0,41	3	23,08	0,40	22	27,50	0,48
TGA	3	25,00	0,38	1	6,25	0,13	3	20,00	0,38	1	6,25	0,13	0	0,00	0,00	1	7,69	0,13	9	11,25	0,20
DSCT	2	16,67	0,25	7	43,75	0,89	3	20,00	0,38	5	31,25	0,67	4	50,00	0,54	2	15,38	0,27	23	28,75	0,50
AP	2	16,67	0,25	2	12,50	0,25	2	13,33	0,25	2	12,50	0,27	0	0,00	0,00	1	7,69	0,13	9	11,25	0,20
TAC	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00	1	12,50	0,14	0	0,00	0,00	1	1,25	0,02
DSVD	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00	1	6,67	0,13	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00	1	1,25	0,02
Combinaciones dos o más	1	8,33	0,13	1	6,25	0,13	2	13,33	0,25	5	31,25	0,67	0	0,00	0,00	6	46,15	0,80	15	18,75	0,33
Total CCCT	12	100,00	1,50	16	100,00	2,02	15	100,00	1,90	16	100,00	2,16	8	100,00	1,08	13	100,00	1,72	80	100,00	1,73
Anencefalia	6	42,86	0,75	3	50,00	0,38	4	66,67	0,50	1	20,00	0,13	10	76,92	1,36	5	33,33	0,66	29	49,15	0,63
EB	8	57,14	1,00	2	33,33	0,25	2	33,33	0,25	3	60,00	0,40	1	7,69	0,14	9	60,00	1,20	25	42,37	0,54
Encefalocele	0	0,00	0,00	1	16,67	0,13	0	0,00	0,00	1	20,00	0,13	2	15,38	0,27	1	6,67	0,13	5	8,47	0,11
Total DTN	14	100,00	1,75	6	100,00	0,76	6	100,00	0,76	5	100,00	0,67	13	100,00	1,77	15	100,00	1,99	59	100,00	1,28
LL con PH	4	66,67	0,50	2	33,33	0,25	2	28,57	0,25	4	50,00	0,54	3	42,86	0,41	1	50,00	0,13	16	44,44	0,35
LL sin PH	1	16,67	0,13	1	16,67	0,13	5	71,43	0,63	1	12,50	0,13	4	57,14	0,54	0	0,00	0,00	12	33,33	0,26
PH	1	16,67	0,13	3	50,00	0,38	0	0,00	0,00	3	37,50	0,40	0	0,00	0,00	1	50,00	0,13	8	22,22	0,17
Total HLP	6	100,00	0,75	6	100,00	0,76	7	100,00	0,88	8	100,00	1,08	7	100,00	0,95	2	100,00	0,27	36	100,00	0,78
Gastrosquisis	9	29,03	1,13	3	9,68	0,38	4	12,90	0,50	7	22,58	0,94	3	9,68	0,41	5	16,13	0,66	31	100,00	0,67
SD	14	22,95	1,75	12	19,67	1,52	13	21,31	1,64	10	16,39	1,35	7	11,48	0,95	5	8,20	0,66	61	100,00	1,32
TOTAL	55	20,60	6,90	43	16,10	5,45	45	16,85	5,65	46	17,23	6,20	38	14,23	5,17	40	14,98	5,31	267	100,0	5,79
NV (NM)	7909	(73)		7825	(63)		7886	(54)		7339	(70)		7277	(83)		7456	(82)		45692	(425)	

T Fallot: Tetralogía de Fallot. TGA: Transposición grandes arterias. DSCT: Defectos septales conotruncales. AP: Atresia pulmonar. TAC: Tronco arterioso común. DSVD: Doble salida del ventrículo derecho. EB: espina bífida. DTN: Defectos del tubo neural. LL: Labio leporino o fisurado. PH: Paladar hendido. HLP: Hendiduras labiopalatinas. SD: Síndrome Down.

NV: Nacidos vivos. NM: Nacidos muertos. Fuente: Base de datos de la investigación.

# ANEXO 4.



Figura 1. Curvas de tendencia de las tasas de prevalencia de los diferentes defectos congénitos según destino del producto por años. Villa Clara 2013-2018.

Fuente: Tabla Anexo 1.

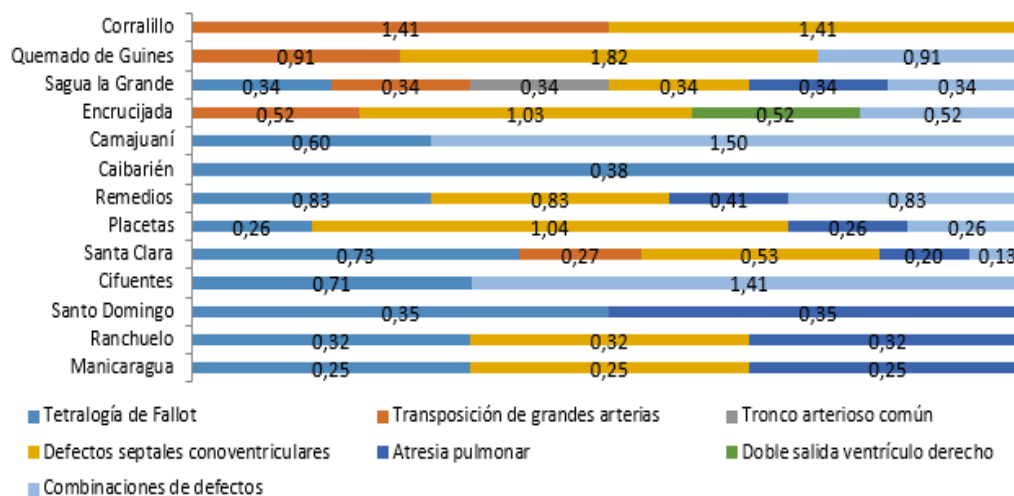
**ANEXO 5.** Frecuencia y prevalencia ajustada de los diferentes tipos de DC según municipio y condición al nacer. Villa Clara 2013-2018.

Municipios	Estadísticas vitales			CCCT				DTN				HLP				GS				SD				Total DC						
	NV	NM	NV+NM	NV	NM	IEE	total	PA	NV	NM	IEE	total	PA	NV	NM	IEE	total	PA	NV	NM	IEE	total	PA	NV	NM	IEE	total	PA	Total	PA
Corralillo	1408	7	1415	3	0	1	4	2,83	0	0	2	2	1,41	3	0	0	3	2,12	0	0	2	2	1,41	1	0	1	2	1,41	13	9,19
Qdo Güines	1091	8	1099	2	1	1	4	3,64	0	0	1	1	0,91	3	0	0	3	2,73	0	0	0	0	0,00	1	0	0	1	0,91	10	9,10
Sagua la G	2940	14	2954	3	0	3	6	2,03	0	0	7	7	2,37	2	0	0	2	0,68	0	0	1	1	0,34	2	0	1	3	1,02	19	6,43
Encrucijada	1915	22	1937	2	0	3	5	2,58	2	0	1	3	1,55	1	0	1	2	1,03	0	0	1	1	0,52	3	0	1	4	2,07	15	7,74
Camajuaní	3308	31	3339	2	0	5	7	2,10	2	0	0	2	0,60	1	0	0	1	0,30	0	0	0	0	0,00	3	0	3	6	1,80	15	4,49
Caibarién	2603	15	2618	1	0	2	3	1,15	0	0	0	0	0,00	2	0	0	2	0,76	0	0	3	3	1,15	1	0	1	2	0,76	10	3,82
Remedios	2400	21	2421	3	0	2	5	2,07	1	0	4	5	2,07	1	0	0	1	0,41	0	0	2	2	0,83	1	0	1	2	0,83	15	6,20
Placetas	3821	33	3854	5	0	2	7	1,82	1	0	9	10	2,59	4	0	0	4	1,04	0	0	2	2	0,52	4	0	4	8	2,08	31	8,04
Sta Clara	14904	170	15074	10	2	16	28	1,86	2	0	9	11	0,73	6	0	1	7	0,46	0	0	7	7	0,46	10	0	11	21	1,39	74	4,91
Cifuentes	1401	13	1414	3	0	0	3	2,12	0	0	2	2	1,41	2	0	0	2	1,41	1	0	0	1	0,71	0	0	1	1	0,71	9	6,36
Sto Dgo	2799	20	2819	1	0	1	2	0,71	0	1	4	5	1,77	1	0	1	2	0,71	0	0	2	2	0,71	1	0	2	3	1,06	14	4,97
Ranchuelo	3060	32	3092	2	0	1	3	0,97	0	0	5	5	1,62	1	0	1	2	0,65	0	0	3	3	0,97	0	0	0	0	0,00	13	4,20
Manicaragua	4042	39	4081	0	0	3	3	0,74	2	0	4	6	1,47	3	0	2	5	1,23	0	1	6	7	1,72	2	0	6	8	1,96	29	7,11
<b>Total</b>	<b>45692</b>	<b>425</b>	<b>46117</b>	<b>37</b>	<b>3</b>	<b>40</b>	<b>80</b>	<b>1,73</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>48</b>	<b>59</b>	<b>1,28</b>	<b>30</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>36</b>	<b>0,78</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>29</b>	<b>31</b>	<b>0,67</b>	<b>29</b>	<b>0</b>	<b>32</b>	<b>61</b>	<b>1,32</b>	<b>267</b>	<b>5,79</b>

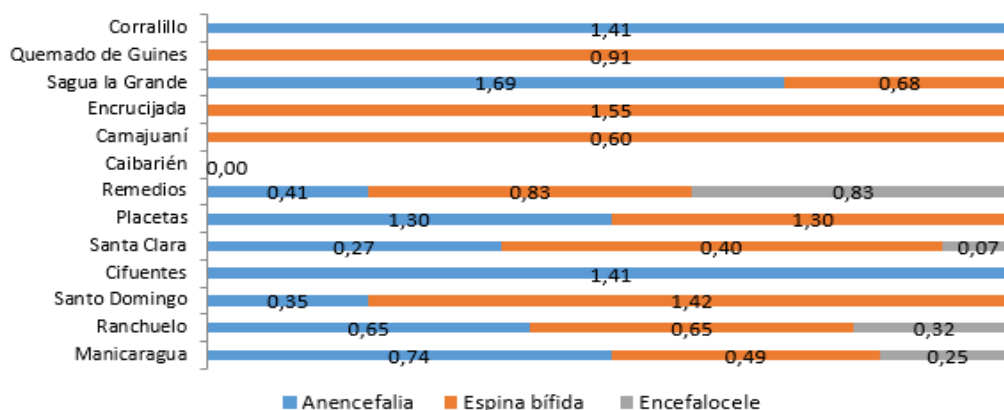
Qdo Güines: Quemado de Güines. Sagua la G: Sagua la Grande. Sta Clara: Santa Clara. Sto Dgo: Santo Domingo. NV: nacidos vivos. NM: nacidos muertos. IEE: Interrupción electiva del embarazo. PA: prevalencia ajustada x 1000 nacimientos. Fuente: Base de datos de la investigación.

## ANEXO 6.

Tasas de prevalencia ajustada de los diferentes fenotipos de CCCT por municipios.



Tasas de prevalencia ajustada de los diferentes fenotipos de DTN por municipios



Tasas de prevalencia ajustada de los diferentes fenotipos de HLP por municipios

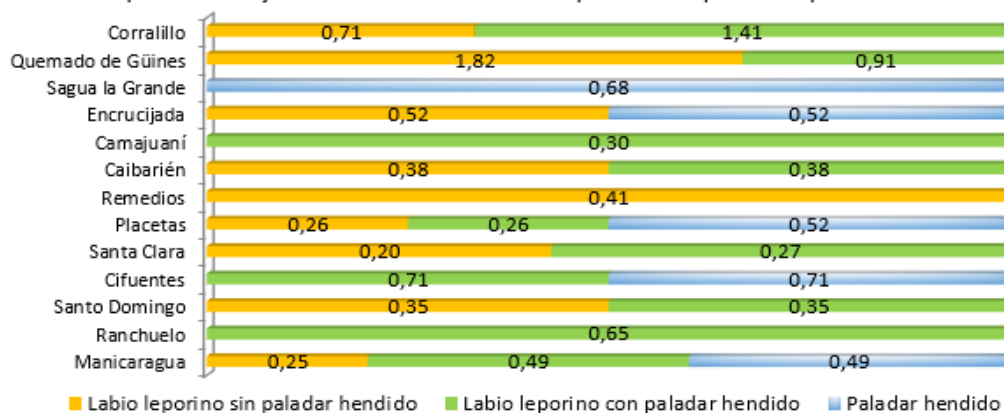


Figura 2. Tasas de prevalencia ajustada de los diferentes fenotipos de DC por municipios. Villa Clara 2013- 2018.

Fuente: Base de datos de la investigación.

**ANEXO 7.** Análisis para la identificación de conglomerados espacio-temporales de defectos congénitos. Villa Clara 2013-2018.

Clúster	Municipios	Años	Casos observ	Casos esper	RR	Valor de p
<b>CLUSTERS ESPACIALES PARA CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS</b>						
Primario	Corralillo- Qdo Güines	-	8	0,44	2,16	0,426
Secundario	Encrucijada-Cifuentes.	-	8	0,58	1,34	0,997
Secundario	Remedios.	-	5	0,26	1,44	0,999
<b>CLUSTERS ESPACIO-TEMPORALES PARA CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS</b>						
Primario	Quemado de Güines.	2016-2018	4	0,13	5,50	0,272
Secundario	Camajuaní-Encrucijada-Caibarién.	2015-2016	14	2,06	2,59	0,582
Secundario	Corralillo.	2014	3	0,10	7,09	0,637
	Placetas-Remedios-Sta Clara.	2013-2014	19	8,66	1,64	0,991
<b>CLUSTERS ESPACIALES PARA GASTROSQUISIS</b>						
Primario	Manicaragua.	-	7	0,62	3,00	0,234
Secundario	Corralillo.	-	2	0,06	2,17	0,984
Secundario	Caibarién.	-	3	0,17	1,78	0,995
<b>CLUSTERS ESPACIO-TEMPORALES PARA GASTROSQUISIS</b>						
Primario	Corralillo.	2016-2018	2	0,06	6,93	0,961
Secundario	Manicaragua.	2016-2018	4	0,34	3,42	0,982
Secundario	Sto Domingo.	2013	2	0,12	6,28	0,982
Secundario	Ranchuelo.	2013	2	0,13	5,98	0,985
<b>CLUSTERS ESPACIALES PARA HENDIDURAS LABIOPALATINAS</b>						
Primario	Corralillo- Qdo Güines.	-	6	0,33	1,53	0,171
Secundario	Encrucijada-Cifuentes.	-	4	0,29	2,13	0,836
Secundario	Manicaragua.	-	5	0,44	1,71	0,972
Secundario	Placetas.	-	4	0,34	1,41	0,999
<b>CLUSTERS ESPACIO-TEMPORALES PARA HENDIDURAS LABIOPALATINAS</b>						
Primario	Corralillo- Qdo Güines.	2017	5	0,31	18,93	0,004
Secundario	Encrucijada-Cifuentes.	2014-2016	4	1,28	3,41	0,965
<b>CLUSTERS ESPACIALES PARA SÍNDROME DOWN</b>						
Primario	Manicaragua-Sta Clara- Placetas.	-	37	18,46	1,53	0,690
Secundario	Camajuaní-Encrucijada.	-	8	0,92	1,46	0,960
<b>CLUSTERS ESPACIO-TEMPORALES PARA SÍNDROME DOWN</b>						
Primario	Manicaragua-Sta Clara- Placetas.	2013-2015	25	11,67	1,91	0,724
<b>CLUSTERS ESPACIALES PARA DEFECTOS DEL TUBO NEURAL</b>						
Primario	Placetas.	-	10	0,75	2,33	0,275
Secundario	Corralillo- Qdo Güines- Sto Dgo- Sagua la Grande- Cifuentes- Ranchuelo.	-	22	5,23	1,76	0,360
<b>CLUSTERS ESPACIO-TEMPORALES PARA DEFECTOS DEL TUBO NEURAL</b>						
Primario	Qdo Güines- Sto Dgo- Sagua la Grande.	2018	7	1,06	6,47	0,013
Secundario	Placetas- Remedios	2013	6	0,84	4,78	0,268
Secundario	Cifuentes.	2017	2	0,06	7,87	0,921

Casos Observ: casos observados. Casos esper: casos esperados. Qdo Güines: Quemado de Güines. Sagua la G: Sagua la Grande. Sta Clara: Santa Clara. Sto Dgo: Santo Domingo. Fuente: Base de datos de la investigación.

**ANEXO 8.** Factores de riesgo maternos que se asociaron al grupo de defectos congénitos en el conjunto de madres de casos incidentes y prevalentes y en las de casos incidentes. Villa Clara 2013-2018.

Factores de riesgo significativamente asociados	Casos incidentes y prevalentes vs controles (n=212)	Casos incidentes vs controles (n=106)
Medicamentos no habituales	X	X
Enfermedades crónicas	X	X
Periodo intergenésico corto	X	X
No consumo preconcepcional de AF	X	X
Avanzada edad materna	X	X
Consumo insuficiente de folatos	X	X
Niveles elevados de AFP	X	X
Sobrepeso y obesidad materna	X	X
Antecedentes de abortos espontáneos	X	X
Madre adolescente	X	X
Consumo de tabletas anticonceptivas	X	X
Consumo de antagonistas de ácido fólico	X	X
Antecedentes familiares de DC	X	p= 0,119
Bajo peso materno	X	X
Fumadora en el embarazo	X	X
Antecedentes DC en familiares de I Grado	X	p= 0,175
Antecedentes familiares DC por vía paterna	X	p= 0,052

Fuente: Base de datos de la investigación.

**ANEXO 9.** Análisis multivariado de variables epidemiológicas en el conjunto de defectos congénitos folato-sensibles. Villa Clara 2013- 2018.

**Tabla de clasificación<sup>a</sup>**

Observado	Pronosticado				
	Estatus Casos Control		Corrección de		
	Casos	Control	porcentaje		
Paso 10	Estatus Casos Control	Casos	191	21	90,1
		Control	29	77	72,6
Porcentaje global					84,3

a. El valor de corte es ,500

**Variables en la ecuación**

Paso 10	B	Error				Sig.	Exp(B)	95% C.I. para EXP(B)	
		estándar	Wald	gl				Inferior	Superior
APP enfermedades crónicas	1,449	,403	12,916	1	,000	4,260	1,933	9,390	
Periodo IG corto	1,939	,377	26,405	1	,000	6,953	3,319	14,569	
Consumo tabletas AC	1,474	,460	10,265	1	,001	4,365	1,772	10,752	
AFP elevada	2,836	,845	11,252	1	,001	17,044	3,251	89,367	
Polihidramnios	2,685	1,364	3,878	1	,049	14,659	1,013	212,222	
Sobre peso u obesidad	1,662	,543	9,375	1	,002	5,271	1,819	15,274	
Consumo deficiente de folatos	1,476	,383	14,876	1	,000	4,374	2,066	9,258	
Avanzada edad materna	4,727	1,134	17,389	1	,000	112,997	12,249	1042,418	
Madre adolescente	1,859	,480	15,017	1	,000	6,417	2,506	16,431	
No consumo precon. de AF	,981	,377	6,782	1	,009	2,668	1,275	5,583	
Constante	-38,94	5,406	51,915	1	,000	,000			

- a. Variables especificadas en el paso 1: Antecedentes patológicos personales (APP) de enfermedades crónicas.
- b. Variables especificadas en el paso 2: Periodo Intergenésico (IG) corto, consumo tabletas anticonceptivas (AC).
- c. Variables especificadas en el paso 3: Alfafeto proteína (AFP) elevada, Avanzada edad materna.
- d. Variables especificadas en el paso 4: Madre adolescente.
- e. Variables especificadas en el paso 5: Alfafeto Proteína (AFP) elevada.
- f. Variables especificadas en el paso 6: Consumo deficiente de folatos.
- g. Variables especificadas en el paso 7: Consumo de tabletas anticonceptivas (AC).
- h. Variables especificadas en el paso 8: Sobre peso u obesidad.
- i. Variables especificadas en el paso 9: No consumo preconcepcional (precon.) de ácido fólico (AF).
- j. Variables especificadas en el paso 10: Polihidramnios.

## ANEXOS CAPÍTULO 3

### ANEXO 1.

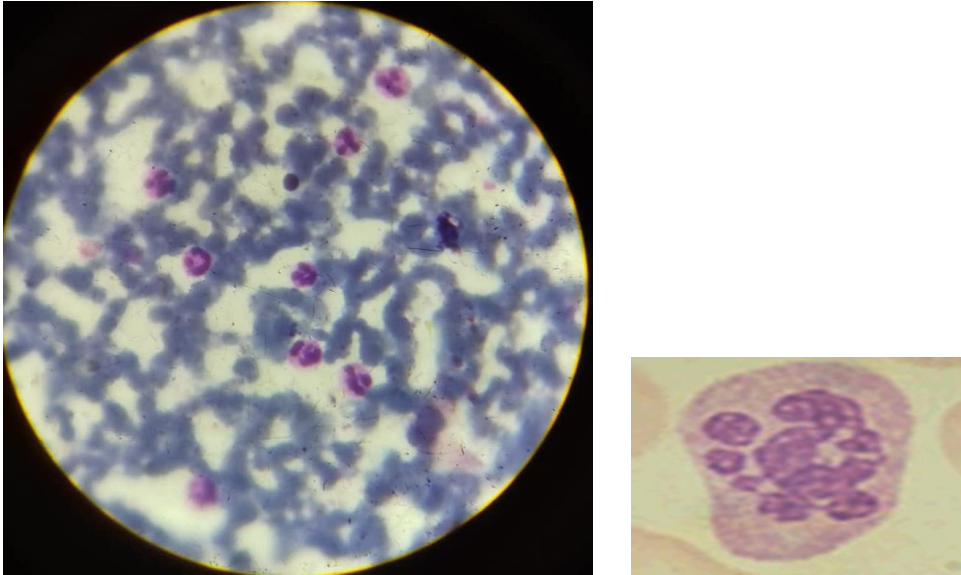


Figura 1. Imagen que muestra la hipersegmentación neutrofílica identificada mediante microscopía óptica.



**ANEXO 2.** Presencia de hipersegmentación neutrofílica y consumo deficiente de folatos en las madres de casos prevalentes. Villa Clara 2013-2018.

			<u>Año de gestación o nacimiento de casos prevalentes</u>				X <sup>2</sup>
			2013	2014	2015	Total	Sig
Presencia o no de hipersegmentación neutrofílica	Si	N	0	2	2	4	2,241
		%	0,0%	50,0%	50,0%	100,0%	0,326
	No	N	37	31	34	102	
		%	36,3%	30,4%	33,3%	100,0%	
			<u>Consumo deficiente de folato en el momento de la extracción</u>				
			Si	No			
Presencia o no de hipersegmentación neutrofílica	Si		3 (3,90%)	1 (3,40)			0,012
	No		74(96,10%)	28(96,6%)			0,914
			<u>Consumo deficiente de folato referido por las madres</u>				
			En el embarazo		Al momento de extracción		
	Si		73	77			0,550
	Total		106	106			

Fuente: Base de datos de la investigación.

**ANEXO 3.** Grupo de segmentación neutrofílica por tipo de defecto congénito folato-sensibles en el grupo de madres de casos y controles. Villa Clara 2013-2018.

Grupo de segmentación en CCCT	Casos (Casos incidentes + prevalentes) n=58		Controles n=106		X2		OR		V de Cramer
	No.	%	No.	%	Valor	Sig.	Valor	IC 95%	Valor
Grupo I (Segmentación normal)	52	89,66	100	94,34	3,71	0,16			0,15
Grupo II (Hipersegmentación neutrofílica)	4	6,90	6	5,66					
Grupo III (Hipersegmentación con al menos un neutrófilo con 6 núcleos)	2	3,45	0	0,00					
Presencia de hipersegmentación neutrofílica	6	10,34	6	5,66	0,38	0,54	1,41	0,47 – 4,29	0,48

Grupo de segmentación en DTN	Casos (Casos incidentes + prevalentes) n=46		X2		OR		V de Cramer
	No.	%	Valor	Sig.	Valor	IC 95%	Valor
Grupo I (Segmentación normal)	40	87,00	4,77	0,09			0,18
Grupo II (Hipersegmentación neutrofílica)	4	8,70					
Grupo III (Hipersegmentación con al menos un neutrófilo con 6 núcleos)	2	4,30					
Presencia de hipersegmentación neutrofílica	6	13,04	1,16	0,28	1,84	0,60 – 5,64	0,09

Grupo de segmentación en HLP	Casos (Casos incidentes + prevalentes) n=34		X2		OR		V de Cramer
	No.	%	Valor	Sig.	Valor	IC 95%	Valor
Grupo I (Segmentación normal)	30	88,24	0,59	0,45			0,07
Grupo II (Hipersegmentación neutrofílica)	4	11,76					
Grupo III (Hipersegmentación con al menos un neutrófilo con 6 núcleos)	0	0,00					
Presencia de hipersegmentación neutrofílica	4	11,76	0,59	0,45	1,63	0,46 – 5,84	0,07

Grupo de segmentación en SD	Casos (Casos incidentes + prevalentes) n=44		X2		OR		V de Cramer
	No.	%	Valor	Sig.	Valor	IC 95%	Valor
Grupo I (Segmentación normal)	41	93,18	2,49	0,29			0,13
Grupo II (Hipersegmentación neutrofílica)	2	4,55					
Grupo III (Hipersegmentación con al menos un neutrófilo con 6 núcleos)	1	2,27					
Presencia de hipersegmentación neutrofílica	3	6,82	0,07	0,78	1,22	0,29 – 5,11	0,02

CCCT: cardiopatías congénitas conotruncuales, DTN: defectos del tubo neural, HLP: hendiduras labiopalatinas, GS: gastrosquisis, SD: síndrome Down. Fuente: Base de datos de la investigación.

**ANEXO 4.** Grupo de segmentación neutrofílica por tipo de defecto congénito folato-sensible en las madres de casos incidentes y prevalentes por separado respecto a los controles. Villa Clara 2013-2018.

Grupo de segmentación en CCCT	Casos incidentes n=29		Casos prevalentes n=29		Controles n=106		X <sup>2</sup>	
	No.	%	No.	%	No.	%	Valor	Sig.
Grupo I	24	82,76	28	96,55	100	94,34	8,660	0,070
Grupo II	4	13,79	0	0,00	6	5,66		
Grupo III	1	3,45	1	3,45	0	0,00		
Presencia de hipersegmentación neutrofílica	5	17,24	1	3,44	6	5,66	5,281	0,071

Grupo de segmentación en DTN	Casos incidentes n=23		Casos prevalentes n=23		Controles n=106		X <sup>2</sup>	
	No.	%	No.	%	No.	%	Valor	Sig.
Grupo I	18	78,26	22	95,65	100	94,34	13,56	0,009
Grupo II	3	13,04	1	4,35	6	5,66		
Grupo III	2	8,70	0	0,00	0	0,00		
Presencia de hipersegmentación neutrofílica	5	21,74	1	4,35	6	5,66	7,188	0,027

Grupo de segmentación en HLP	Casos incidentes n=17		Casos prevalentes n=17		Controles n=106		X <sup>2</sup>	
	No.	%	No.	%	No.	%	Valor	Sig.
Grupo I	14	82,35	16	94,12	100	94,34	3,220	0,200
Grupo II	3	17,65	1	5,88	6	5,66		
Grupo III	0	0,00	0	0,00	0	0,00		
Presencia de hipersegmentación neutrofílica	3	17,65	1	5,88	6	5,66	3,220	0,200

Grupo de segmentación en GS	Casos incidentes n=15		Casos prevalentes n=15		Controles n=106		X <sup>2</sup>	
	No.	%	No.	%	No.	%	Valor	Sig.
Grupo I	15	100,00	15	100,00	100	94,34	1,776	0,411
Grupo II	0	0,00	0	0,00	6	5,66		
Grupo III	0	0,00	0	0,00	0	0,00		
Presencia de hipersegmentación neutrofílica	0	0,00	0	0,00	6	5,66	1,776	0,411

Grupo de segmentación en SD	Casos incidentes n=22		Casos prevalentes n=22		Controles n=106		X <sup>2</sup>	
	No.	%	No.	%	No.	%	Valor	Sig.
Grupo I	20	90,91	21	95,45	100	94,34	5,919	0,205
Grupo II	1	4,55	1	4,55	6	5,66		
Grupo III	1	4,55	0	0,00	0	0,00		
Presencia de hipersegmentación neutrofílica	2	9,09	1	4,55	6	5,66	0,477	0,788

CCCT: cardiopatías congénitas conotruncales, DTN: defectos del tubo neural, HLP: hendiduras labiopalatinas, GS: gastroquiasis, SD: síndrome Down. Fuente: Base de datos de la investigación.

**ANEXO 5.** Hipersegmentación neutrofílica en las madres de casos con defectos congénitos folato-sensibles. Villa Clara 2013-2018.

Hipersegmentación	<u>Casos incidentes</u> (n=29)		<u>Casos prevalentes</u> (n=29)		Prueba de diferencia de proporciones  Sig.
	N	%	N	%	
CCCT	5	17,24	1	3,45	0,108
	<u>Casos incidentes</u>		<u>Controles (n=106)</u>		
	N	%	N	%	
	5	17,24	6	5,66	0,057
	<u>Casos prevalentes</u>		<u>Controles (n=106)</u>		
	N	%	N	%	
DTN	1	3,45	6	5,66	0,702
	<u>Casos incidentes</u> (n=23)		<u>Casos prevalentes</u> (n=23)		
	N	%	N	%	.
	5	21,74	1	4,35	0,104
	<u>Casos incidentes</u>		<u>Controles (n=106)</u>		
	N	%	N	%	
HLP	5	21,74	6	5,66	0,025
	<u>Casos prevalentes</u>		<u>Controles (n=106)</u>		
	N	%	N	%	
	1	4,35	6	5,66	0,965
	<u>Casos incidentes</u> (n=17)		<u>Casos prevalentes</u> (n=17)		
	N	%	N	%	
SD	3	17,65	1	5,88	0,351
	<u>Casos incidentes</u>		<u>Controles (n=106)</u>		
	N	%	N	%	
	3	17,65	6	5,66	0,109
	<u>Casos prevalentes</u>		<u>Controles (n=106)</u>		
	N	%	N	%	
SD	1	5,88	6	5,66	0,972
	<u>Casos incidentes</u> (n=22)		<u>Casos prevalentes</u> (n=22)		
	N	%	N	%	
	2	9,09	1	4,55	0,616
	<u>Casos incidentes</u>		<u>Controles (n=106)</u>		
	N	%	N	%	
SD	2	9,09	6	5,66	0,624
	<u>Casos prevalentes</u>		<u>Controles (n=106)</u>		
	N	%	N	%	
	1	4,55	6	5,66	0,987

CCCT: Cardiopatías congénitas conotruncales. DTN: Defectos del tubo neural. HLP: Hendiduras labiopalatinas. GS: Gastrosquisis. SD: Síndrome Down. Fuente: Base de datos de la investigación.

**ANEXO 6.** Concentraciones de oligoelementos en las madres de los casos incidentes, prevalentes y controles. Villa Clara 2013-2018.

Niveles de oligoelementos	Casos incidentes	Casos prevalentes	U de Mann Whitney	
			Valor	Sig.
Cinc	9,91	11,79	2592,50	0,000
Cobre	20,56	15,84	3566,00	0,000
Calcio	2,16	2,25	4334,00	0,119
Magnesio	0,74	0,79	4125,00	0,001
Hierro	10,11	12,30	30,33	0,000
	Casos incidentes	Controles		
Cinc	9,91	11,95	2328,00	0,000
Cobre	20,56	15,52	3390,00	0,000
Calcio	2,16	2,23	4587,00	0,172
Magnesio	0,74	0,80	3893,00	0,000
Hierro	10,11	10,89	2901,00	0,000
	Casos prevalentes	Controles		
Cinc	11,79	11,95	5160,50	0,305
Cobre	15,84	15,52	5465,50	0,733
Calcio	2,25	2,23	5359,50	0,562
Magnesio	0,79	0,80	5427,00	0,668
Hierro	12,30	10,89	5440,00	0,690

Valores de Referencia: Cinc: 7,7-23  $\mu\text{mol/L}$ ; Cobre: 11,0-24  $\mu\text{mol/L}$ ; Calcio: 2,02-2,60  $\mu\text{mol/L}$ ; Magnesio: 1,90-2,60  $\mu\text{mol/L}$ ; Hierro: 4,0-30,0  $\mu\text{mol/L}$ . Fuente: Base de datos de la investigación.

**ANEXO 7.** Niveles séricos de oligoelementos en las madres de los casos prevalentes según año de diagnóstico. Villa Clara 2013-2018.

Oligo- elementos	Año 2013		Año 2014		Año 2015		X <sup>2</sup> Kruskal Wallis	
	Mediana	95% IC	Mediana	95% IC	Mediana	95% IC	Valor	Sig.
Zn	11,98	11,59-12,51	11,12	10,41-11,79	11,79	10,82-12,16	4,40	0,111
Cu	18,19	16,26-19,40	15,58	15,24-18,17	14,69	14,73-17,84	2,66	0,264
Ca	2,24	2,15-2,34	2,37	2,19-2,42	2,22	2,24-2,53	0,99	0,631
Mg	0,79	0,75-0,86	0,80	0,79-0,85	0,74	0,75-0,80	5,00	0,082
Fe	11,04	11,06-13,34	10,21	10,11-12,86	10,89	10,25-12,67	1,38	0,503

Zn: cinc, Cu: cobre, Ca: calcio, Mg: magnesio, Fe: hierro. Fuente: Base de datos de la investigación.

**ANEXO 8.** Niveles séricos maternos de los cinco oligoelementos en los diferentes tipos de defectos congénitos folato-sensibles en las madres de casos y controles. Villa Clara 2013-2018.

Oligo- elementos	Casos con CC conotruncales		Controles		U de Mann Whitney p
	Mediana	95% IC	Mediana	95% IC	
Cinc	9,93	3,89 – 13,89	11,95	6,53 – 14,49	0,000
Cobre	18,33	11,17 – 36,20	15,52	6,53 – 35,83	0,027
Calcio	2,22	1,80 – 3,56	2,23	1,28 – 3,56	0,877
Magnesio	0,77	0,54 – 0,99	0,78	0,59 – 1,07	0,123
Hierro	8,77	3,51 – 22,10	11,04	6,82 – 22,66	0,000
<b>Casos con DTN</b>					
Cinc	11,29	5,41 – 14,49			0,008
Cobre	20,29	11,06 – 33,48			0,000
Calcio	2,18	1,28 – 2,77			0,088
Magnesio	0,76	0,52 – 1,66			0,286
Hierro	9,67	2,94 – 22,10			0,001
<b>Casos con HLP</b>					
Cinc	10,26	2,62 – 13,52			0,000
Cobre	16,03	10,97 – 30,12			0,672
Calcio	2,19	1,34 – 3,46			0,797
Magnesio	0,70	0,38 – 0,93			0,000
Hierro	9,52	3,73 – 18,76			0,032
<b>Casos con GS</b>					
Cinc	11,24	11,12 – 12,19			0,306
Cobre	18,65	16,27 – 19,34			0,113
Calcio	2,18	1,80 – 3,56			0,212
Magnesio	0,77	0,63 – 0,97			0,155
Hierro	10,50	5,76 – 18,98			0,271
<b>Casos con SD</b>					
Cinc	11,48	10,80 – 11,91			0,130
Cobre	16,22	16,71 – 20,45			0,114
Calcio	2,19	2,19 – 2,43			0,675
Magnesio	0,79	-1,06 – 6,16			0,719
Hierro	10,89	9,92 – 12,28			0,230

CCCT: Cardiopatías congénitas conotruncales. DTN: Defectos del tubo neural. HLP: Hendiduras labiopalatinas. GS: Gastrosquisis. SD: Síndrome Down. Fuente: Base de datos de la investigación.

**ANEXO 9.** Niveles séricos maternos bajos o elevados de oligoelementos como factores de riesgo para los diferentes de defectos congénitos folato-sensibles en la descendencia. Villa Clara 2013-2018.

	Casos		Controles (n=106)		X <sup>2</sup> de Pearson (*TE Fisher)		OR	
	No.	%	No.	%	Valor	p	Valor	95% IC
<b>CCCT (n=58)</b>								
Niveles bajos de Zn	17	29,31	6	5,66	17,39	0,000	6,91	2,54- 18,77
Niveles elevados de Cu	13	22,41	8	7,55	7,42	0,006	3,54	1,37- 9,14
Niveles bajos de Ca	4	6,89	5	4,71		0,722		
Niveles bajos de Mg	8	13,79	6	5,66	3,18	0,075		
Niveles bajos de Fe	4	6,89	0	0,00		0,015		
Deficiencia múltiple de oligoelementos	11	18,97	2	3,45		0,001	12,17	2,60- 57,08
<b>DTN (n=46)</b>								
	No.	%			X <sup>2</sup>	p	OR	95% IC
Niveles bajos de Zn	13	28,26			14,98	0,000	6,57	2,31- 18,67
Niveles elevados de Cu	14	30,43			13,58	0,000	5,36	2,06- 13,94
Niveles bajos de Ca	6	13,04			3,31	0,069		
Niveles bajos de Mg	9	19,57			6,97	0,008	4,05	1,35- 12,18
Niveles bajos de Fe	5	10,87				0,002		
Deficiencia múltiple de oligoelementos	9	15,52			14,93	0,000	12,65	2,61- 61,25
<b>HLP (n=34)</b>								
Niveles bajos de Zn	7	20,59			6,81	0,009	4,32	1,34- 13,93
Niveles elevados de Cu	5	14,71			1,57	0,211		
Niveles bajos de Ca	5	14,71			3,87	0,049		
Niveles bajos de Mg	13	38,24			23,29	0,000	10,32	3,52- 30,25
Niveles bajos de Fe	2	5,88				0,058		
Deficiencia múltiple de oligoelementos	6	17,65				0,03	11,14	2,13- 58,24
<b>GS (n=30)</b>								
Niveles bajos de Zn	0	0,00			6,81			
Niveles elevados de Cu	1	3,33			1,57	0,683		
Niveles bajos de Ca	3	10,00			3,87	0,374		
Niveles bajos de Mg	4	1,76			23,29	0,227		
Niveles bajos de Fe	0	0,00						
Deficiencia múltiple de oligoelementos	1	3,33				0,530		
<b>SD (n=44)</b>								
Niveles bajos de Zn	5	11,36				0,023	6,68	1,24- 35,79
Niveles elevados de Cu	6	13,60			1,36	0,243		
Niveles bajos de Ca	3	6,82				0,722		
Niveles bajos de Mg	7	15,91			4,13	0,056		
Niveles bajos de Fe	2	4,55				0,085		
Deficiencia múltiple de oligoelementos	5	11,36				0,023	6,68	1,24- 35,79

ICCCT: Cardiopatías congénitas conotruncuales. DTN: Defectos del tubo neural. HLP: Hendiduras abiotónicas. GS: Gastosquisis. SD: Síndrome Down. Fuente: Base de datos de la investigación.



**ANEXO 10.** Análisis multivariado de variables epidemiológicas, hipersegmentación neutrofílica y concentraciones de oligoelementos en las madres de casos y controles. Villa Clara 2013-2018.

**Tabla de clasificación<sup>a</sup>**

Observado			Pronosticado		
			Estatus Casos Control		Corrección de porcentaje
			Casos	Control	
Paso 15	Estatus Casos Control	Casos	189	23	89,2
		Controles	22	84	79,2
Porcentaje global					85,8

a. El valor de corte es ,500

**Variables en la ecuación**

Paso 15	B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95% C.I. para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Antecedentes enfermedades crónicas	1,239	,425	8,490	1	,004	3,307	1,378	7,936
Periodo intergenésico corto	2,003	,398	25,324	1	,000	2,900	,669	12,571
Consumo tabletas anticonceptivas	1,491	,484	9,493	1	,002	6,381	2,762	14,744
AFP elevada	3,098	,862	12,904	1	,000	3,876	,692	21,699
Polihidramnios	2,934	1,387	4,472	1	,034	4,122	1,529	11,110
Sobre peso u obesidad	1,872	,570	10,795	1	,001	20,131	3,290	123,192
Consumo deficiente de folatos	1,289	,402	10,279	1	,001	20,006	1,132	353,454
Antagonistas de AF	1,716	,846	4,114	1	,043	1,416	,240	8,344
Avanzada edad materna	4,756	1,144	17,282	1	,000	6,586	1,988	21,812
Madre adolescente	1,793	,505	12,609	1	,000	3,018	1,319	6,905
No consumo preconcepcional de AF	,949	,390	5,913	1	,015	6,357	1,124	35,964
Hipercupremia	1,218	,582	4,375	1	,036	1,107	,181	6,773
Deficiencia múltiple de Micronutrientes	2,177	,833	6,834	1	,009	2,200	,478	10,121
Constante	-49,577	6,550	57,297	1	,000	79,425	7,676	821,820

**ANEXO 11.** Comparación de los niveles maternos de homocisteína en las madres de los casos incidentes, prevalentes y controles. Villa Clara 2013-2018.

Grupos	Mediana	Mediana en grupos a comparar	U de Mann Whitney	
			Valor	Sig.
Casos incidentes	11,74	Controles 5,34	209,50	0,000
Casos prevalentes	7,77		385,50	0,009
Casos incidentes	11,74	Casos prevalentes 7,77	195,00	0,023

Fuente: Base de datos de la investigación.

**ANEXO 12.** Análisis multivariado de variables epidemiológicas, hipersegmentación neutrofílica, concentraciones de oligoelementos y niveles de homocisteína en las madres de los casos y de controles. Villa Clara 2013-2018.

<b>Tabla de clasificación<sup>a</sup></b>					
Observado		Pronosticado			
		Estatus Casos Control		Corrección de	
		Casos	Control	porcentaje	
Paso 13	Estatus Casos Control	Casos	47	3	94,0
		Controles	6	44	88,0
Porcentaje global					91,0

a. El valor de corte es ,500

<b>Variables en la ecuación</b>							95% C.I. para	
Paso 13	B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	EXP(B)	
							Inferior	Superior
Periodo intergenésico corto	3,368	,966	12,145	1	,000	3,307	1,378	7,936
Abortos espontáneos	2,744	1,316	4,348	1	,037	2,900	,669	12,571
AFP elevada	24,258	11795,643	,000	1	,998	6,381	2,762	14,744
Polihidramnios	23,284	25984,190	,000	1	,999	3,876	,692	21,699
Consumo deficiente de folatos	2,419	,781	9,585	1	,002	4,122	1,529	11,110
Avanzada edad materna	5,139	1,525	11,348	1	,001	20,131	3,290	123,192
Madre adolescente	4,152	1,340	9,596	1	,002	20,006	1,132	353,454
Hipocincemia	3,387	1,174	8,325	1	,004	1,416	,240	8,344
Umbral de riesgo para la Hcis	3,345	1,135	8,682	1	,003	6,586	1,988	21,812
Constante	-138,853	57072,423	,000	1	,998	3,018	1,319	6,905

a. Variables especificadas en el paso 1: Consumo\_deficiente\_Folatos.

b. Variables especificadas en el paso 2: Consumo\_tabletas\_AC.

c. Variables especificadas en el paso 3: Avanzada\_edad\_materna.

d. Variables especificadas en el paso 4: AFP\_elevada.

e. Variables especificadas en el paso 5: Umbral\_de\_Riesgo.

f. Variables especificadas en el paso 6: Periodo\_IG\_Corto.

g. Variables especificadas en el paso 7: Antagonistas\_AF\_dicot.

h. Variables especificadas en el paso 8: Adolescente.

i. Variables especificadas en el paso 9: Polihidramnios.

j. Variables especificadas en el paso 10: Hipocincemia.

k. Variables especificadas en el paso 13: Aborto\_espontáneos.

## ANEXOS CAPÍTULO 4

### ANEXO 1.

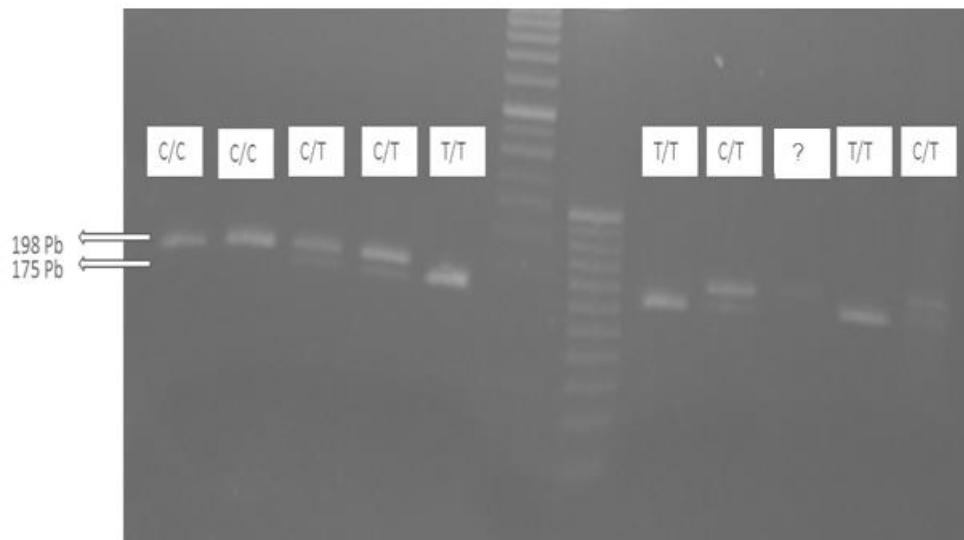


Figura 1. Imagen que muestra la corrida electroforética de 10 muestras genotipadas para el polimorfismo C677T del gen MTHFR.

Se observan los fragmentos del producto amplificado de 198 pb y 175 pb correspondientes a los diferentes genotipos, corriendo simultáneamente con el marcador de peso molecular de 25 pb. En los recuadros se especifican los genotipos correspondientes.

**ANEXO 2.** Análisis del equilibrio génico de Hardy Weinberg para el polimorfismo C677T en el grupo de controles procedentes del presente estudio y del procedente del estudio de Holguín.

Muestra presente estudio Genotipo	Frecuencia genotípica observada		Frecuencia genotípica esperada		X <sup>2</sup>	
	N	%	N	%	Valor	p
CC	19	44,19	20	46,51	0,77	0,723
CT	21	48,84	19	44,19		
TT	3	6,98	4	9,30		
Total	43	100,00	43	100,00		
Muestra del estudio procedente de Holguín						
CC	56	43,08	61	46,92	2,64	0,296
CT	66	50,77	56	43,08		
TT	8	6,15	13	10,00		
Total	130	100,00	130	100,00		

Fuente: Base de datos de la investigación.

**ANEXO 3.** Comparación de las frecuencias genotípicas en los grupos de madres de casos y de los controles. Villa Clara 2013 – 2018.

### CONTROLES DEL PRESENTE ESTUDIO VS CONTROLES DE LA PROVINCIA HOLGUÍN

Genotipo	Controles		Controles Holguín		p
	N	%	N	%	
CC	19	44,19	56	43,08	1,000
CT	21	48,84	66	50,77	0,861
TT	3	6,98	8	6,15	1,000
Total	43	100,00	130	100,00	

### CASOS Y CONTROLES DEL PRESENTE ESTUDIO

Genotipo	Casos (incidentes + prevalentes)		Controles		p
	N	%	N	%	
CC	37	41,11	19	44,19	0,851
CT	40	44,44	21	48,84	0,710
TT	13	14,44	3	6,98	0,265
Total	90	100,00	43	100,00	

### CASOS DEL PRESENTE ESTUDIO Y CONTROLES DE LA PROVINCIA HOLGUÍN

Genotipo	Casos (incidentes y prevalentes)		Controles		p
	Número	%	Número	%	
CC	37	41,11	56	43,08	0,783
CT	40	44,44	66	50,77	0,410
TT	13	14,44	8	6,15	0,059
Total	90	100,00	130	100,00	

### CASOS DEL PRESENTE ESTUDIO Y TOTAL DE CONTROLES DE AMBAS PROVINCIAS

Genotipo	Casos (incidentes y prevalentes)		Controles		p
	N	%	N	%	
CC	37	41,11	75	57,69	0,793
CT	40	44,44	87	66,92	0,435
TT	13	14,44	11	6,36	0,041
Total	90	100,00	173	100,00	

Fuente: Base de datos de la investigación y Referencia bibliográfica 72.

**ANEXO 4.** Variables de riesgo en la muestra genotipada en las madres de casos incidentes, prevalentes y controles de la muestra total. Villa Clara 2013-2018.

Variables	n	Casos incidentes		Casos prevalentes		Controles		X <sup>2</sup>	p	Muestra total
		N	%	N	%	N	%			(n=318)
Hipersegmentación neutrofílica	133	15	14,20	4	3,80	6	5,70	8,94	0,011	0,302
Umbral de riesgo Hcis	83	5	20,00	4	16,00	5	10,00	2,41	0,660	0,325
Presencia de hiperhomocisteinemia	83	7	28,00	2	8,00	1	2,00	12,67	0,002	0,008
Niveles bajos de Zn	133	35	33,00	5	4,70	6	5,70	44,27	0,000	0,002
Niveles elevados de Cu	133	28	26,40	11	10,40	8	7,50	17,42	0,000	0,010
Niveles bajos de Ca	133	13	12,30	8	7,50	5	4,70	4,10	0,128	0,111
Niveles bajos de Mg	133	32	30,20	9	8,50	6	5,70	30,30	0,000	0,001
Niveles bajos de Fe	133	12	11,30	1	4,10	0	0,00	21,33	0,000	0,009
Deficiencia de algún micronutriente	133	56	52,80	16	15,10	15	14,20	51,92	0,000	0,000
Deficiencia múltiples micronutrientes	133	27	25,50	5	4,70	2	1,90	36,61	0,000	0,000
Genotipo TT	133	7	6,60	6	5,70	3	2,80	1,84	0,765	-
Genotipo CT o TT	133	26	24,50	27	25,50	24	22,60	0,42	0,981	-

Hcis: homocisteína, Zn: cinc, Cu: cobre; Ca: calcio, Mg: magnesio, Fe: hierro. Fuente: Base de datos de la investigación.

**ANEXO 5.** Análisis multivariado de variables epidemiológicas, hipersegmentación neutrofílica, concentraciones de oligoelementos y del genotipaje. Villa Clara 2013-2018.

**Tabla de clasificación<sup>a</sup>**

Observado	Pronosticado				
	Estatus Casos Control		Corrección de		
	Casos	Control	porcentaje		
Paso 8	Estatus Casos Control	Casos	81	9	90,0
		Control	10	33	76,7
Porcentaje global					85,7

a. El valor de corte es ,500

**Variables en la ecuación**

Paso 8	B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95% C.I. para	
							EXP(B)	
							Inferior	Superior
Periodo intergenésico corto	2,125	,648	10,755	1	,001	8,376	2,352	29,833
AFP elevada	21,567	10631,420	,000	1	,998	2326069155,1	,000	.
Sobre peso u obesidad	20,453	7968,269	,000	1	,998	762835259,27	,000	.
Consumo deficiente de folatos	1,541	,656	5,509	1	,019	4,668	1,289	16,899
Avanzada edad materna	22,023	8337,234	,000	1	,998	3667527855,9	,000	.
Madre adolescente	2,478	,817	9,213	1	,002	11,922	2,406	59,069
No consumo preconcepcional de AF	1,388	,665	4,349	1	,037	4,005	1,087	14,759
Deficiencia múltiple de micronutrientes	1,531	,701	4,774	1	,029	4,625	1,171	18,272
Constante	-142,960	31370,671	,000	1	,996	,000		

- a. Variables especificadas en el paso 1: No\_consumo\_AF.
- b. Variables especificadas en el paso 2: Avanzada\_edad\_materna.
- c. Variables especificadas en el paso 3: Deficiencia\_Micronutrientes.
- d. Variables especificadas en el paso 4: AFP\_elevada.
- e. Variables especificadas en el paso 5: Adolescente.
- f. Variables especificadas en el paso 6: Periodo\_IG\_Corto.
- g. Variables especificadas en el paso 7: Sobre\_Peso\_Obesa.
- h. Variables especificadas en el paso 8: Consumo\_deficiente\_Folatos.



**ANEXO 6.** Análisis multivariado de variables epidemiológicas, hipersegmentación neutrofílica, concentraciones de oligoelementos, niveles de homocisteína y del genotipaje. Villa Clara 2013-2018.

**Tabla de clasificación<sup>a</sup>**

Observado		Pronosticado			
		Estatus Casos Control		Corrección de porcentaje	
		Casos	Control		
Paso 7	Estatus Casos Control	Casos	38	11	77,6
		Control	3	31	91,2
Porcentaje global					83,1

a. El valor de corte es ,500

**Variables en la ecuación**

	B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95% C.I. para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Consumo tabletas anticonceptivas	3,720	1,320	7,940	1	,005	41,259	3,103	548,576
AFP elevada	22,677	11302,969	,000	1	,998	7052050759,010	,000	.
Sobre peso u obesidad	20,897	10575,714	,000	1	,998	1189152991,987	,000	.
Consumo deficiente de folatos	3,417	1,146	8,895	1	,003	30,491	3,227	288,088
Consumo de antagonistas de AF	4,061	1,722	5,558	1	,018	58,022	1,984	1697,111
Avanzada edad materna	23,547	10192,110	,000	1	,998	16838063684,586	,000	.
Umbral de riesgo de Hcis	1,820	,923	3,886	1	,049	6,174	1,011	37,723
Constante	-156,330	37066,513	,000	1	,997	,000		

- a. Variables especificadas en el paso 1: Consumo\_deficiente\_Folatos.
- b. Variables especificadas en el paso 2: Avanzada\_edad\_materna
- c. Variables especificadas en el paso 3: Consumo\_tabletas\_AC.
- d. Variables especificadas en el paso 4: AFP\_elevada.
- e. Variables especificadas en el paso 5: Sobre\_Peso\_Obesa.
- f. Variables especificadas en el paso 6: Antagonistas\_AF\_dicot.
- g. Variables especificadas en el paso 7: Umbral\_de\_Riesgo.