

**XCI REUNIÓN DE LA SOCIEDAD DE PEDIATRÍA DE ANDALUCÍA
OCCIDENTAL Y EXTREMADURA
SEVILLA 2005
COMUNICACIONES ORALES**

NIVELES SANGUÍNEOS DE HOMOCISTEÍNA Y FOLATO SÉRICO E INTRAERITROCITARIO Y SU RELACIÓN CON LA APARICIÓN DE DEFECTOS DEL TUBO NEURAL.

F. Yanes Sosa. Unidad de Dismorfología. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.

A. González-Meneses López. Unidad de Dismorfología. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.

A. Pérez Sánchez. Unidad de Espina Bífida. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.

A. Bermejo Navas. Grupo PAI CTS-152. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.

I. Gómez de Terreros Sánchez. Pediatría Social y Psicología de la Salud. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.

INTRODUCCIÓN

Los defectos del tubo neural (DTN) son una malformación congénita que afecta a 1,01 por cada 1000 nacidos vivos en España. Es necesario un importante esfuerzo para conocer los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y por supuesto genéticos implicados en la patogenia de las malformaciones congénitas al objeto de intentar encontrar vías de prevención para las mismas.

El tubo neural se forma en el período embrionario inducido por la notocorda, y dará lugar al encéfalo y a la médula espinal. Este proceso se conoce como neurulación. La falta de fusión y cierre en estas estructuras embrionarias originará las diferentes malformaciones que conforman los DTN.

La etiología tanto de la espina bífida como del resto de los DTN es multifactorial. Se trata habitualmente de procesos hereditarios, con un patrón abigarrado, resultando de la interacción tanto de factores ambientales como biológicos. Actualmente se están llevando a cabo estudios en cada uno de los niveles biológicos de organización, al objeto de una mejor comprensión del cierre del tubo neural y el subsiguiente desarrollo de los DTN. La elevada eficacia de la suplementación de ácido fólico en la prevención primaria de los DTN hace pensar que los genes implicados en el metabolismo del folato, de la homocisteína y de la metionina pueden estar involucrados en la etiología de los DTN.

Diversos estudios epidemiológicos han hallado niveles elevados de homocisteína plasmática y niveles bajos de folato sanguíneo en mujeres con hijos afectados de espina bífida, sugiriendo que un metabolismo anormal de la homocisteína y del folato podría estar implicado. Un considerable número de estudios en seres humanos han demostrado el efecto protector del aporte de ácido fólico en madres gestantes, de manera que un aporte extra de 0,4 mg/día de ácido fólico durante los tres primeros meses de embarazo, puede reducir la incidencia de DTN hasta en un 70%.

El ácido fólico es una vitamina hidrosoluble del complejo B, necesaria para la síntesis de nucleótidos de purina y timidina, así como para la síntesis de metionina a partir de homocisteína.

La homocisteína es un aminoácido sulfurado no proteico que actúa como intermediario en el metabolismo de otros aminoácidos, la metionina y la cisteína. Alteraciones en las rutas metabólicas por causa de causa genética o ambiental pueden provocar hiperhomocisteinemia. Los niveles sanguíneos de folatos y de vitamina B₁₂ son fuertes determinantes de la concentración en plasma de homocisteína. Algunos autores han atribuido a la homocisteína poder teratógeno, induciendo alteraciones en el desarrollo del tubo neural.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es determinar los niveles de homocisteína, folato sérico y folato intraeritrocitario en niños afectados de espina bífida y sus madres (grupo caso) y en niños sanos y sus madres (grupo control).

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos. Para el presente estudio definimos dos grupos de individuos, uno de casos y otro de controles. Cada grupo está formado a su vez por dos subgrupos, el de las madres y el de los niños. Son motivos de exclusión en el estudio el haber tomado suplementos de ácido fólico o vitaminas en los últimos 3 meses y el padecer enfermedades crónicas relacionadas con el tema de estudio (enfermedades neurológicas, alteraciones hematológicas, problemas de malabsorción de nutrientes implicados en el metabolismo de la homocisteína, ...)

Los niños y sus madres incluidos en el grupo de casos fueron seleccionados de niños afectados de espina bífida cuyo seguimiento se realiza en la Unidad de Espina Bífida del Hospital Infantil Virgen del Rocío. La edad de los niños seleccionados oscila entre los 3 y los 11 años. Para ello se llevó a cabo una entrevista con los padres, donde se les explicó de manera comprensible, el estudio que se estaba realizando, y la posibilidad de que participasen en el mismo. Si los padres decidían colaborar, daban su consentimiento mediante la firma de un *Documento de consentimiento informado*, en el cual se resume la explicación oral que se dió a los padres.

Con respecto al grupo de controles, los niños y sus madres fueron seleccionados de entre aquellos niños con un buen estado de salud en general, sin patologías crónicas, en particular aquellas relacionadas con el tema objeto de estudio: niveles de homocisteína, niveles de folato, enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central. Para ello, se mantuvieron entrevistas con padres de niños procedentes de las consultas externas de Cirugía, Urología, Otorrinolaringología y Ortopedia del Hospital Infantil Virgen del Rocío. La edad de los niños está comprendida entre los 3 y los 11 años. Si los padres aceptaban participar en el estudio, daban su consentimiento mediante la firma de un *Documento de consentimiento informado*, en el cual se resume la explicación oral que se daba a los padres.

En el momento de presentación de este resumen, el grupo de casos está formado por 31 hijos y 30 madres. El grupo de controles está formado por 64 hijos y 63 madres.

Materiales y métodos

La sangre extraída a los niños y madres incluidos en el estudio se procesó para la determinación de 3 parámetros: folato sérico, folato Rbc (intraeritrocitario) y homocisteína. Además de esto, se realizó una extracción de ADN para la creación del banco.

Debido a que el folato es degradado fácilmente por la luz solar, los tubos que contenían muestras que iban a ser usadas para la determinación de este parámetro se mantuvieron protegidos de la luz.

Para la determinación de folato sérico se extrajo sangre en un tubo con separador de suero y activador de la coagulación mediante un sistema de vacío. Se separó el suero, que fue conservado en criotubos a -20°C hasta su análisis.

La sangre destinada a la determinación del folato Rbc se extrajo en un tubo con anticoagulante (ácido etilendiaminotetraacético [EDTA] tripotásico) y con sistema de vacío. Se procedió al tratamiento con reactivo de lisis de hematíes y posterior congelación en un criotubo a -20°C hasta el momento de su determinación.

La concentración de folato sérico y folato Rbc fue determinada en un autoanalizador ARCHITECT mediante la técnica de Inmunoensayo Quimiluminiscente de Micropartícula.

Para la determinación de homocisteína en suero se extrajo un tubo con anticoagulante (ácido etilendiaminotetraacético [EDTA] tripotásico) y con sistema de vacío. El suero fue congelado a -20°C hasta su análisis. La determinación de homocisteína total se realizó mediante un autoanalizador IMX basado en la técnica de Inmunoensayo de Polarización de Fluorescencia (FPIA).

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir sangre refrigerada o congelada, empleando para ello el QIAamp DNA Blood Midi kit, basado en un sistema de separación por

centrifugación en columnas. El ADN fue congelado en un criotubo a -20°C , al objeto de crear un banco de material genético de individuos sanos e individuos afectados de espina bífida y las madres de ambos grupos, para poder en un futuro realizar un estudio de las mutaciones relacionadas con la aparición de DTN.

Análisis estadístico

La comparación de variables cuantitativas según los dos grupos de estudio (casos y controles) se ha llevado a cabo mediante el test de la U de Mann-Whitney, y los valores numéricos se han resumido empleando mediana y rango intercuartílico (P_{25} , P_{50} , P_{75}), debido a que el grupo de valores sigue una distribución no lineal. Los cálculos estadísticos se realizaron con el programa SPSS para Windows.

RESULTADOS

Cuando comparamos los niveles de homocisteína en el grupo de las madres, la distribución de los valores alrededor del P_{50} entre los percentiles 25 y 50 es superior en los casos frente a los controles, existiendo una diferencia estadísticamente significativa ($P=0,040$). Lo mismo ocurre en el grupo de los hijos, siendo superior la distribución de valores en torno al P_{50} en los casos con respecto a los controles, también con una marcada diferencia significativa ($P<0,0001$).

Con respecto al folato sérico, siendo más elevado en el grupo de los controles, no existe diferencia significativa en el grupo de los hijos ($P=0,093$), ni el de las madres ($P=0,353$). En el caso del folato Rbc, si nos fijamos primero en los hijos, encontramos que siendo mayor en el grupo de casos, no existe una diferencia significativa entre ambos grupos ($P=0,133$). En el grupo de las madres aparece una distribución superior de los valores de folato Rbc alrededor del P_{50} frente a las madres de los controles, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($P=0,006$).

Correlaciones

El folato sérico de los hijos, presenta una correlación positiva significativa con el folato Rbc de los hijos, y una correlación significativa negativa con el nivel de homocisteína en los hijos y el nivel de homocisteína de las madres. El folato Rbc del grupo de hijos presenta una correlación positiva significativa únicamente con el folato Rbc del grupo de las madres.

En la madres, el folato sérico presenta una correlación positiva significativa con el folato Rbc de las madres, y negativa con los valores de homocisteína en el grupo de las madres.

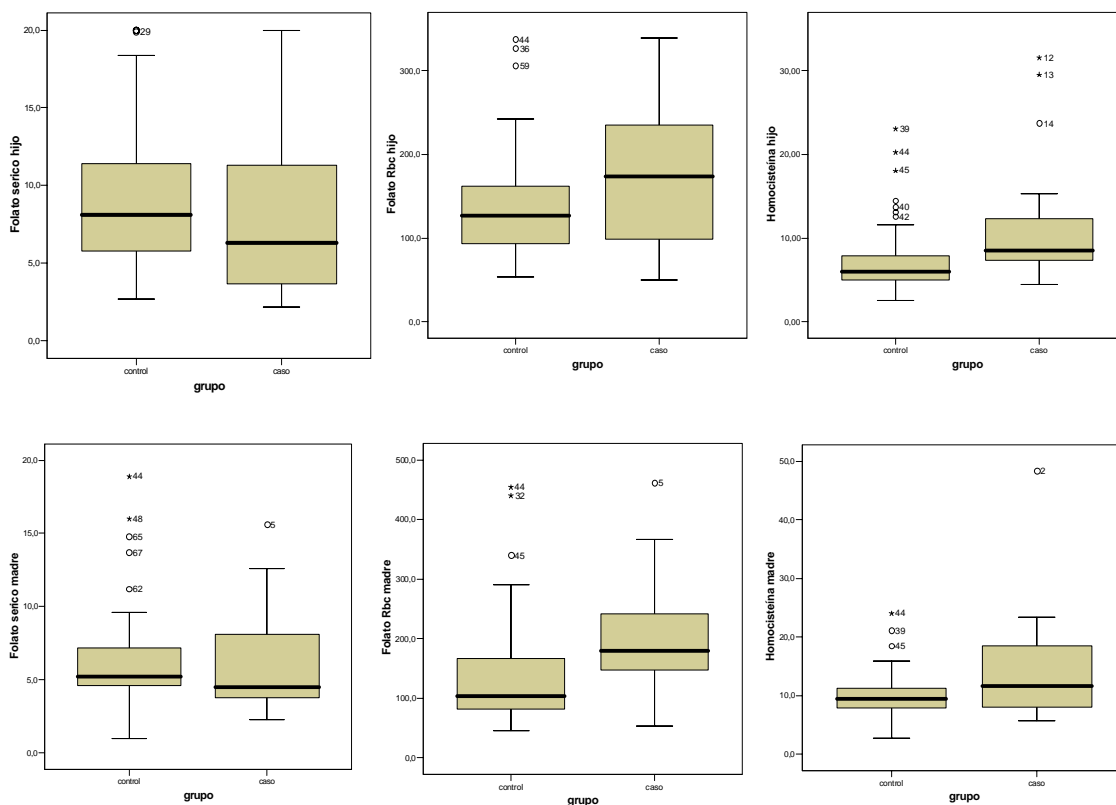
Existe una correlación significativa positiva entre el folato Rbc de los hijos y el folato Rbc de las madres.

La homocisteína del grupo de los hijos presenta una correlación significativa positiva con el folato Rbc de las madres. En el caso de las madres, encontramos una correlación significativa positiva entre sus valores de homocisteína y los valores de folato Rbc de las madres y los valores de homocisteína de los hijos.

		Percentiles			
		grupo	Percentiles		
			25	50	75
Folato serico hijo	control		5,750	8,100	12,150
	caso		3,675	6,300	11,975
Folato serico madre	control		4,600	5,200	7,600
	caso		3,800	4,500	8,750
Folato Rbc hijo	control		92,450	127,000	163,300
	caso		98,075	173,450	235,275
Folato Rbc madre	control		80,300	103,800	166,400
	caso		137,500	179,600	241,750
Homocisteína hijo	control		4,9575	5,9450	7,9875
	caso		7,2650	8,5200	13,0750
Homocisteína madre	control		7,715	9,430	11,490
	caso		7,940	11,625	18,635

Estadísticos de contraste

	U de Mann-Whitney	Sig. asintót. (bilateral)
Folato serico hijo	444,500	,093
Folato serico madre	464,500	,353
Folato Rbc hijo	459,000	,133
Folato Rbc madre	321,500	,006
Homocisteína hijo	343,000	,000
Homocisteína madre	492,000	,040



CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran unos niveles superiores de homocisteína plasmática tanto en las madres de los niños afectos de espina bífida con respecto a las madres de niños sanos, como en los niños afectos de espina bífida, existiendo una diferencia significativa en ambos casos, siendo esta mayor cuando comparamos el grupo de los hijos. Esto concuerda con los datos publicados hasta el momento, que consideran los niveles elevados de homocisteína en el plasma de mujeres gestantes un factor de riesgo para el desarrollo de DTN.

Podemos apreciar también, que los niveles de homocisteína dependen de la edad, ya que en el grupo de los hijos, estos niveles son mucho más bajos que en las madres.

Son también concordantes con los estudios publicados por otros autores, los resultados de folato sérico obtenidos, siendo más elevados en el grupo de los controles, aunque la diferencia hallada no es estadísticamente significativa (P=0,093 para los hijos, P=0,353 para las madres).

En el caso de folato Rbc, los datos muestran un comportamiento hasta ahora no descrito, de manera que los niveles aparecen aumentados en el grupo de casos frente al de controles.

Según los datos obtenidos por el presente estudio, este valor sería un factor de riesgo, lo cual no coincide con la práctica real. Numerosos estudios en seres humanos han demostrado que una suplementación con ácido fólico previene los DTN, que unos niveles elevados de folato son un factor de protección frente a la aparición de DTN.

En la misma línea de los resultados de nuestro estudio, otros han concluido que niveles elevados de homocisteína pueden provocar un desarrollo anormal de las crestas neurales y de las estructuras derivadas del tubo neural.

Es interesante resaltar el hecho de que pese a tener unos niveles de folato Rbc (que es una medida de las reservas de folato del organismo) elevados con respecto a la normalidad, los

casos presentan unos niveles de homocisteína más elevados, aún estando estos dentro de intervalo de los considerados normales.

Esto podría explicarse teniendo en cuenta que aunque las madres e hijos del grupo de los casos presenten unos niveles de folato Rbc óptimos, alguna de las rutas metabólicas implicadas podría estar alterada, lo cual provocaría que se acumulase homocisteína. La disminución de la actividad de alguna de las enzimas que participan en la ruta de la homocisteína (metilentetrahidrofolato reductasa, metionina sintetasa, cisteína beta sintetasa, entre otras) originada por la presencia de ciertos polimorfismos en los genes que las codifican, podría ser la causa de la alteración de esta ruta, al disminuir la actividad enzimática, como han informado diversos autores.

BIBLIOGRAFÍA

Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. *Lancet*. 1991 Jul 20;338(8760):131-7.

Stegers-Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJ, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CM, Borm GF, Wouters MG, Eskes TK. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects? *Metabolism*. 1994 Dec;43(12):1475-80.

Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, Scott JM. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet*. 1995 Jan 21;345(8943):149-51.

Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996 Dec 24;93(26):15227-32.

Scott JM. How does folic acid prevent neural tube defects? *Nat Med*. 1998 Aug;4(8):895-6.

Rosenquist TH, Finnell RH. Genes, folate and homocysteine in embryonic development. *Proc Nutr Soc*. 2001 Feb;60(1):53-61. Review.

Doolin MT, Barbaux S, McDonnell M, Hoess K, Whitehead AS, Mitchell LE. Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida. *Am J Hum Genet*. 2002 Nov;71(5):1222-6. Epub 2002 Oct 09.

Gos M, Szpecht-Potocka A. Genetic basis of neural tube defects. I. Regulatory genes for the neurulation process. *J Appl Genet*. 2002;43(3):343-50.

Gos M Jr, Szpecht-Potocka A. Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. *J Appl Genet*. 2002;43(4):511-24.

Gutiérrez Revilla JI, Pérez Hernández F, Tamparillas Salvador M, Calvo Martín M^aT. Influencia de los niveles de factores bioquímicos y genéticos en las concentraciones de homocisteína. *An Pediatr* 2004;60(3):215-21.

Rothenberg SP, da Costa MP, Sequeira JM, Cracco J, Roberts JL, Weedon J, Quadros EV. Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by a neural-tube defect. *N Engl J Med*. 2004 Jan 8;350(2):134-42.

Stover PJ. Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease. *Nutr Rev*. 2004 Jun;62(6 Pt 2):S3-12; discussion S13. Review.

Kirke PN, Mills JL, Molloy AM, Brody LC, O'Leary VB, Daly L, Murray S, Conley M, Mayne PD, Smith O, Scott JM. Impact of the MTHFR C677T polymorphism on risk of Neural Tube Defects: case-control study. *BMJ*. 2004 May;328:1535-1536.

Groenen PM, van Rooij IA, Peer PG, Gooskens RH, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP. Marginal maternal vitamin B12 status increases the risk of offspring with spina bifida. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Jul;191(1):11-7.

Ueland PM, Vollset SE. Homocysteine and folate in pregnancy. *Clin Chem*. 2004 Aug;50(8):1293-5.

Liu S, West R, Randell E, Longerich L, O'connor KS, Scott H, Crowley M, Lam A, Prabhakaran V, McCourt C. A comprehensive evaluation of food fortification with folic acid for the primary prevention of neural tube defects. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2004 Sep 27;4(1):20.

Pintó Sala X. La homocisteína en la prevención de las enfermedades cardiovasculares. *JANO* Noviembre 2004. Vol LXVII nº 1541.

Mitchell LE, Adzick NS, Melchionne J, Pasquariello PS, Sutton LN, Whitehead AS. Spina bifida. *Lancet*. 2004 Nov 20;364(9448):1885-95.

Shurtleff DB. Epidemiology of neural tube defects and folic acid. *Cerebrospinal Fluid Res*. 2004 Dec 10;1(1):5.

Cabrera RM, Hill DS, Etheredge AJ, Finnell RH. Investigations into the etiology of neural tube defects. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005 Dec;72(4):330-44.