

ARTÍCULO DE REVISIÓN

RESERVAS DE ÁCIDO FÓLICO INTRAERITROCITARIO EN MADRES Y RECIÉN NACIDOS CON DEFECTOS DEL TUBO NEURAL COMPARADO CON UN GRUPO CONTROL SANO

Kestler E.¹, Ortiz J¹, Méndez B¹, Zanuncini R.M² y Urrejola M.I²

RESUMEN

Introducción

La prevalencia de los defectos del tubo neural, especialmente la anencefalia, espina bífida y encefalocele, se presentan mayormente en poblaciones que presentan deficiencias nutricionales. Pocos estudios de países en desarrollo han estudiado la relación de los niveles de ácido fólico sérico e intraeritrocitario en la madre y el recién nacido que presenta DTN. El ácido fólico intraeritrocitario es un marcador del depósito celular de este folato el cual es utilizado y necesario para la síntesis del DNA y RNA empleado en el crecimiento y desarrollo fetal.

Objetivo

Determinar la diferencia en las concentraciones séricas e intraeritrocitarias de folatos en madres y recién nacidos afectados con anomalías del tubo neural comparados con un grupo control de una población de mujeres representativas de países en vías de desarrollo.

Resultados

74% de las madres estudiadas presentaron valores séricos normales de ácido fólico entre 3 y 17 ng/ml. Más del 50% de los recién nacidos presentaron valores de ácido fólico sérico por arriba de 17 ng/ml. 94% de las madres del estudio, presentaron niveles de ácido fólico intraeritrocitario entre los rangos normales (93-641 ng/ml). Únicamente el 6% de éstas presentó niveles de ácido fólico menor de 93 ng/ml. Al comparar los dos grupos de estudio, el 11% de las madres que tuvieron recién nacidos con DTN presentaron niveles de ácido fólico menor de 93 ng/ml, mientras que ninguna de las madres con recién nacidos normales presentaron niveles por debajo de 93 ng/ml ($p=0.05$). El ácido fólico intraeritrocitario presentó una media de 219.48 ng/ml (± 125.67) para los recién nacidos con defectos del tubo neural y una media de 232.42 ng/ml (± 76.60) para los recién nacidos normales.

Conclusiones

El grupo de madres con recién nacidos con defectos del tubo neural presentó los niveles más bajos de ácido fólico intraeritrocitario. La mediana de ácido fólico intraeritrocitario materno con recién nacidos que presentaron DTN fue de 186.21 ng/ml, la cual está muy por debajo para lo reportado para poblaciones de blancos no-hispanos, negros no-hispanos y México-americanos respectivamente que viven en USA. (247, 196 y 235 ng/ml). Es importante que las autoridades de salud del país coordinen esfuerzos para mejorar las políticas no sólo de suplementación de ácido fólico en mujeres en edad reproductiva, sino también se mejoren las políticas para fortificar el pan, las tortillas, el arroz, las pastas y otros productos que puedan contener los requerimientos mínimos necesarios de ácido fólico para la población y sobre todo que estos suplementos alimenticios estén al alcance de la población en condiciones menos favorables..

ABSTRACT

Introduction

The prevalence of neural tube defects, especially anencephaly, spine bifida and encephalocele are higher in population with nutritional deficiencies. Few studies in developing countries have related the level of seric folate and intra erythrocyte folate in the mother and the newborn with neural tube defects. The intra erythrocyte folate is a cell deposit marker which it is necessary for the DNA and RNA synthesis used for the fetal development.

Objective

To evaluate the difference in seric folate concentration and intra erythrocyte folates in mothers and newborn with neural tube defects compared with a normal control group of women and newborn from developing countries.

Results

74% of the mothers studied had normal blood seric folate between 3 and 17 ng/ml. More than 50% of the newborn had blood seric folate over 17 ng/ml. 94% of the mothers studied had levels of intra erythrocyte folate between the normal rank (93-641 ng/ml). Just 6% had levels of seric folate below 93 ng/ml. At compare the two groups of study, 11% of the mothers who had newborn with NTD had levels of seric folate less than 93 ng/ml, none of the mothers with normal newborn had levels

¹ Centro de Investigación Epidemiológica en Salud Sexual y Reproductiva, Hospital General "San Juan de Dios", Sótano.

² Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

of seric folate below 93 ng/ml ($p=0.05$). Levels of erythrocyte folate had a media of de 219.48 ng/ml (+ 125.67) for newborn with neural tube defects and a media of 232.42 ng/ml (+ 76.60) for normal newborn.

Conclusions

Mothers with newborn with NTD had low levels of intra erythrocyte folate. The media of intra erythrocyte folate levels in newborn with NTD was of 186.21 ng/ml, that it is below the reported for white no-hispanic population, black no-hispanic and Mexico-American population respectively living in the USA. (247, 196 y 235 ng/ml). It is important that the health policy-makers make effort to improve the policies not just for the supplementation of folate in women in reproductive age, but also to improve policies in the fortification of bread, corn (tortilla), rice, wheat flour and others products with the minimum necessary required of folate for the population and moreover the necessary access for the population less privileged.

INTRODUCCIÓN

Los Defectos del Tubo Neural (DTN) representados principalmente por la espina bífida, la anencefalia y el encefalocele se presentan en poblaciones de cualquier parte del mundo. Anualmente se calcula que nacen alrededor de 300,000 recién nacidos con este tipo de defectos alrededor del mundo.^{1,2} La prevalencia para esta enfermedad varía de país a país y aún puede variar dentro de un mismo país. En general, en países desarrollados esta prevalencia se reporta entre 7.5/10,000 nacidos vivos para Canadá³ y 9/10,000 nacidos vivos para Estados Unidos de América.⁴ Para países en desarrollo la prevalencia varía entre 10.1 / 10,000 nacidos vivos para Chile⁵ y 6.3 / 10,000 nacidos vivos para Costa Rica.⁶

En Guatemala la prevalencia encontrada en varios estudios de población hospitalaria varía desde 23 a 106 por 10,000 nacidos vivos^{7,8,9} Datos recientes publicados sobre un sistema de vigilancia epidemiológica¹⁰ reportan una tasa de defectos del tubo neural para el departamento de Guatemala de 19.8 por 10,000 nacidos vivos el cual incluye todos los nacimientos y mortinatos del Departamento de Guatemala. Este mismo informe reporta tasas específicas de 5.85, 12.25 y 1.77 por 10,000 nacidos vivos para anencefalia, espina bífida y encefalocele respectivamente.

Los estudios hechos hace más de 20 años en el Reino Unido¹¹ y Hungría¹² demostraron la importancia de la adecuada suplementación preconcepcional con ácido fólico para la prevención de las anomalías del tubo neural. A estos hallazgos siguieron una serie de estudios en diferentes países los cuales confirmaron la importancia del ácido fólico en la prevención de estas anomalías, surgiendo evidencia que también juega un papel importante en la prevención de otras anomalías como gastrosquisis, cardiopatías congénitas, onfalocele, labio y paladar hendido, ano imperforado y defectos en extremidades^{13, 14, 15}

La concentración del folato puede medirse en el suero sanguíneo o a nivel intraeritrocitario. Se prefiere para fines de estudio este último ya que es más estable, no se afecta por la dieta y puede considerarse un depósito a largo plazo del folato que puede indicar un promedio de 3 meses de depósito en las personas y no es afectado por la ingesta reciente de la dieta^{16, 17} El nivel de folato sérico es transitorio y solamente indican el movimiento de folatos del sistema gastrointestinal hacia las células. Se ha demostrado además una relación inversa entre los niveles de folatos intraeritrocitarios y la aparición de anomalías del tubo neural, a menor nivel mayor incidencia de estos¹⁶

Estudios previos que comparan niveles de folatos séricos e intraeritrocitarios en madres con hijos con DTN y con un grupo control de madres con recién nacidos sanos, han tenido resultados diversos. Algunos reportes indican que no existe diferencia significativa en cuanto a los niveles intraeritrocitarios de folato^{12, 17} Mientras otros estudios han encontrado diferencias significativas en los niveles de madres con recién nacidos con DTN y el grupo control¹⁸ Al relacionar el folato materno con folato de sus recién nacidos con anomalías del tubo neural, se ha determinado que los recién nacidos afectados con DTN tienen concentraciones de folato más altos que sus madres.¹⁹

El objetivo de este estudio fue determinar si existen diferencias entre las concentraciones séricas e intraeritrocitarias de folatos en las madres y sus recién nacidos afectados con anomalías del tubo neural, comparados con un grupo control de madres y recién nacidos sanos en una población de mujeres que son representativas de países en vías de desarrollo.

Material y métodos

De agosto 2005 a marzo 2006, se realizó un estudio prospectivo de casos (DTN) pareado con un control (sano), para conocer el estado sérico e intraeritrocitario de los folatos en las madres que han tenido hijos sanos sin ningún defecto congénito y compararlo con madres que han tenido hijos con anomalías del tubo neural.

a) Selección de casos y controles:

El estudio se llevó a cabo en dos hospitales públicos (General San Juan de Dios y Roosevelt) y maternidades cantonales pertenecientes al Ministerio de Salud Pública y dos hospitales de maternidad del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social, todos localizados en el departamento de Guatemala. Fueron incluidos en el estudio todos los recién nacidos vivos que presentaban defecto del tubo neural. Este defecto puede ser aislado o acompañado de otro defecto congénito que se relacionaba a niveles bajos de ácido fólico. Se excluyó del estudio todo aquel recién nacido en quien el defecto del tubo neural estuviera asociado a un grupo de múltiples defectos congénitos de etiología desconocida, anomalías cromosómicas evidentes, síndromes génicos, onfalocele sindrónico, hijos de madres diabéticas o que tomaban anticonvulsivantes, ácido valproico, fenitoina, primidona, carbamazepina, trimetoprin y finalmente alguna secuencia malformativa con bandas amnióticas.

El grupo control estuvo constituido por madres y recién nacidos sanos, sin defectos congénitos visibles y fueron pareados con los casos por edad gestacional al nacimiento, peso del recién nacido, así como el nivel educativo de la madre.

b) Laboratorio:

Para cada sujeto de estudio la medición del ácido fólico intraeritrocitario y ácido fólico sérico fueron obtenidas de sangre venosa materna y sangre del cordón umbilical al momento del nacimiento. La sangre fue trasladada en tubos de ensayo con K₂ EDTA como anticoagulante y transportada en hielo seco al laboratorio clínico popular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala dentro de las primeras 24 horas de su obtención. La sangre fue almacenada a menos 20 grados Celsius hasta el momento de su análisis. Los análisis fueron realizados por un ensayo inmunométrico por el método de quimioluminiscencia en un Equipo Imnulite 1000 de la Casa Diagnostic Products Corporation (DPC). Esta casa provee los sueros respectivos para el control y calibración de las corridas. Análisis de hematocrito utilizado para la transformación de los resultados en folato sérico e intraeritrocitario fueron realizados y expresados en nanogramos por mililitro (ng/ml).

c) Consentimiento informado:

Previo a la participación de las madres en el estudio, éstas fueron informadas sobre los objetivos del estudio. Después de asegurarnos que estaba clara su participación en el estudio y aceptar su participación se obtuvo el consentimiento informado para la realización de la entrevista y obtención de la muestra sanguínea tanto de ella, como del recién nacido.

Tamaño de la Muestra:

Dada una prevalencia de 23 por 10,000 niños nacidos vivos con defectos de tubo neural, un nivel de confianza de 95% (valor estándar de 1.96) y un margen de error de 5% (valor estándar de 0.05), la muestra final calculada fue de 88 casos, los cuales se distribuían en la mitad de casos para cada grupo de estudio e incluía el par de sujetos, madre y recién nacido.

	n / %	DTN n=46 / %	Normal n=42 / %	Valor de p
Valores de Ácido Fólico sérico (Madre)				
3 – 17 ng/ml	65/74	34 / 74	31/74	p=0.81
18 – 76 ng/ml	23/26	12 /26	11/26	
Valores de Ácido Fólico sérico (Recién Nacido)				
3 – 17 ng/ml	47/53	26/57	21/50	p=0.16
18 – 76 ng/ml	41/47	20/43	21/50	
Valores de Ácido Fólico Intraeritrocitario (Madre)				
< 93 ng/ml	5/ 6	5/11	0	p=0.05 *
93 – 641 ng/ml	83/94	41/89	42/10	
Valores de Ácido Fólico Intraeritrocitario (Recién Nacido)				
93 – 641 ng/ml	85/97	44/91	41/98	p=0.53
> 641 ng/ml	3/ 3	2/ 4	1/ 2	

* Fisher Exact Test

Tabla 1:

Ácido Fólico en suero intraeritrocitario en madres y recién nacidos

RESULTADOS

No existió diferencia estadística entre las variables biológicas de los grupos de estudio. La edad de la madre y la edad al nacimiento del primer hijo fueron iguales para los dos grupos de estudio. Similar situación se presentó al analizar la historia obstétrica de ambos grupos de estudio. El número de embarazos previos, el número de abortos previos, el número de partos vaginales, el número de cesáreas y el número de hijos vivos y muertos fueron iguales para ambos grupos. El sexo del recién nacido y el peso al nacer también fue similar para ambos grupos.

La tabla 1 presenta los resultados de los valores de ácido fólico sérico e intraeritrocitario de los recién nacidos y de las madres de los dos grupos de estudio. 74% de las madres presentaron valores normales séricos de ácido fólico entre 3 y 17 ng/ml. De estos valores séricos de ácido fólico en los recién nacidos más o menos la mitad de cada grupo de estudio presentó valores normales y la otra mitad presentó valores por arriba de 17 ng/ml., 94% de las madres del estudio, presentaron niveles de ácido fólico intraeritrocitario entre los rangos normales (93-641 ng/ml). Únicamente el 6% de éstas presentó niveles de ácido fólico menor de 93 ng/ml. Al comparar los dos grupos de estudio, el 11% de las madres que tuvieron recién nacidos con DTN presentaron niveles de ácido fólico menor de 93 ng/ml, ninguna de las madres con recién nacidos normales presentaron niveles por debajo de 93 ng/ml (p=0.05). Los niveles entre rangos normales de ácido fólico intraeritrocitario (93 a 641 ng/ml) en los recién nacidos fueron muy similares para aquellos que presentaron DTN (91%) comparado con los recién nacidos normales (98%). Ninguna diferencia se presentó en los niveles de ácido fólico sérico (tabla 1).

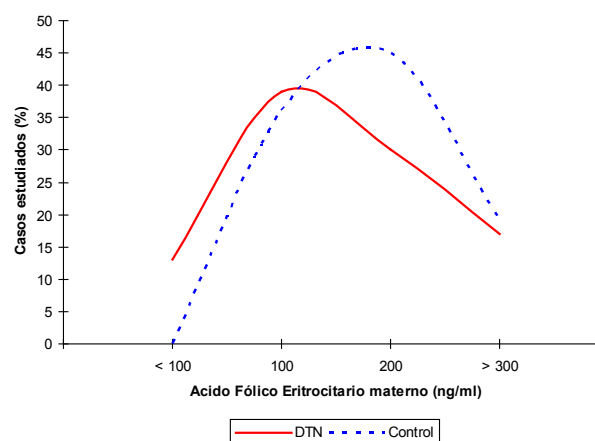


Figura 1: Comportamiento del ácido fólico intraeritrocitario en madres con recién nacidos con DTN y madres con recién nacidos normales (ng/ml) (P = 0.07)

La figura 1 presenta la distribución normal del ácido fólico intraeritrocitario materno para los dos grupos de estudio. Así como existe una modesta significancia estadística entre los niveles de ácido fólico intraeritrocitario para las madres con recién nacidos con DTN y el grupo control, también se observa una menor proporción de los casos estudiados con niveles más bajos del folato intraeritrocitario materno, y además la curva se presenta desplazada más a la izquierda, lo cual representa niveles más bajos de ácido fólico en las madres con recién nacidos con DTN. Finalmente la figura 2 presenta la media de 219.48 ng/ml (± 125.67) para los recién nacidos con defectos del tubo neural y una media de 232.42 ng/ml (± 76.60) para los recién nacidos normales. Otro estudio realizado en dos hospitales públicos del departamento de Guatemala²⁰ reportó que los niveles medios de ácido fólico en hemolizados de eritrocitos de recién nacidos sanos y de recién nacidos con defectos del tubo neural presentaban niveles de 405.4 ± 161.5 ng/ml y 357.2 ± 137.2 ng/ml respectivamente, no siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Resultados en dos poblaciones sociales diferentes²¹ que compara el nivel medio de ácido fólico en mujeres durante el primer trimestre del embarazo y que no habían iniciado ninguna suplementación de ácido fólico encontró que para el primer grupo con mejor clase social niveles de 370.12 ± 131.55 ng/ml de ácido fólico intraeritrocitario contra 306.02 ± 164.50 ng/ml en una población marginal sub-urbana, siendo estadísticamente diferentes. Por otra parte la mediana de ácido fólico intraeritrocitario materna (no mostrada) para los recién nacidos con DTN fue de 186.21 ng/ml, la cual está muy por debajo para lo reportado para poblaciones de blancos no-hispanos, negros no-hispanos y México-americanos respectivamente que viven en USA. (247, 196 y 235 ng/ml)²²

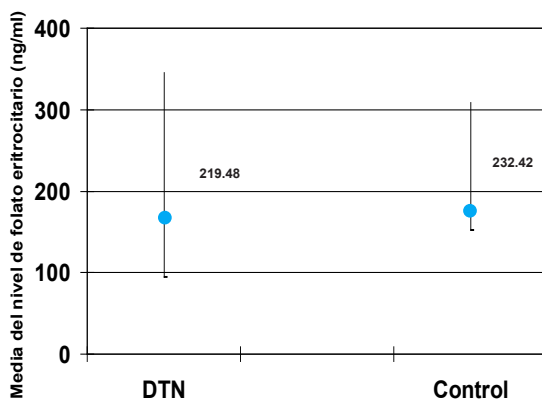


Figura 2: Niveles de ácido fólico intraeritrocitario (media + D.E.) en madres con recién nacidos con DTN y madres con recién nacidos normales (ng/ml) ($P = 0.05$)

CONCLUSIONES

La etiología de las anomalías del tubo neural es multifactorial. Sin embargo, el factor etiológico más importante identificado a la fecha es la deficiencia de ácido fólico, ya que cuando se establece un adecuado programa que favorezca la fortificación y/o suplementación periconcepcional de ácido fólico, estos defectos del tubo neural pueden reducirse entre un 50 a 70%.^{23,24,25,26} Así también se ha publicado que los factores genéticos y específicamente los polimorfismos con el gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR 677C>T, MTHFR 1298A>C) cuya prevalencia en determinadas poblaciones puede llegar a ser alta, 18% en mujeres de ascendencia mexicana y 11% en mujeres japonesas y chinas, esto puede explicar la alta frecuencia de DTN en estas poblaciones.²⁷ Sin embargo, una adecuada política de suplementación y fortificación de ácido fólico puede ser la única estrategia para la disminución de DTN aun en los casos de polimorfismos en las poblaciones.^{17,24,27,28,29}

Los niveles de folato en plasma reflejan las fluctuaciones de la ingesta diaria de alimentos, mientras que los niveles de folato intraeritrocitario representan una reserva y un medio para mantener la homeostasis de los folatos y por lo tanto no está afectado por la ingesta dietética reciente²³ Estos datos muestran como una muestra de la población guatemalteca presenta reservas de ácido fólico intraeritrocitario materno muy por debajo de lo reportado para otras poblaciones. Al igual que fue previamente publicado, nuestros resultados también muestran que la proporción de la concentración de folato sérico materno y del recién nacido presentan valores más elevados. Como fue previamente reportado,³⁰ existe una fuerte asociación positiva entre la concentración del folato materno en sangre, del plasma del cordón umbilical y de la placenta, lo cual sugiere que el paso del folato transplacentar depende más de las concentraciones de folato plasmático que intraeritrocitario.

Estos datos contribuyen a demostrar que valores de ácido fólico intraeritrocitario medidos por dos métodos de laboratorio diferentes muestran diferencias para los valores medios reportados, sin embargo es importante mencionar que todos estos estudios independientemente del método de laboratorio utilizado reportan valores menores para las madres que presentan recién nacidos con defectos del tubo neural. Por otro lado niveles de ácido fólico encontrados en una población de mujeres jóvenes guatemaltecas no embarazadas se encontraban muy cerca al límite normal bajo. (234.6 ± 75 ng/ml)³¹

Finalmente hay que tomar en cuenta que los valores de ácido fólico encontrados en los estudios reportados para recién nacidos con defectos del tubo neural pueden estar influidos por el ácido fólico que como suplemente vitamínico se haya ingerido durante el embarazo.

Es importante que Guatemala inicie programas serios de fortificación de alimentos con ácido fólico, ya que como se ha visto en otros países, a pesar que la fortificación de los cereales y granos con ácido fólico, que existe por ley desde enero de 1998, datos publicados recientemente²² sugieren

que las concentraciones de ácido fólico dentro de las mujeres norteamericanas no-embarazadas y en edad reproductiva han disminuido durante el período 1999-2000 al 2003-2004. Lo importante de esta información es que países desarrollados que invierten buena cantidad de dinero en este problema de salud pública todavía encuentran dificultades en implementar totalmente un programa preventivo. Este escenario es más complejo en países en desarrollo en donde aproximadamente el 50% de los embarazos son no planificados y la mayor parte de veces la mujer desconoce que está embarazada cuando los DTN ya han ocurrido³² y es allí donde radica la importancia del folato en forma preconcepcional a las mujeres en edad reproductiva, ya sea en forma de suplemento o con la adecuada fortificación de alimentos.

A pesar de que los valores de ácido fólico intraeritoricitario reportados a la fecha en Guatemala determinan valores medios bajos dentro de límites normales, la evidencia científica internacional muestra que se debe continuar apoyando los programas de suplementación y/o fortificación con ácido fólico para prevenir los defectos congénitos. Existe la necesidad en el país de determinar a través de encuestas nutricionales los valores medios de ácido fólico para la mujer guatemalteca, tomando en cuenta los diferentes grupos sociales del país.

Los países en desarrollo tienen aún un camino muy largo y difícil para hacer llegar no sólo la suplementación de 400 microgramos de ácido fólico diario a todas las mujeres en edad reproductiva, capaces de quedar embarazadas y así reducir la ocurrencia de DTN, sino también el lograr que el pan, las tortillas, arroz, pastas y otros productos puedan contener los requerimientos mínimos necesarios de ácido fólico. Es necesario fortalecer esfuerzos interinstitucionales que busquen fortalecer y suplementar poblaciones con ácido fólico, pero más importante es dirigir estos esfuerzos hacia las poblaciones más necesitadas y en condiciones nutricionales de alarma.

Agradecimiento: Este proyecto fue posible realizarlo gracias al apoyo financiero del CDC Branco. Agradecemos también el soporte administrativo otorgado por el Centro de Estudios en Salud, Universidad del Valle de Guatemala.

REFERENCIAS

1. International retrospective cohort study of neural tube defects in relation to folic acid recommendations: are the recommendations working? *BMJ*:2005;330:571-576
2. Prevention of Neural-Tube Defects with Folic Acid in China. *N Engl J Med*. Nov 11,1999;341(20):1485-90
3. Wilson R.D. et al. The use of folic acid for the prevention of neural tube defects and other congenital anomalies. *J Obstet Gynaecol Can*. 2003 Nov;25(11):959-73.
4. CDC. Spina Bifida and Anencephaly Before and After Folic Acid Mandate-United States. 1995-1996 and 1999-2000. *MMWR* May, 2004;53(17):362-365.
5. Hertrampf, E. and Cortéz F. Folic Acid Fortification on Wheat Flour: Chile. *Nutrition Reviews*, Vol. 62(6);S44-S48.
6. Tacsan L. and Rivera M.A. The Costa Rican Experience: Reduction of Neural Tube Defects following Food Fortification Programs. *Nutrition Reviews*, Vol. 62(6);S40-S43.
7. Cifuentes G.L. Perfil Epidemiológico de las Anomalías del Tubo Neural en Guatemala. Enero-Diciembre de 2000. Tesis (Médico y Cirujano). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Médicas. 2002.
8. Duran A.D. et al. Prevalencia de Anomalías Congénitas en Comunidades Rurales de Guatemala. Tesis (Médico y Cirujano). Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Médicas. 2003.
9. Valladares AV et al. Prevalencia de Anomalías Congénitas en Comunidades Rurales de Guatemala 2002. Tesis (Médico y Cirujano). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Médicas. 2003.
10. Kestler E., Ortiz J. Sistema de Vigilancia Activo para Defectos del Tubo Neural. Departamento de Guatemala Vol. 1. No. 1 Enero – Julio 2006. Publicación Interna Centro de Investigación Epidemiológica en Salud Sexual y Reproductiva.
11. Wild J et al. Investigation of factors influencing folate status in women who have had a neural tube defect-affected infant. *Br J Obstet Gynaecol*. 1993 Jun;100(6):546-9
12. Czeizel A., Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N. Engl. J. Med*. 1992;327(26):1832-1835
13. Botto LD, Olney RS, Erickson JD. Vitamin supplements and the risk for congenital anomalies other than neural tube defects. *Am J Genet*. 2004 Feb 15;125C(1):12-21
14. Botto L et al. Occurrence of Omphalocele in Relation to Maternal Multivitamin Use: A Population-Based Study. *Pediatrics* 2002;109:904-908
15. Hernandez-Diaz S et al. Folic Acid Antagonists During Pregnancy and the Risk of Birth Defects. *N Engl J Med* 200 Nov;343(22):1608-14
16. Geisel J. Folic Acid and Neural Tube Defects in Pregnancy. A review. *J Perinat Neonat Nurs* Vol 17, No. 4,268-279.
17. Relton CL et al. Low erythrocyte folate status and polymorphic variation in folate-related genes are associated with risk of neural tube defect pregnancy. *Mol Genet and Metab* 81(2004):273-281.
18. Budunki V. et al. Maternal-fetal folate status and neural tube defects: a case control study. *Biol Neonate*. 1995;67(3):154-159
19. Thorand B. et al. Maternal and fetal serum and red blood cell folate and vitamin concentrations in pregnancies affected by neural tube defects. *Z Geburtshilfe Neonatol*. 1996 Sep-Oct;200(5):176-80
20. Quiroa Barreno L.R. Comparación entre la concentración de folatos hemolizados de glóbulos rojos de sangre de cordón umbilical de recién nacidos normales y recién nacidos con defectos del tubo neural. Guatemala. Universidad Francisco Marroquín, 2000, Tesis de Médico y Cirujano.
21. Zambrano Ruano S. A. Niveles de ácido fólico en bemoalizados de glóbulos rojos en mujeres en su primer trimestre del embarazo. Guatemala, Universidad Francisco Marroquín, 2002, Tesis de Médico y Cirujano.
22. CDC. Folate Status in Women of Childbearing Age, by Race/Ethnicity. United States, 1999-2000, 2001-2002 and 2003-2004. *MMWR* 2007;55(51):1377-1380.
23. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet*. July 20,1991;338 (8760):131-137

24. Molloy AM, Mills JL, Kirke PN, Weir DG, Scott JM. Folate status and neural tube defects. *Biofactors*. 1999;10(2-3):291-4
25. CDC. Folate status in Women of Childbearing Age. United States 1999. *MMWR* October 27, 2000/vol. 49/No. 42 pag 962.
26. Berry R.J., Li Z., Erickson D. et al. Prevention of Neural-Tube Defects with Folic Acid in China. *N Engl J Med*. Nov 11, 1999;341(20):1485-90
27. Esfahani ST, Cogger EA, Caudill MA. Heterogeneity in the prevalence of methylenetetrahydro- folate reductase gene polymorphisms in women of different ethnic groups. *J Am Diet Assoc* 2003 Feb;103(2):200-7
28. Molloy AM, Mills JL, Kirke PN, Ramsbottom D, McPartlin JM, Burke H, Conley M, Whitehead AS, Weir DG, Scott JM. Low blood folates in NDT pregnancies are only partly explained by thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase: low folate status alone may be the critical factor. *Am J Med Genet*. 1998 Jun 30;78(2):155-9
29. McLone DG. The etiology of neural tube defects: the role of folic acid. *Childs Nerv Sys* 2003;19:537-539
30. Baker H., Frank O., Deangelis B., et al. Role of placenta in maternal-fetal vitamin transfer in humans. *Am J. Obstet Gynecol* 1981;141:792-796.
31. Gómez Fuentes, V.T. Niveles de ácido fólico en glóbulos rojos de estudiantes en edad fértil de instituciones privadas y públicas. Guatemala. Universidad Francisco Marroquín, 2001, Tesis de Médico y Cirujano.
32. CDC. Folate status in Women of Childbearing Age, by Race/Ethnicity-United 1999-2000 *MMWR* 51(36):808-810, 2002 CDC