

J.I. Gutiérrez-Revilla<sup>a</sup>  
F. Pérez-Hernández<sup>b</sup>  
M. Tamparillas<sup>a</sup>

## Defectos del tubo neural y gen *cistationina* $\beta$ -sintasa

<sup>a</sup>Servicio de Bioquímica Clínica. Sección de Genética. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. <sup>b</sup>Farmacéutica de Atención Primaria. Gerencia Santander-Laredo. Santander. España.

### Correspondencia:

Dr. J.I. Gutiérrez Revilla.  
Servicio de Bioquímica Clínica. Sección de Genética.  
Hospital Universitario Miguel Servet.  
P.º Isabel La Católica, 1-3. 50009 Zaragoza. España.  
Correo electrónico: joseignaciogutierrez@redfarma.org

Fecha de recepción: 24/10/03  
Aceptado para su publicación: 28/10/03

## Neural tube defects and the cystathionine $\beta$ -synthase gene

J.I. Gutiérrez-Revilla, F. Pérez-Hernández y M. Tamparillas.  
Defectos del tubo neural y gen *cistationina*  $\beta$ -sintasa.

### RESUMEN

**Objetivo:** Identificar alteraciones en genes relacionados con el metabolismo del folato como el gen *cistationina*  $\beta$ -sintasa, con el fin de estudiar su posible implicación en la aparición de defectos del tubo neural.

**Sujetos y métodos:** En 27 pacientes con defectos del tubo neural, 28 madres de pacientes, 23 hermanos de pacientes sin defectos del tubo neural y 159 controles sanos, se han estudiado los polimorfismos T833C y 844ins68 dentro del gen *cistationina*  $\beta$ -sintasa y su relación con la homocisteína.

**Resultados:** La prevalencia de T833C y 844ins68 entre los grupos estudiados es la misma ( $p = 0,861$ ). Tampoco se han podido establecer diferencias significativas en las concentraciones de homocisteína ( $p = 0,429$ ), folato ( $p = 0,886$ ), vitamina B<sub>12</sub> ( $p = 0,934$ ) y folato intraeritrocitario

( $p = 0,618$ ) entre individuos homocigotos o heterocigotos para el polimorfismo T833C y 844ins68 al compararlos con individuos con genotipo normal.

**Conclusiones:** No existe una evidencia directa entre T833C y 844ins68 del gen *cistationina*  $\beta$ -sintasa y el riesgo de defectos del tubo neural, aunque es necesaria la realización de nuevos estudios confirmativos.

### PALABRAS CLAVE

*Cistationina*  $\beta$ -sintasa. Homocisteína. Folato. Vitamina B<sub>12</sub>. Folato intracelular.

### SUMMARY

**Objective:** To identify alterations in genes related with folate metabolism such as the *cystathionine*

496  *$\beta$ -synthase (CBS) gene in order to study their possible involvement in the development of neural tube defects (NTD).*

**Subjects and methods:** The study group consisted of 27 NTD patients, 28 mothers of children with NTD, 23 siblings of patients without NTD and 159 healthy controls. The effect of one silent polymorphism (T833C) and 68-bp insertion (844ins68) of the CBS gene on plasma homocysteine (tHcy) levels was evaluated.

**Results:** No difference was found between the groups in the prevalence of T833C and 844ins68 ( $p = 0.861$ ). No significant differences were found in concentrations of tHcy ( $p = 0.429$ ), folate ( $p = 0.886$ ), vitamin B<sub>12</sub> ( $p = 0.934$ ) or intracellular folate ( $p = 0.618$ ) between individuals who were heterozygous or homozygous for the T833C polymorphism and individuals carrying the 68-bp insertion compared with individuals with the wild type genotype.

**Conclusions:** The results of this study provide no direct evidence of a link between T833C and 844ins68 of the CBS gene and the folate-related risk of NTD, although further studies should be performed to confirm this result.

## KEY WORDS

*Cystathionine  $\beta$ -synthase*. Homocysteine. Folate. Vitamin B<sub>12</sub>. Intracellular folate.

## INTRODUCCIÓN

Los defectos del tubo neural (DTN) aparecen durante las primeras semanas del embarazo. La existencia de evidencias clínicas y epidemiológicas, tales como la variabilidad en las tasas de ocurrencia debido a factores geográficos, tiempo, estatus socioeconómico y raza, y el relativo bajo riesgo de recurrencia dentro de las familias, sugieren que la etiología de la espina bífida está relacionada con interacciones múltiples de factores genéticos y medioambientales<sup>1,2</sup>. Debido a que la adecuada suplementación con ácido fólico previene la ocurrencia y recurrencia de DTN<sup>3</sup> y al hallazgo de concentracio-

nes de homocisteína elevadas en la sangre de madres con hijos afectados, se cree que los genes involucrados en el metabolismo del ácido fólico y la homocisteína participan en la etiología de los DTN. Los genes codificantes de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) o metilentetrahidrofolato deshidrogenasa (MTHFD) pertenecerían al primer grupo, y los genes codificantes de la enzima metionina sintasa (MS), su regulador metionina sintasa reductasa (MTRR), así como la cistationina  $\beta$ -sintasa (CBS), pueden incluirse en el segundo grupo<sup>4</sup>. Sin embargo, no es del todo conocido el papel de los factores genéticos sobre las concentraciones de homocisteína total (tHcy). La homocisteína es un aminoácido sulfurado que se forma a partir del aminoácido esencial metionina. Una vez formada, la homocisteína puede transformarse a cistationina y cisteína vía transulfuración o ser remetilada a metionina. La remetilación realizada por la enzima MS requiere 5-metil tetrahidrofolato como donante de grupo metilo y vitamina B<sub>12</sub> para el transporte del grupo metilo, mientras que la remetilación realizada por la enzima betaína-homocisteína-metiltransferasa requiere betaína como donante de grupos metilo. El paso regulador de la ruta de transulfuración es la catalizada por la enzima *cistationina  $\beta$ -sintasa* (CBS, EC 4.2.1.22), enzima dependiente de piridoxal 5'-fosfato. Las alteraciones metabólicas hereditarias relacionadas con el déficit de CBS son la causa más frecuente de homocistinuria en humanos<sup>5</sup>.

Aunque se han descrito muchas mutaciones en el gen CBS<sup>6</sup>, la mayoría de ellas son raras. Una de las más frecuentes es la inserción de 68 pb en el exón 8 del gen CBS (844ins68), que provoca la introducción de 2 codones sin sentido en el mismo exón<sup>7</sup>. Otra mutación frecuente es la T833C, que sustituye treonina por isoleucina en el codón 278 situado 11 pb por encima de la inserción<sup>7</sup>.

Se ha observado que la variante 844ins68 se encuentra presente, en estado heterocigoto, en el 14-19,8% de la población general<sup>7-11</sup>, aunque algunos autores han encontrado una prevalencia del 7,5% en forma homocigota y del 3,7% en forma heterocigota<sup>7</sup>. Recientemente, esta variante se ha asociado con bajas concentraciones de tHcy después de realizar sobrecarga de metionina, por lo que podría considerarse un factor de riesgo de DTN<sup>12</sup>.

En el presente trabajo se ha estudiado la posible asociación entre la mutación T833C y la inserción

844ins68 del gen *CBS* y el riesgo de tener descendencia afectada de DTN. Por otra parte, se ha tratado de ver la posible asociación entre los polimorfismos y las concentraciones de tHcy, folato, vitamina B<sub>12</sub> y folato intracelular.

## SUJETOS Y MÉTODOS

### Sujetos

El estudio estuvo formado por 27 pacientes (12 mujeres y 15 varones, con una edad media de 13,3 años) afectados de DTN diagnosticados y tratados en el Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza). Por otro lado, 28 mujeres con hijo afectado de DTN (con una edad media de 43,5 años) y 23 hermanos de pacientes (17 mujeres y 6 varones, con una edad media de 14,7 años) sin DTN también accedieron a participar en el estudio, junto con 159 controles sanos (81 mujeres y 78 varones, con una edad media de 22,9 años).

Después de mantener ayuno nocturno, se recogieron las muestras de sangre en tubos con EDTA como anticoagulante, con el fin de determinar las concentraciones de tHcy, folato, vitamina B<sub>12</sub> y folato intracelular. Las muestras de sangre fueron inmediatamente colocadas en hielo y centrifugadas 10 min a 3.000 g. La determinación de tHcy se llevó a cabo mediante inmunoensayo de polarización fluorescente<sup>13</sup> (FPIA, Abbott Division Diagnostics, Oslo, Noruega); mientras que la determinación de folato, vitamina B<sub>12</sub> y folato intracelular fue realizada por inmunoensayo electroquimioluminiscente (ECLIA, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se realizó la extracción de ADN de todos los individuos para la el estudio de las mutaciones.

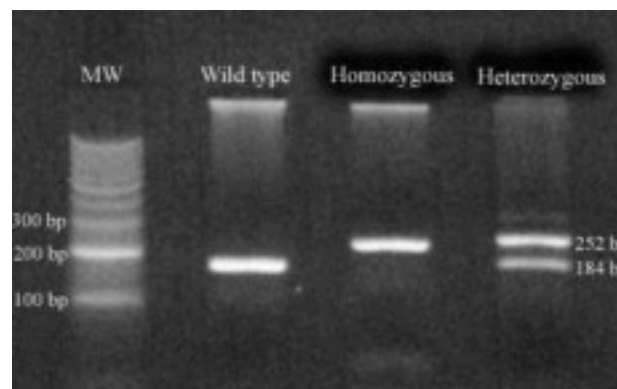
Las personas participantes no pertenecían a ningún grupo étnico en particular. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Miguel Servet y todos los sujetos dieron consentimiento informado.

### Análisis de las mutaciones

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de leucocitos de sangre periférica mediante procedimientos estándar. La identificación de la varian-

te 844ins68 y el polimorfismo T833C del gen *CBS* fue realizada mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ≈ 200 ng de ADN genómico, 2,5 unidades de AmpliTaq<sup>®</sup> ADN polimerasa (Perkin Elmer Cetus), 10 mmol Tris (pH 8,3)/l, 1,5 mmol MgCl<sub>2</sub>/l, 50 mmol KCl/l, 0,2 mmol de los 4 deoxinucleótidos trifosfato/l y 0,2 μmol de cada *primer*/l en un volumen de 100 μl.

La variante 844ins68 del exón 8 se detectó conjuntamente con la mutación T833C, realizando una digestión enzimática con la enzima de restricción Bsr I<sup>8</sup>. En el estudio de la variante 844ins68 se obtiene un fragmento de 252 pb mediante PCR utilizando los *primers*, 5'-CTGGCCTTGAGCCCTGAA-3' y 5'-GGCCGGGCTCTGGACTC-3'. Las condiciones de amplificación fueron de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min; temperatura de anillamiento de 60 °C durante 1 min, y temperatura de extensión de 72 °C, durante 2 min. Las bandas de ADN fueron visualizadas en gel de agarosa al 2% teñidas con bromuro de etidio y visualizadas en transiluminador ultravioleta. Los individuos heterocigotos para la variante 844ins68 presentaban una banda adicional de 252 pb además del fragmento normal de 184 pb (fig. 1). El producto de PCR fue digerido con la enzima de restricción Bsr I (a 65 °C toda la noche) y fue visualizado en gel de agarosa al 2% teñido con



**Figura 1.** Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que presenta los productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de tres individuos. Patrón electroforético del exón 8 del gen *CBS* obtenido a partir de ADN genómico de un control sin inserción de 68 pb, presentando sólo un fragmento de 184 pb, de un control homocigoto para la inserción que presenta una sola banda de 252 pb y de un control heterocigoto para la inserción que presenta una banda de 252 pb, además de la banda normal de 184 pb. MW: peso molecular.

498 bromuro de etidio. Los individuos heterocigotos para el polimorfismo T833C presentaban una banda de 209 pb además del fragmento normal de 184 pb.

### Análisis estadístico

Las concentraciones plasmáticas de homocisteína, folato, vitamina B<sub>12</sub> y folato intracelular muestran una distribución asimétrica, por lo que se realizó la transformación logarítmica de los resultados, con el fin de eliminar la asimetría. La comparativa entre la prevalencia de la variante 844ins68 y la mutación T833C entre los distintos grupos estudiados se realizó utilizando el test la  $\chi^2$  de Pearson.

Se calculó la media geométrica de tHcy, folato, vitamina B<sub>12</sub> y folato intracelular, y su intervalo de confianza (IC) del 95%. Para cada una de las mutaciones estudiadas se aplicó el test ANOVA con el fin de establecer si existían diferencias significativas con respecto a las concentraciones de tHcy, folato, vitamina B<sub>12</sub> y folato intracelular, entre los distintos genotipos. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa estadístico SPSS para Windows (versión 10.0, SPSS, Chicago, Estados Unidos).

### RESULTADOS

Los genotipos de la variante 844ins68 y el polimorfismo T833C fueron determinados en 27 pacientes con DTN, 28 madres de hijo afectado de DTN, 23 hermanos de pacientes sin DTN y 159 controles sanos.

En la figura 1 se muestra un gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio, en el que aparecen los

3 posibles patrones genotípicos de la variante 844ins68. Tanto la variante 844ins68 como el polimorfismo T833C presentan una distribución genotípica que cumple el test de equilibrio de Hardy-Weinberg (datos no expuestos). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,861$ ) en la prevalencia de los distintos genotipos entre los distintos grupos estudiados (tabla 1), por lo que las 4 poblaciones fueron reagrupadas con el fin de estudiar la posible relación entre los distintos genotipos y las concentraciones plasmáticas de tHcy, folato, vitamina B<sub>12</sub> y folato intracelular.

De los 237 individuos, 2 (0,8%) fueron homocigotos para la variante 844ins68, mientras que 35 (14,8%) fueron heterocigotos, y 200 (84,4%) no presentaron la variante 844ins68. Se obtuvieron los mismos resultados para la mutación T833C.

Los individuos homocigotos o heterocigotos para el polimorfismo T833C presentaron unas concentraciones de tHcy más bajas que los individuos con genotipo T/T (fig. 2). Por el contrario, esta asociación no fue estadísticamente significativa ( $p = 0,429$ ) al comparar el genotipo C/C con el T/T y, de la misma manera, al comparar los individuos portadores de la inserción de 68 pb ( $p = 0,429$ ).

La media geométrica de las concentraciones de folato fue similar en individuos homocigotos para la variante 844ins68 al compararlos con individuos heterocigotos o sin la variante ( $p = 0,886$ ) (tabla 2).

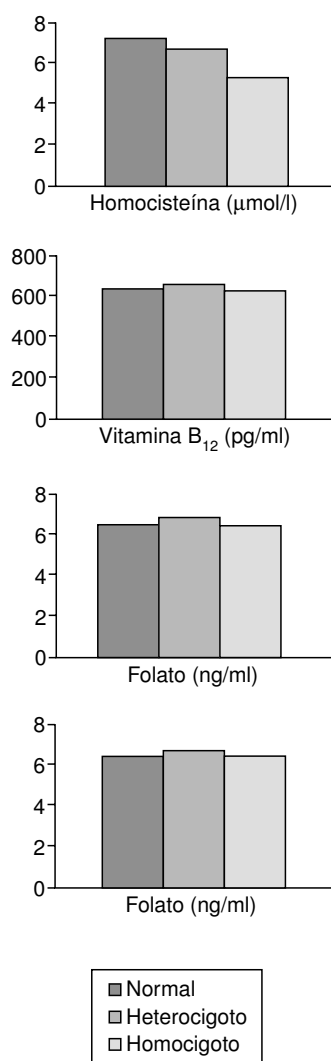
En la misma línea, la media geométrica de la concentración de vitamina B<sub>12</sub> fue igual en individuos homocigotos para la variante 844ins68 al compararlos con individuos heterocigotos o sin la variante ( $p = 0,934$ ) (tabla 2).

Finalmente, la media geométrica de la concentración de folato intracelular fue más baja en indivi-

Tabla 1. Prevalencia de los genotipos 844ins68 y T833C en los diferentes grupos estudiados

		Controles (%)	Pacientes (%)	Madres (%)	Hermanos (%)
844ins68	Normal	133/159 (83,6)	24/27 (88,9)	25/28 (89,3)	18/23 (78,3)
	Heterocigoto	24/159 (15,1)	3/27 (11,1)	3/28 (10,7)	5/23 (21,7)
	Homocigoto	2/159 (1,3)	ND	ND	ND
T833C	Normal	133/159 (83,6)	24/27 (88,9)	25/28 (89,3)	18/23 (78,3)
	Heterocigoto	24/159 (15,1)	3/27 (11,1)	3/28 (10,7)	5/23 (21,7)
	Homocigoto	2/159 (1,3)	ND	ND	ND

ND: no detectado.



**Figura 2.** Media geométrica de las concentraciones de tHcy, folato, vitamina B<sub>12</sub> y folato intracelular en función de los genotipos T833C.

duos homocigotos para la variante 844ins68 al compararlos con individuos heterocigotos o sin la variante. Sin embargo, las diferencias de las concentraciones de folato intracelular no fueron estadísticamente significativas ( $p = 0,618$ ) (tabla 2).

## DISCUSIÓN

El incremento de las concentraciones plasmáticas

de homocisteína se ha asociado a un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular, abortos de repetición, DTN, preeclampsia y otra serie de alteraciones<sup>14-16</sup>. Sin embargo, los estudios de correlación entre los factores genéticos y las enfermedades asociadas a hiperhomocisteinemia, incluyendo los DTN, no siempre presentan resultados concluyentes<sup>11,17</sup>. Además, no es del todo conocido el papel de los factores genéticos sobre las concentraciones plasmáticas de tHcy.

En el presente estudio se ha investigado la posible implicación de dos variantes genéticas presentes en el gen *CBS*, el polimorfismo T833C y la variante 844ins68, como posibles marcadores genéticos de defecto en el gen *CBS* que contribuyan a una situación de hiperhomocisteinemia y con ello un aumento del riesgo de DTN. Al igual que algunos autores<sup>18,19</sup>, se han encontrado que la variante 844ins68 está presente en  $\approx 15\%$  de la población control,

**Tabla 2.** Media geométrica de las concentraciones de tHcy, folato, vitamina B<sub>12</sub> y folato intracelular en función del genotipo 844ins68

	<i>N</i>	<i>Media geométrica</i>	<i>IC del 95%</i>	
Homocisteína (μmol/l)				
Normal	200	7,28	6,88	7,68
Heterocigoto	35	6,83	6,07	7,58
Homocigoto	2	5,31	−25,31	35,93
Todos	237	7,19	6,84	7,55
Folato (ng/ml)				
Normal	199	6,38	5,79	6,97
Heterocigoto	35	6,75	5,5	8
Homocigoto	2	6,42	−24,08	36,91
Todos	236	6,43	5,9	6,96
Vitamina B <sub>12</sub> (pg/ml)				
Normal	200	638	596	680
Heterocigoto	35	658	562	754
Homocigoto	2	631	−1.454	2.716
Todos	237	641	603	679
Folato intracelular (ng/ml)				
Normal	197	455	431	478
Heterocigoto	35	462	413	511
Homocigoto	2	345	174	517
Todos	234	455	434	476

IC: intervalo de confianza.

500 aunque no se han obtenido diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos estudiados.

En el estudio realizado por Tsai et al<sup>8</sup> se observó que la variante 844ins68 estaba asociada con concentraciones de tHcy significativamente más bajas. Otros autores plantean la hipótesis de que la variante 844ins68 se encuentra asociada a una mayor actividad enzimática de la enzima. Este efecto sería más marcado en presencia de bajas concentraciones de piridoxal-5'-fosfato, cofactor de la enzima CBS<sup>20</sup>. En el presente estudio no se ha podido establecer una asociación entre la variante 844ins68 y el polimorfismo T833C del gen CBS y las concentraciones plasmáticas de tHcy, folato, vitamina B<sub>12</sub> y folato intracelular. Una posible explicación podría estar en el pequeño tamaño del número de individuos estudiados (sólo 2 controles fueron homocigotos para la va-

riante 844ins68) o debido a las concentraciones de homocisteína que eran inferiores a las presentadas por Tsai et al<sup>8</sup>.

Al igual que otros autores<sup>7</sup>, siempre se encontró la variante 844ins68 asociada a la mutación T833C. Este resultado indica que la inserción sufre una segregación que siempre aparece en *cis*, estando la mutación T833C localizada por encima de la variante.

A partir de los resultados obtenidos, no se puede concluir que la variante 844ins68 y el polimorfismo T833C del gen CBS sean un factor de riesgo de descendencia afecta de DTN, debido a que no existe relación con las determinaciones bioquímicas y la prevalencia de ambas es similar en los distintos grupos estudiados. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por otros autores como Ramsbottom et al<sup>21</sup> y Morrison et al<sup>22</sup>, que tampoco han encontrado un aumento del riesgo de DTN debido a la presencia

de la variante 844ins68 en el gen CBS.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD. Neural tube defects. *N Engl J Med* 1999;341:1509-19.
2. Lee BH, Cheong H, Shin YS, Cho BK, Wang KC. The effect of C677T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase gene and plasma folate level on hyperhomocysteinemia in patients with meningomyelocele. *Child Nerv Syst* 2000;16:559-63.
3. Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992;327:1832-5.
4. Gos MJ, Szpecht-Potocka A. Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. *J Appl Genet* 2002;43:511-24.
5. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. Disorders of transsulfuration. En: Scriver CS, Beaudewet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York: MacGraw-Hill, 1995; p. 1279-327.
6. Kraus JP, Oliveriusova J, Sokolova J. The human cystathionine beta-synthase (CBS) gene: complete sequence, alternative splicing, and polymorphisms. *Genomics* 1998;52:312-24.
7. Sperandio MP, De Franchis R, Andria G, Sebastio G. A 68-bp insertion found in a homocystinuric patient is a common variant and is skipped by alternative splicing of the cystathionine β-synthase mRNA. *Am J Hum Genet* 1996;59:1391-3.
8. Tsai MY, Bignell M, Schwichtenberg K, Hanson NQ. High prevalence of a mutation in the cystathionine β-synthase gene. *Am J Hum Genet* 1996;59:1262-7.
9. Kluijtmans LAJ, Boers GHJ, Tribels FJM, Van Lith-Zanders HMA, Van den Heuvel LPWJ, Blom HJ. A common 844ins68 insertion variant in the cystathionine beta-synthase gene. *Biochem Mol Med* 1997;62:23-5.
10. Ramsbottom D, Scott JM, Molloy A. Are common mutations of cystathionine beta-synthase involved in the etiology of neural tube defects? *Clin Genet* 1997;51:39-42.
11. Wilchen DE, Wang XL. Relevance to spina bifida of mutated methylene tetrahydrofolate reductase. *Lancet* 1996;347:340.
12. Tsai MY, Bignell M, Yang F, Welge BG, Graham KJ, Hanson NQ. Polygenic influence on plasma homocysteine: association of two prevalent mutations, the 844ins68 of cystathionine β-synthase and A2756G of methionine synthase, with lowered plasma homocysteine levels. *Atherosclerosis* 2000; 149:131-7.
13. Shipchandler MI, Moore EG. Rapid, fully automated measurement of plasma homocysteine with the Abbot Imx analyzer. *Clin Chem* 1995;41:991-8.
14. Kluijtmans LAJ, Van den Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, Van Oost BA, et al. Molecular genetic analysis in

- mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylene tetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996;58:35-41.
15. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Tribels FJ, Eskes TK. Neural tube defects and derangement of homocysteine metabolism. *N Engl J Med* 1991;324:199-200.
  16. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Blom HJ, Tribels FJ, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia and recurrent spontaneous abortion or abruptio placentae. *Lancet* 1992;339:1122-3.
  17. Koch MC, Stegman K, Ziegler A, Schroeter B, Ermert A. Evaluation of the MTHFR C677T allele and the MTHFR gene locus in a German spina bifida population. *Eur J Pediatr* 1998;157:487-92.
  18. Tsai MY, Bignell M, Yang F, Welge BG, Graham KJ, Hanson NQ. Polygenic influence on plasma homocysteine: association of two prevalent mutations, the 844ins68 of cystathionine  $\beta$ -synthase and A2756G of methionine synthase, with lowered plasma homocysteine levels. *Atherosclerosis* 2000;149:131-7.
  19. Franco R, Maffei F, Lourenco D, Piccinato C, Morelli V, Thomazini I, et al. The frequency of 844ins68 mutation in the cystathionine beta-synthase gene is not increased in patients with venous thrombosis. *Haematologica* 1998;83:1006-8.
  20. Tsai MY, Yang F, Bignell M, Aras O, Hanson NQ. Relation between plasma homocysteine concentration, the 844ins68 variant of the cystathionine beta-synthase gene, and pyridoxal-5'-phosphate concentration. *Mol Genet Metab* 1999;67:352-6.
  21. Ramsbottom D, Scott JM, Molloy A, Weir DG, Kirke PN, Mills JL, et al. Are common mutations of cystathionine beta-synthase involved in the etiology of neural tube defects? *Clin Genet* 1997;51:39-42.
  22. Morrison K, Papapetrou C, Hol FA, Mariman EC, Lynch SA, Burn J, et al. Susceptibility to spina bifida; an association study of five candidate genes. *Ann Hum Genet* 1998;62:379-96.