

PREVENCIÓN PRIMARIA DE LAS MALFORMACIONES CONGÉNITAS

DRA. FANNY CORTÉS M.

MÉDICO PEDIATRA-GENETISTA.

PROFESORA ASOCIADA, UNIVERSIDAD DE CHILE.

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA & DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA.

CLÍNICA LAS CONDES.

LABORATORIO DE GENÉTICA Y ENFERMEDADES METABÓLICAS, INTA.

UNIVERSIDAD DE CHILE.

RESUMEN

Las malformaciones congénitas han adquirido durante los últimos años una importancia creciente como causa de morbimortalidad, especialmente durante el primer año de vida. Dado que la modificación génica es una realidad en el tratamiento de muy pocas enfermedades genéticas, el énfasis está destinado a la prevención. Por otro lado, la gran mayoría de las malformaciones congénitas se producen por la interacción de factores genéticos y ambientales. De tal manera que la prevención primaria se ha basado principalmente en la modificación de estos factores ambientales. En el presente artículo se discuten pautas básicas de prevención de malformaciones congénitas, aplicables a cualquier población y se enfatiza el uso de ácido fólico en la prevención de los defectos de cierre del tubo neural, utilizando por primera vez intervenciones nutricionales de salud pública.

SUMMARY

During last years congenital malformations had improved their impact as cause of morbidity and mortality in humans, specially during the first year of life. Due to the fact that genetic modification is a reality just for a very few genetic diseases, the emphasis has been destined to the development of prevention measures, and as most congenital malformations are the result of the interaction between genetic and environmental factors, primary prevention is based principally in the modification of these environmental factors. In this article we discuss the principal and basic guidelines for the prevention of congenital malformations with special emphasis in the use of folic acid in the prevention of

neural tube defects, using for the first time a public health nutritional intervention for the prevention of congenital malformations.

PREVENCIÓN DE MALFORMACIONES CONGÉNITAS

Las enfermedades genéticas y en especial las malformaciones congénitas (MC) han adquirido durante los últimos años un rol muy importante en la morbimortalidad humana, especialmente en el primer año de vida. Se considera que cuando un país alcanza cifras de mortalidad infantil de alrededor de un dígito, las MC pasan a ocupar el primer lugar entre sus causas. En Chile, durante los últimos años la tasa de mortalidad infantil ha alcanzado cifras inferiores a ocho por mil y en este momento las MC ocupan el segundo lugar entre las causas de muerte en el niño menor de un año después de la prematuridad (1).

Los defectos congénitos son anomalías morfológicas o funcionales, presentes al nacimiento, de causa genética y/o ambiental. En general las MC afectan a 2-3 % de los recién nacidos y se estima que la mitad de ellos podría ser prevenido (2). En Chile, lamentablemente aún no se ha implementado un Registro Nacional de Malformaciones Congénitas, los únicos datos disponibles son los que entregan los registros del ECLAMC (Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas) en el que Chile participa desde 1969 y al que Chile envía información de alrededor de un 7% de sus nacimientos (3).

En efecto en Chile en el año 1970, la mortalidad infantil era de 80 por mil nacidos vivos, y la mortalidad por MC de 3,5 por mil. Actualmente la mortalidad infantil ha bajado a ocho por mil, mientras que la mortalidad por MC se ha mantenido estable en la misma cifra. Es decir en

ARTÍCULO RECIBIDO: 17-08-07

ARTÍCULO APROBADO PARA PUBLICACIÓN: 14-09-07

1970 influía un 4,4% en la mortalidad infantil y actualmente un 44%. Es por lo tanto un problema de Salud Pública de importancia creciente, que nos debe interesar.

Sin duda las MC son la manifestación más llamativa de las enfermedades genéticas y desde siempre el hombre ha tratado de encontrarles una explicación. Explicación que ha variado en la medida que el conocimiento progresa y que ha incluido desde poderes sobrenaturales, hibridación con animales, efectos mecánicos, conductas de la madre durante el embarazo, etc. En la actualidad el énfasis en el estudio etiológico de las malformaciones congénitas está en la interacción de factores genéticos y ambientales, y en las bases moleculares del desarrollo embrionario. Durante las últimas dos décadas la combinación de avances en genética, biología del desarrollo y bioquímica han transformado el estudio de los defectos congénitos en el hombre. En la actualidad se reconoce la importancia de la arquitectura del genoma, el efecto del origen parental de algunos genes (impronta), la fisiopatología molecular, las vías del desarrollo, el mosaïcismo y la predisposición a algunos tipos de cáncer en el entendimiento de los defectos congénitos. Estos conocimientos pueden ser aplicados para mejorar la seguridad diagnóstica, la información pronóstica, el consejo y en algunos casos incluso el tratamiento. En resumen, la publicación de la secuencia de tres billones de nucleótidos del ADN, del genoma humano completo (en su primera versión del año 2001 y la secuencia "terminada" publicada el año 2006), entrega a los investigadores la información que necesitan para analizar cualquier gen, literalmente con el clic del mouse de su computador (4).

Existen distintos tipos de afecciones genéticas: cromosómicas, monogénicas, poligénicas/multifactoriales, síndromes de genes contiguos, alteraciones del ADN mitocondrial, efectos de teratógenos. Finalmente una enfermedad genética será siempre el resultado de la expresión de uno o más genes anormales. Si el o los genes involucrados codifican una proteína que cumple un rol estructural importante, se producirá una malformación o un síndrome malformativo múltiple. Si el gen involucrado codifica una enzima importante para una vía metabólica específica, se producirá un error congénito del metabolismo.

En la actualidad, y a pesar del gran desarrollo que ha alcanzado la genética, un porcentaje importante de las malformaciones congénitas son aun de etiología desconocida (Tabla 1).

Así como aún no es posible establecer un diagnóstico etiológico en un porcentaje importante de las MC, también son muy pocas las enfermedades genéticas que tienen tratamiento. Esto ha llevado a desarrollar los aspectos preventivos, que incluyen entre otros los programas de tamizaje y el consejo genético preconcepcional. Por lo mismo y dado que la mayoría de las enfermedades genéticas son el resultado de la interacción de factores genéticos con factores ambientales, y que la modificación génica requiere de un alto nivel de tecnología, que en la mayoría de los casos aún no está disponible, es que se ha intentado en algunos casos modificar el ambiente ya sea para prevenir una enfermedad o para cambiar su historia natural (5).

TABLA 1. ETIOLOGÍA DE LAS MALFORMACIONES HUMANAS OBSERVADAS DURANTE EL PRIMER AÑO DE VIDA

Causa sospechada	% del total
Desconocida -Poligénica -Multifactorial (interacción genes-ambiente) -Errores espontáneos del desarrollo -Interacciones sinérgicas de teratógenos	65-75
Genéticas -Enfermedades genéticas heredadas, autosómicas o ligada al cromosoma X. -Citogenéticas (anomalías cromosómicas) -Nuevas mutaciones	15 - 25 7,5 - 12 6 -10 1,5 - 3
Ambientales -Condiciones maternas: alcoholismo, diabetes, endocrinopatías, fenilquetonuria, nicotina, déficits nutricionales -Agentes infecciosos: rubéola, toxoplasmosis, sífilis, herpes simplex, citomegalovirus, virus varicela-zoster, parvovirus B19. -Problemas mecánicos (deformaciones): bridas amnióticas, constricciones por el cordón umbilical, desproporción entre el tamaño del útero y el contenido uterino. -Agentes químicos, medicamentos, altas dosis de radiaciones ionizantes, hipertermia.	10 4 3 1 - 2 <1

Brent Robert, *Pediatrics in Review* Vol.22 No.5 May 2001.

Existen tres niveles de prevención de enfermedades genéticas: primaria, secundaria y terciaria. En la prevención primaria la acción se centra sobre individuos sanos y previene la enfermedad reduciendo la susceptibilidad o la exposición a factores de riesgo, lo que significa que es principalmente preconcepcional e impide los defectos congénitos. La prevención secundaria, en cambio, actúa sobre individuos enfermos, impidiendo la evolución y secuelas de la enfermedad a través de la detección precoz y el tratamiento oportuno, lo que significa que es principalmente prenatal (durante el embarazo). Finalmente, la prevención terciaria actúa sobre individuos afectados, impidiendo las complicaciones de la enfermedad a través de la rehabilitación y la corrección adecuadas, es por lo tanto postnatal e impide las complicaciones.

Para los genetistas clínicos el énfasis debe estar en la prevención primaria, es decir en tratar de que se conciban menos individuos con en-

fermedades genéticas, lo que obliga a identificar los factores de riesgo a los que con más frecuencia está expuesta una población y a diseñar estrategias de protección.

El ECLAMC (Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas) ha identificado en los países en desarrollo 10 factores de riesgo a considerar (6):

- Embarazo no planificado.
- Edad materna avanzada.
- Controles prenatales deficientes.
- Rubéola.
- Automedicación.
- Alcohol.
- Tabaco.
- Deficiencias de la dieta.
- Exposición laboral.
- Falta de consulta especializada.

De acuerdo a la identificación de estos factores de riesgo, el mismo ECLAMC ha elaborado un decálogo para la prevención primaria, que es aplicable a todos los países en desarrollo:

1. Cualquier mujer fértil puede estar embarazada.
2. Trate de completar su familia cuando sea joven.
3. Haga los controles prenatales en forma rutinaria.
4. Póngase la vacuna de la rubéola antes del embarazo.
5. Evite los medicamentos, excepto aquellos estrictamente necesarios.
6. Evite las bebidas alcohólicas.
7. Evite el tabaco y los lugares para fumadores.
8. Coma bien y variado: prefiera frutas y verduras.
9. Consulte sobre los riesgos que pueda tener sobre el embarazo, su trabajo habitual.
10. En caso de duda consulte a su médico o a un servicio especializado.

Existen además una serie de otros factores que se deben considerar en la prevención primaria de los defectos congénitos. Entre ellos los más importantes son:

• **Ocupación de la madre.** La mujer que trabaja fuera del hogar tiene sin duda mayor riesgo reproductivo. Si bien existen múltiples publicaciones que han relacionado la exposición laboral de mujeres en edad fértil a diferentes agentes, con algunas afecciones congénitas (7,8), la exposición laboral al plomo y su asociación con retraso mental es la única comprobadamente teratogénica. (9-11). Es importante si, continuar investigando otros agentes sospechosos como los pesticidas, así como también la exposición laboral a altas temperaturas por tiempo prolongado (12, 13).

• **Medio ambiente: contaminación y accidentes.** La mujer en edad fértil debe protegerse de radiaciones ionizantes, metilmercurio y plomo. No existen estudios científicos para otros contaminantes que prueben su inocuidad. Los accidentes no son factores de riesgo especialmente importantes de malformaciones congénitas (14).

• **Radiaciones y otros factores físicos.** La percepción del riesgo de las radiaciones ionizantes es exagerada. Las dosis habituales, utilizadas en estudios médicos, no producirían daño. La ultrasonografía y las ondas electromagnéticas no producen daño salvo si se asocian con hipertermia. Los traumatismos y la hipoxia no son causa frecuente de MC (15).

• **Estilo de vida:** Los factores más importantes a considerar son el tabaco, que produce retraso de crecimiento intrauterino; el alcohol, que es el teratógeno más frecuente en nuestra población y que es el responsable del síndrome de alcoholismo fetal. Es importante también mencionar la cocaína, dado el aumento de su consumo en nuestro país y la que por su efecto vasoconstrictor produce malformaciones del tipo disrupción (gastrosquisis, extrofia vesical...) (16).

• **Dieta:** Se recomienda una alimentación variada rica en frutas y verduras; lograr un peso adecuado de la madre preconcepcional pues tanto el bajo peso como la obesidad se han asociado a patología del embarazo, RCIU, enfermedades crónicas y defectos congénitos; indicar el uso de ácido fólico preconcepcional; evitar el consumo excesivo de vitaminas, especialmente Vitamina A; evitar la contaminación química y microbiológica de los alimentos (metales pesados: plomo, cadmio, mercurio, arsénico; pesticidas (organoclorados); microorganismos: listeria, toxoplasma (17).

• **Medicamentos:** El principal problema es la automedicación. Se debe considerar que todos los medicamentos son potencialmente teratogénicos y que entre estos los anticonvulsivantes, hormonas, cumarínicos, antineoplásicos, talidomida, son los más importantes (18).

• **Enfermedades maternas transmisibles:** Las más importantes a considerar ya sea por su frecuencia o por la gravedad de sus manifestaciones son: rubéola, toxoplasmosis, varicela, VIH (19).

• **Enfermedades maternas no transmisibles:** Lo más importante es el control prenatal e idealmente preconcepcional que permita un adecuado manejo de enfermedades crónicas como diabetes mellitus, epilepsia, hipertensión arterial (20).

• **Edad materna y otros factores demográficos:** La edad materna avanzada es un factor de riesgo de alteraciones cromosómicas del tipo no disyunción; la edad paterna avanzada favorece las nuevas mutaciones de afecciones dominantes; la consanguinidad favorece la aparición de afecciones recesivas al igual que ocurre en zonas de aislamiento geográfico (21).

PREVENCIÓN PRIMARIA DE LOS DEFECTOS DE CIERRE DEL TUBO NEURAL

Los defectos de cierre del tubo neural (DTN), son las malformaciones congénitas más frecuentes después de las cardiopatías congénitas, con una incidencia, de acuerdo a la literatura, de 1-3 por 1000 recién nacidos. Los DTN son defectos de la cubierta músculo-esquelética (cráneo y columna)

que protege al sistema nervioso central (cerebro y médula espinal). Incluyen por lo tanto anencefalia, encéfalocele y espina bífida. Son defectos de origen poligénico multifactorial, lo que significa que son producidos por la interacción de diferentes genes con el medio ambiente y que, como afecciones poligénicas, tienen un riesgo aumentado de recurrencia (3% cuando una pareja ya ha tenido un hijo con DTN, o uno de los progenitores tiene un DTN y 10% cuando hay dos hijos afectados). Son defectos severos, 50% de los afectados nace muerto o fallece en el primer año de vida y los que sobreviven lo hacen con grandes discapacidades físicas y/o mentales que requieren de una rehabilitación larga y costosa.

El desarrollo del tubo neural (neurulación) ocurre muy precozmente en la vida embrionaria. El canal neural y los pliegues neurales se observan por primera vez durante el estado 8 del desarrollo embrionario (18 días post concepción) y en el estado 13 (4 semanas post concepción) lo normal es que el tubo neural esté completamente cerrado.

Los DTN tenían en Chile una frecuencia de 17/10.000 RN vivos, antes de la fortificación de la harina de trigo con ácido fólico, eran el segundo defecto congénito aislado después de las cardiopatías congénitas y representan el primer defecto congénito prevenible a través de medidas nutricionales de salud pública (22). El riesgo de tener un feto afectado con un DTN puede ser reducido en un 50-70% con la ingesta periconcepcional de ácido fólico (23, 24). Recomendaciones provenientes de Norteamérica (25), Europa (26) y FAO/OMS (27) concuerdan que toda mujer en edad fértil debe consumir diariamente 400 µg de ácido fólico para disminuir su riesgo de tener un hijo afectado por un DTN.

La fuerte evidencia del rol protector del ácido fólico ha obligado a las autoridades a planificar estrategias de intervención. En 1992 el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos a través del Center for Disease Control and Prevention (CDC) recomendó que todas las mujeres con posibilidades de embarazo ingirieran una dosis de ácido fólico de 0.4 mg al día. La recomendación es su uso periconcepcional para todas las mujeres en riesgo de embarazo, debido a que la gran mayoría de los embarazos son no planificados y porque estos defectos ocurren muy precozmente durante el desarrollo embrionario, aún antes de que muchas mujeres tengan conciencia de su embarazo. Trasladar esta recomendación a la práctica ha significado un importante desafío de salud pública debido a que la adhesividad a estas indicaciones ha sido muy pobre.

Las estrategias aceptadas para aumentar el consumo de ácido fólico son las habituales: 1) promover el consumo de alimentos ricos en ácido fólico, 2) promover el uso de polivitamínicos con ácido fólico (suplementación) y 3) fortificación de alimentos de consumo masivo. La primera no es factible puesto que los niveles de ácido fólico requeridos no pueden ser logrados sólo a través de un aumento del consumo diario de alimentos ricos en ácido fólico. El uso de suplementación de ácido fólico en forma medicamentosa, que es la segunda estrategia planteada, sólo ha mostrado su utilidad en la prevención de recurrencia por la baja adherencia que se logra en la población general no sensibilizada con la patología y por el gran porcentaje de embarazos no planificados.

Es por esto que muchos expertos creen que la prevención primaria sólo es posible a través de la fortificación de alimentos de consumo masivo. La fortificación de alimentos ofrece la ventaja de cubrir una gran población a un bajo costo, sin requerir cambios de la conducta alimentaria de la población. En 1996, la FDA (Food and Drug Administration) en Estados Unidos determinó que todos los cereales deberían ser enriquecidos con ácido fólico y desde enero de 1998 es obligatoria la fortificación de la harina de panificación que se consume en Estados Unidos. El nivel de fortificación exigido es de 140 µg de ácido fólico por cada 100 g de harina, aun cuando en la actualidad estas cifras están en discusión y se están planteando niveles de fortificación cercanos a 300 µg de ácido fólico por cada 100 g de harina, puesto que con los niveles elegidos no se ha logrado una protección adecuada. Las primeras publicaciones mostraron que con la fortificación en Estados Unidos se logró una reducción del 19% de los DTN (28). Sin embargo, publicaciones posteriores de Estados Unidos y Canadá han mostrado niveles mayores de reducción (29, 31). Esta es la primera vez que se utiliza la fortificación de alimentos como una forma de prevenir una malformación congénita.

Las características de la población chilena han permitido determinar que la mejor forma de aumentar el consumo de ácido fólico en las mujeres en edad fértil es a través de la fortificación de alimentos de consumo masivo. El alto consumo de pan de la población chilena hizo elegir la harina de trigo como el alimento a fortificar; esta fortificación es obligatoria desde el 1º de enero del 2000. Los niveles de fortificación elegidos fueron de 220 µg de ácido fólico por cada 100 g de harina (32- 34).

El mecanismo biológico subyacente a través del cual el ácido fólico disminuye la incidencia de los DTN aún es desconocido. El ácido fólico participa en la síntesis de ADN y por lo tanto es esencial para la división celular rápida que ocurre durante el desarrollo fetal precoz. También juega un rol importante en la metilación y de esta forma en la regulación génica. Existe en la actualidad mucho interés en dilucidar el papel que juegan las mutaciones de los genes que codifican las enzimas involucradas en el metabolismo del ácido fólico, así como el rol de agentes como la vitamina B12, metionina y homocisteína. Las alteraciones moleculares que serían factores de riesgo de DTN hasta ahora identificadas son: alteraciones del receptor α del ácido fólico; polimorfismos de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), específicamente C677T y A1298C; mutaciones de la cistación sintetasa; y mutaciones de la metionina sintetasa. (35, 36). Aunque el mecanismo a través del cual el ácido fólico ejerce su rol protector es aún desconocido, está claro que una proporción importante de los DTN puede ser prevenida a través de su uso periconcepcional y que por lo tanto todos los esfuerzos que se deben realizar en cuanto a la prevención no deben esperar a que se diluciden los mecanismos específicos involucrados, puesto que si se determina la existencia de una anomalía metabólica genéticamente determinada que contribuye a la deficiencia de folatos, esto no restará valor al rol que cumplen los factores nutricionales. Es así como en la actualidad la recomendación es de 0.4 mg diarios de ácido fólico para la prevención de ocurrencia de los DTN y de 4 mg

diarios para la prevención de la recurrencia. Se recomienda, a toda mujer en edad fértil y con vida sexual activa, su uso periconcepcional, lo que significa al menos dos meses previo a la concepción y los tres primeros meses del embarazo.

Es importante señalar que múltiples estudios han mostrado que el uso periconcepcional de ácido fólico no sólo disminuiría la ocurrencia y recurrencia de DTN, sino que también disminuiría la frecuencia de otras malformaciones congénitas como las fisuras labiopalatinas, algunas malformaciones del tracto genitourinario y los defectos cardíacos conotruncales entre otras (37), de manera que en la actualidad también se recomienda la suplementación con dosis de 4 mg diarios de ácido fólico en aquellas mujeres que han tenido un hijo con este tipo de defectos congénitos. También hay múltiples publicaciones que muestran que el uso de ácido fólico al disminuir los niveles de homocisteína disminuye el riesgo de algunas patologías frecuentes del embarazo como preeclampsia, abruptio placentae y también mejoraría el peso de nacimiento (38).

Los resultados de la evaluación del programa de fortificación de la harina con ácido fólico en Chile, que se está realizando en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile, muestran una disminución de alrededor de 50% de los DTN desde que se implementó la fortificación el año 2000. Estos cambios ocurrieron muy precozmente luego del inicio de la intervención, siendo ya evidente el efecto a un año de implementada la medida y las tasa se han mantenido estables desde el año 2002 a la fecha. Los resultados del estudio costo efectividad de este programa muestran además una rentabilidad considerable (39).

CONCLUSIONES

El aumento progresivo y exponencial de las malformaciones congénitas como causa de morbimortalidad en el hombre, obliga a la implementación de medidas de control. Sin embargo, dada la dificultad de la manipulación del genotipo en la gran mayoría de los casos, el énfasis ha sido puesto en el desarrollo de medidas preventivas, especialmente en la prevención primaria. El cuidado de la mujer en edad fértil y de la embarazada, especialmente durante el primer trimestre del embarazo, se considera fundamental cuando se diseñan las medidas de prevención. Una de las medidas más exitosas implementada en nuestro país durante los últimos años, tiene relación con la fortificación de la harina con ácido fólico para la prevención de los defectos de cierre del tubo neural, resultados que cuentan con el reconocimiento de la comunidad médica y científica a nivel nacional e internacional.

BIBLIOGRAFÍA

1. www.minsal.cl
2. Czeizel AE. Birth defects are preventable. *Int J Med Sci.* 2005;2(3):91-2.
3. Nazer J, Aravena T, Cifuentes L. Malformaciones congénitas en Chile. Un problema emergente (período 1995-1999). *Rev Med Chile* 2001; 129(8):895-904.
4. Prescott K, Wilkie A. Genetic aspects of birth defects: new understandings of old problems. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2007; 92:308-314.
5. Brent RL. Environmental causes of human congenital malformations: the pediatrician's role in dealing with these complex clinical problems caused by a multiplicity of environmental and genetic factors. *Pediatrics.* 2004 Apr;113(4 Suppl):957-68.
6. <http://www.biologia.ufrj.br/eclamc>
7. Lorente C, Cordier S, Bergeret A, De Walle HE, Goujard J, Ayme S, Knill-Jones R, Calzolari E, Bianchi F. Maternal occupational risk factors for oral clefts. Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group. *Scand J Work Environ Health.* 2000 Apr;26(2):137-45.
8. Chevrier C, Dananche B, Bahuaud M, Nelva A, Herman C, Francannet C, Robert-Gnansia E, Cordier S. Occupational exposure to organic solvent mixtures during pregnancy and the risk of non-syndromic oral clefts. *Occup Environ Med.* 2006 Sep;63(9):617-23.
9. Chia SE, Shi LM, Chan OY, Chew SK, Foong BH. Parental occupations and other risk factors associated with nonchromosomal single, chromosomal single, and multiple birth defects: a population-based study in Singapore from 1994 to 1998. *Am J Obstet Gynecol.* 2003 Feb;188(2):425-33.
10. Lin S, Gensburg L, Marshall EG, Roth GB, Dlugosz L. Effects of maternal work activity during pregnancy on infant malformations. *J Occup Environ Med.* 1998 Sep;40(9):829-34.
11. Bianchi F, Cianciulli D, Pierini A, Seniori Constantini A. Congenital malformations and maternal occupation: a registry based case-control study. *Occup Environ Med.* 1997 Apr;54(4):223-8.
12. Clementi M, Causin R, Marzocchi C, Mantovani A, Tenconi R. A study of the impact of agricultural pesticide use on the prevalence of birth defects in northeast Italy. *Reprod Toxicol.* 2007 Jul;24(1):1-8. Epub 2007 May 3.
13. Ronda E, Regidor E, García AM, Domínguez V. Association between congenital anomalies and paternal exposure to agricultural pesticides depending on mother's employment status. *J Occup Environ Med.* 2005 Aug;47(8):826-8.
14. Ritz B, Yu F, Fruin S, Chapa G, Shaw GM, Harris JA. Ambient air pollution and risk of birth defects in Southern California. *Am J Epidemiol.* 2002 Jan 1;155(1):17-25.

15. Brent RL. The effect of embryonic and fetal exposure to x-ray, microwaves, and ultrasound: counseling the pregnant and nonpregnant patient about these risks. *Semin Oncol.* 1989 Oct;16(5):347-68.
16. De Jong van den Berg LT, Feenstra N, Sorensen HT, Cornel MC. Improvement of drug exposure data in a registration of congenital anomalies. Pilot-study: pharmacist and mother as sources for drug exposure data during pregnancy. EuroMAP Group. European Medicine and Pregnancy Group. *Teratology.* 1999 Jul;60(1):33-6.
17. Krapels IP, van Rooij IA, Ocke MC, West CE, van der Horst CM, Steegers-Theunissen RP. Maternal nutritional status and the risk for orofacial cleft offspring in humans. *J Nutr.* 2004 Nov;134(11):3106-13.
18. Reiff-Eldridge R, Heffner CR, Ephross SA, Tennis PS, White AD, Andrews EB. Monitoring pregnancy outcomes after prenatal drug exposure through prospective pregnancy registries: a pharmaceutical company commitment. *Am J Obstet Gynecol.* 2000 Jan;182(1 Pt 1):159-63.
19. Stegmann BJ, Carey JC. TORCH Infections. Toxoplasmosis, Other (syphilis, varicella-zoster, parvovirus B19), Rubella, Cytomegalovirus (CMV), and Herpes infections. *Curr Womens Health Rep.* 2002 Aug;2(4):253-8.
20. Ordoñez MP, Nazer J, Aguila A, Cifuentes L. Congenital malformations and chronic diseases of the mother. Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations (ECLAMC) 1971-1999]. *Rev Med Chil.* 2003 Apr;131(4):404-11.
21. Djahanbakhch O, Ezzati M, Zosmer A. Reproductive ageing in women. *J Pathol.* 2007 Jan;211(2):219-31.
22. Nazer J, López Camelo J, Castilla E. (2001) Estudio de 30 años de vigilancia epidemiológica de defectos de tubo neural en Chile y en Latinoamérica. *Rev Med Chile* 129: 531-539.
23. MRC Vitamin Study Research Group: Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991; 338:131-137.
24. Czeizel AE & Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects. *N Engl J Med* 1992; 327:1832-1835.
25. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Folate. In: Dietary references intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid biotin and choline. Washington DC: National Academy Press; 1998, p. 8.1-8.59.
26. Scientific Committee on Human Nutrition. Nutritional and energy intake in the European Community. Brussels: European Commission, 1993.
27. Human vitamin and mineral requirements. Report of a FAO/WHO expert consultation. Bangkok, Thailand, Rome 2002.
28. Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ, Erickson JD, Wong LY. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *JAMA.* 2001 Jun 20;285(23):2981-6
29. Williams LJ, Mai CT, Edmonds LD, Shaw GM, Kirby RS, Hobbs CA, Sever LE, Miller LA, Meaney FJ, Levitt M. Prevalence of spina bifida and anencephaly during the transition to mandatory folic acid fortification in the United States. *Teratology.* 2002 Jul;66(1):33-9.
30. Gucciardi E, Pietrusiak MA, Reynolds DL, Rouleau J. Incidence of neural tube defects in Ontario, 1986-1999. *CMAJ.* 2002 Aug 6;167(3):237-40.
31. Persad VL, Van den Hof MC, Dube JM, Zimmer P. Incidence of open neural tube defects in Nova Scotia after folic acid fortification. *CMAJ.* 2002 Aug 6;167(3):241-5.
32. Freire WB, Hertrampf E, Cortes F. Effect of folic acid fortification in Chile: preliminary results. *Eur J Pediatr Surg.* 2000 Dec;10 Suppl 1:42-3.
33. Cortes F, Mellado C, Hertrampf E, Alliende A, Castillo S. Frequency of neural tube defects in public maternity during 1999 in Santiago, Chile] *Rev Med Chil.* 2001 Mar;129(3):277-84.
34. Hertrampf E, Cortes F, Erickson JD, Cayazzo M, Freire W, Bailey LB, Howson C, Kauwell GP, Pfeiffer C. Consumption of folic acid-fortified bread improves folate status in women of reproductive age in Chile. *J Nutr.* 2003 Oct;133(10):3166-9.
35. De Marco P, Moroni A, Merello E, et al: Folate pathway gene alterations in patients with neural tube defects. *Am J Med Genet* 2000;95: 216-223.
36. Van der Put N, Van Straaten H, Trijbels F, Blom H. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp Biol Med* 2001; 226(4):243-270.
37. Bille C, Murray JC, Olsen SF. Folic acid and birth malformations. *BMJ.* 2007 Mar 3;334(7591):433-4.
38. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessing HK, Monsen AL, Ueland PM. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study. *Am J Clin Nutr.* 2000 Apr;71(4):962-8.
39. Llanos A, Hertrampf E, Cortes F, Pardo A, Grosse SD, Uauy R.. Cost-effectiveness of a folic acid fortification program in Chile. *Health Policy.* 2007; 83 (2-3):295-203.