



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

11217 34

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POST-GRADO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA

"IDENTIFICACION DEL POLIMORFISMO C677T DEL GEN DE LA 5-10 METIL TETRAHIDROFOLATO REDUCTASA EN POBLACION MEXICANA CON PERDIDA GESTACIONAL RECURRENTE"

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA



DIRECCION DE ENSEÑANZA

T E S I S
PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE :
GINECO - OBSTETRICIA
P R E S E N T A :
DR. JOSE JORGE DUENAS RIAÑO

DIRECTOR DE TESIS: DR. RICARDO GARCIA CAVAZOS
ASESORES: DR. JUAN MANUEL GALLARDO GAONA
DRA. VIRIDIANA GORBEA CHAVEZ

MEXICO, D.F.

2004

DR. J. ROBERTO AHUED AHUED
DIRECTOR GENERAL
PROFESOR TITULAR





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

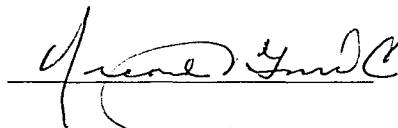
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

4

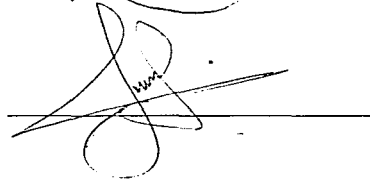
APROBACIÓN DE LA TESIS
ASESORES

Dr. Ricardo García Cavazos



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ricardo García Cavazos', written over a horizontal line.

Dr. Juan Manuel Gallardo Gaona



A highly stylized handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Dra. Viridiana Gorbea Chávez



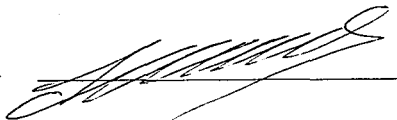
A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Viridiana Gorbea Chávez', written over a horizontal line.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3

APROBACIÓN DE LA TESIS
DIRECTIVOS

Dr. José Roberto Ahued Ahued
Profesor Titular.



INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA



DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA

RBA

Dr. Rubén Bolaños Ancona
Director de Enseñanza.

SUBDIRECCIÓN
DIVISIÓN

REGISTRO DE TESIS CON
FAMILIA DE ORIGEN

C

AGRADECIMIENTOS

La impresión final de este trabajo de investigación se debe al esfuerzo de un gran grupo de trabajo. Gracias a:

Dr. Carlos Galaviz.

Dra. Rocío López.

Dra. Verónica Rembis.

Dr. Horacio Suárez del Puerto.

QFB Guadalupe Martínez.

Enf. Clara Hernández.

Personal de Enfermería del Instituto Nacional de Perinatología.

Y un especial agradecimiento a mis asesores:

Dr. Ricardo García Cavazos.

Dr. Juan Manuel Gallardo Gaona.

Dra. Viridiana Gorvea Chávez.

TRABAJO CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIA

Esta tesis, que es el reflejo y resultado de 4 años de preparación, la dedico de todo corazón a:

Mi esposa Lizbeth, por su gran apoyo y paciencia.

Mis padres Lety y Jorge, por ser siempre quienes me permitieron volar.

Mis hermanas Cata, Ana y Kari, por su apoyo.

Mis maestros, por transmitirme su sabiduría.

Mis compañeros de generación, por todo lo que compartimos.

Mis pacientes, por entregarme toda su confianza.

Y al Instituto Nacional de Perinatología, por todo lo que ha significado para mi formación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

Introducción	1
Marco de Referencia	
Pérdida Gestacional Recurrente	2
Enzima 5, 10 metiltetrahidrofolato reductasa y el mecanismo fisiopatogénico involucrado en la pérdida gestacional recurrente	6
Relación de la mutación C677T del gen de la MTHFR y pacientes con pérdida gestacional recurrente	14
Material y Métodos	23
Resultados	32
Discusión	37
Bibliografía	43

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen patologías que generan gran frustración, tanto para el médico obstetra como para la pareja, como lo es la pérdida gestacional recurrente (PGR). Las definiciones sobre pérdida gestacional recurrente son controversiales, no existiendo un consenso internacional sobre esta.² La búsqueda de la etiología de pacientes con PGR es en la gran mayoría de los casos desalentadora. En las últimas décadas los avances en el conocimiento sobre los mecanismos involucrados en estas patologías han tenido poco avance y no es sino hasta los años 90's donde se encuentra una nueva ventana de investigación, los factores trombofílicos, entre ellos la mutación C677T del gen de la enzima 5-10 metil tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) relacionada a hiperhomocisteinemia y vasculopatía placentaria.¹⁵

La presente tesis esta diseñada con la finalidad de identificar en la población del Instituto Nacional de Perinatología con PGR temprana la presencia de la mutación C677T del gen de la MTHFR, comparado con una población de las mismas características socio-demográficas sin pérdida gestacional.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MARCO DE REFERENCIA

PÉRDIDA GESTACIONAL RECURRENTE

DEFINICIONES

La pérdida gestacional se divide en dos grandes grupos: pérdidas tempranas o abortos y tardías u óbitos. Aborto es definido como la terminación del embarazo antes de la semana 20 de gestación (a partir de la fecha de ultima menstruación " FUM ") o un peso fetal menor a 500gr.¹ La definición de aborto recurrente no ha sido bien establecida a nivel internacional, variando esta entre 2 o 3 abortos consecutivos. La definición utilizada en esta tesis será la de 2 o mas abortos consecutivos.²⁻³ El término abortadoras primarias se refiere a las pacientes con pérdidas tempranas que nunca han tenido un embarazo exitoso y abortadoras secundarias a aquellas con pérdidas tempranas que ya han tenido al menos un hijo vivo.²

EPIDEMIOLOGÍA

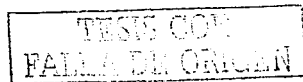
El aborto es la complicación más frecuente del embarazo, su incidencia depende de la población estudiada, se reporta del 12% al 20% de todos los embarazos entre la semana 4 y 20 de gestación, siendo estas solo la punta del iceberg de las pérdidas tempranas reproductivas totales.²⁻³ La incidencia real de la pérdida gestacional temprana esporádica va del 50% al 60% debido al alto número de pérdidas no reconocibles clínicamente que ocurren entre las semanas 2 y 4 de gestación, esto ha sido posible detectarlo por el desarrollo de estudios de alta sensibilidad para la medición de la fracción Beta de la Gonadotropina Coriónica

Humana.¹⁻³ Hablando de PGR, cuando se define como 2 o más abortos, la incidencia es del 3% de todas las parejas.³ Tomando que la frecuencia de una pérdida gestacional al azar es del 15% y si cada evento es independiente, la posibilidad de que una pareja tenga un segundo aborto es del 2.3% y un tercer aborto es del 0.3%, siendo estos valores solo cálculos estadísticos.² Existen pocos estudios en la literatura que documentan la incidencia de abortos en mujeres embarazadas sanas en una población representativa. Stirrat en 1990 da la probabilidad de un aborto de acuerdo a la historia obstétrica previa, mencionado: sin historia previa de pérdidas el riesgo es del 12.8% (12-15%), un aborto previo es de 21.3% (16-26%), dos abortos previos es de 29% (19-35%) y tres abortos previos es de 31.1% (26-37%).² Regan en 1989 reporta una incidencia de acuerdo al historial obstétrico del 20% con un aborto, de 28% con dos abortos y de 43% con tres o más abortos. Knudsen en 1991 reporta un 16% sin abortos previos, un 25% con un aborto previo, un 45% con dos abortos y un 54% con tres abortos previos.³ (Cuadro 1) En conclusión, el riesgo de presentar un aborto aumenta con el número de pérdidas previas y mujeres con historia de PGR tienen características reproductivas que las diferencia de aquellas que no presentan abortos por lo que su estudio integral dirigido es de vital importancia.

Cuadro 1 CALCULO DE RIESGO PARA PGR

Perdidas	Regan 1989	Stirrat 1990	Knudsen 1991
1	20%	21.30%	25%
2	28%	29%	45%
3	43%	31.10%	54%

Calculo de riesgo para aborto en relación al No. de abortos (historia obstétrica-reproductiva)



ETIOLOGÍA

Los factores de riesgo asociados a la PGR se basan en factores genéticos, ambientales, endocrinos, anatómicos, infecciosos, trombofílicos e inmunológicos.¹ Wounters reporta que del 24 al 60% de todos los casos de PGR quedan sin resolver, o sea de origen idiopático.³⁻⁹ La gran mayoría de los factores etiológicos continúan sin ningún avance científico en los últimos años, teniendo auge en la actualidad los aspectos trombofílicos, genéticos e inmunológicos.

Los aspectos genéticos involucrados en las pérdidas gestacionales espontáneas se pueden categorizar en alteraciones citogenéticas numéricas y estructurales con o sin mosaicismo, y alteraciones monogénicas o sea de un solo gen.⁴

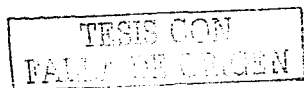
Las anomalías numéricas se subdividen en aneuploidias (trisomías o monosomías) y poliploidias. Las trisomías son las más frecuentes 52%, seguidas de las poliploidias 21% y monosomías del X 13%. Las anomalías estructurales se subdividen a su vez en deleciones, translocaciones, inversiones y duplicaciones pero sólo las translocaciones e inversiones tienen un papel en el aborto recurrente. Estas anomalías se ven en el 6% de las causas genéticas en aborto recurrente. El mosaicismo depende de la etapa en el desarrollo embrionario en el que se produce la alteración, significando esto la presencia de dos o más líneas celulares en el mismo individuo.⁴

Recientemente se han referido en la literatura la relación de polimorfismos génicos relacionados con la pérdida gestacional recurrente, como son la mutación del factor V Leiden, la mutación G20210A de la protrombina y la mutación C677T en el gen de la MTHFR.³ Las tres mutaciones relacionadas con defectos pro-trombóticos, específicamente en vasculopatía placentaria.²⁶ Este trabajo se dirige al estudio molecular del polimorfismo C677T del gene de la 5,10 MTHFR localizado en el cromosoma 1p36.3.

ENZIMA 5, 10 METILTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA Y EL PROBABLE MECANISMO FISIOPATOGÉNICO INVOLUCRADO EN LA PÉRDIDA GESTACIONAL RECURRENTE

La enzima 5-10 MTHFR juega un papel central en el ciclo de los folatos y contribuye al metabolismo de la metionina. El primer reporte de las propiedades enzimáticas de la MTHFR fue en 1970 por Kutzbach y Stokstad. La MTHFR es una flavoproteína que consiste en dos subunidades idénticas de aproximadamente 70kDa. La enzima contiene una región catalítica N-terminal. Es una enzima clave en el ciclo de los folatos y en el metabolismo de la metionina, interviniendo en la reacción de donación de grupos metilos para la conversión de homocisteína a metionina. El gene humano de la MTHFR está localizado en el cromosoma 1p36.3. La región total contiene 1,980 bp con un peso molecular de 74.6 kDa. La secuencia de aminoácidos muestra una homología en el 95% con el polipéptido de la MTHFR del ratón. La organización genómica de la MTHFR consiste en 11 exones con una longitud de 102 bp a 432 bp e intrones que van de 150 bp a 1.5kb. Se han identificado dos ARNm de 7.5 kb y 8.5kb.⁷

Las mutaciones que causan una reducción severa de la actividad de la MTHFR provocan hiperhomocisteinemia severa, siendo estas raras. Existen dos polimorfismos comunes asociados a la reducción de la actividad de la MTHFR. La primera mutación es de tipo puntual localizada en el exón 4 del sitio de unión de los folatos (C677T), convirtiendo una alanina a valina. En sujetos homocigotos la enzima se convierte en termolábil con lo cual pierde un 35% de su actividad. En sujetos sanos con genotipo homocigoto (TT) se encuentra asociado a niveles más elevados de homocisteína que en sujetos con genotipo heterocigotos (CT) o en individuos sin la mutación (CC).

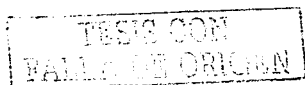


El otro polimorfismo (A1298C) se encuentra en el exón 7 cambiando una glutamina a alanina disminuyendo la función de la enzima, esta mutación se encuentra relacionada con problemas renales y defectos del tubo neural, no tiene relación con PGR.

Existe una mutación silente en el gen de la MTHFR sin efecto clínico, que es la T1317C.⁵⁻⁷

Posteriormente se demostró que la termolabilidad de la MTHFR presenta una herencia recesiva que esta presente en el 5% de la población en general y en un 17% de los pacientes con enfermedad coronaria. El cADN de la MTHFR humana fue recientemente aislado. La mutación se encontró en el 38% de la población no seleccionada en individuos canadienses. El estado homocigoto de la mutación se observó en un 12% de estos individuos y se correlacionó clínicamente con un incremento plasmático de la homocisteína. Evidencias preliminares indican que la frecuencia de la homocigocidad de la mutación C677T varía significativamente de acuerdo al área geográfica.⁶

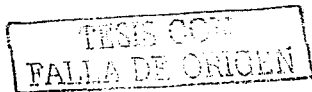
En Europa del Norte, Frosst en 1995 encontró una prevalencia de la mutación de aproximadamente del 33 al 40% en heterocigotos y 10% en homocigotos en la población caucásica.⁸ El genotipo TT esta presente en el 12% de la población en general, con frecuencias alélicas para T con variaciones como ejemplo 0.3 en americanos, 0.2 en asiáticos, 0.1 afro-americanos, 0.047 en australianos y 0.066 en africanos, 0.23 en países Bálticos.⁷ En un estudio brasileño donde buscaron la prevalencia del estado homocigoto de la mutación de la C677T de la MTHFR encontraron una distribución heterogénea entre blancos, africanos, negros



brasileños y asiáticos lo cual demuestra la diferencia racial.²⁸ En México existen dos estudios, el primero se realizó en 1999 por Mutchinick donde buscó la frecuencia de la mutación en 250 mujeres sanas de distintas áreas geográficas del país encontrando los siguientes genotipos: CC (17.6%), CT (47.6%) y TT (34.8%). La frecuencia de alelos fue para C 41.4% y para T 58.6%.³¹ El segundo se realizó en la ciudad de Guadalajara el 2000 por Dávalos donde busco en población sana la mutación de la MTHFR, utilizo 102 pacientes mestizos, 50 huicholes, 38 tarahumara y 38 purepecha; la frecuencia genotípica fue para C/C 31% (mestizos), 16% (huichol), 45% (tarahumara), 19% (purepecha), para le genotipo C/T fue del 50%, 56%, 39% y 48% respectivamente, para el genotipo T/T fue del 19%, 28%, 16% y 33% respectivamente. La frecuencia alélica para el alelo C fue del 56% (mestizos), 44% (huichol), 64% (tarahumara), 43% (purepecha) y para el alelo T fue del 44%, 56%, 36% y 57% respectivamente, mostrando diferencia entre los distintos grupos étnicos en nuestro país.³²

Por lo mencionado en los párrafos previos, se puede observar la relación directa entre las alteraciones de la enzima MTHFR y las alteraciones en los niveles séricos de la homocisteína, por lo que es importante mencionar algunas generalidades a cerca del ciclo de la metionina.⁷

La homocisteína es un aminoácido sulfurado, es parte del ciclo metabólico del aminoácido esencial metionina. La homocisteína se forma como resultado de la transformación de la metionina por la reacción de transmetilación que tiene como enzima a la metionil adenosil transferasa (MAT), a su vez la homocisteína puede tomar dos vías:

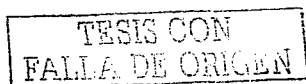


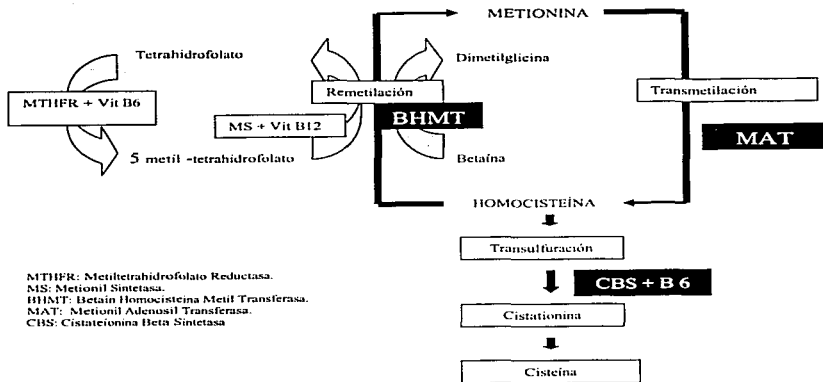
1.- La remetilación a metionina, que alrededor del 50% de la homocisteína experimenta. Es catalizada por la metionina sintetasa (MS) que utiliza como cofactor a la vitamina B12. Los residuos metilos pueden ser tomados principalmente del N-5-metil tetrahidrofolato como parte del metabolismo del ácido tetrahidrofólico y secundariamente del catabolismo de la betaína. La reacción con la N-5-metil tetrahidrofolato ocurre en todos los tejidos y requiere de la acción de la MTHFR y la presencia de vitamina B6 como cofactor.

2.- La trans sulfuración a cisteína. Esta es catalizada por la acción de la cistationina- β -sintetasa (CBS) para formar cistationina, esta reacción requiere de la presencia de piridoxina como cofactor.⁵⁻⁶

Ambas vías son coordinadas por S-adenosilmetionina (SAM), que actúa como inhibidor alostérico de la MTHFR y activador de la CBS.⁶

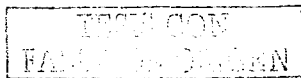
A continuación se presente un esquema para el mejor entendimiento del ciclo metabólico de la metionina, donde se encuentra involucrada la MTHFR, es importante observar que esta enzima tiene un papel primordial en la producción de metilos, como parte del ciclo de los folatos, para la conversión de homocisteína a metionina.





MTHFR: Metiltetrahidrofolato Reductasa.
 MS: Metionil Sintetasa.
 BHMT: Betain Homocisteína Metil Transferasa.
 MAT: Metionil Adenosil Transferasa.
 CBS: Cistatiónina Beta Sintetasa

Ciclo Metabólico de la Metionina y Ciclo de los Folatos



Se debe mencionar que el ciclo de la metionina necesita cofactores (vitamina B6 y B12) y sustratos como el ácido fólico para su funcionamiento normal.⁵ El impacto de la termolabilidad de la MTHFR en la concentración plasmática de la homocisteína no es claro. Sin embargo la hiperhomocisteinemia observada de manera leve ciertamente no se correlaciona con la disminución del 50% de la actividad enzimática vista in vitro con linfocitos o fibroblastos. La falta de concordancia entre la actividad enzimática y la homocisteína circulante implica que existe otro mecanismo de control de la actividad enzimática in vivo. La interrelación entre el estado vitamínico y la homocisteína plasmática fue descrita por primera vez por Kang, quien demostró una relación inversa entre la homocisteína y las concentraciones plasmáticas de folatos, existen múltiples estudios que demuestran esta relación.⁶

En un reciente estudio se demostró la interrelación entre el genotipo de la MTHFR y el estado nutricional de los folatos. Cuando las concentraciones de folato eran altas, los niveles plasmáticos de homocisteína eran bajos y no existía relación con el genotipo de la MTHFR. Sin embargo cuando la concentración de folatos era baja, los niveles plasmáticos de homocisteína eran más altos en los homocigotos de la mutación C677T que en aquellos con genotipo normal, con esto se pudo concluir que la expresión fenotípica de los genotipos de la MTHFR es dependiente de la disponibilidad de folatos.⁶

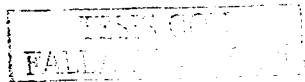
La fisiopatogénia del daño provocado por la mutación C677T del gen de la MTHFR y la hiperhomocisteinemia ha sido relacionada a daño vascular. La frecuencia y la rapidez del daño vascular observado en la hiperhomocisteinuria congénita sugieren una toxicidad de la homocisteína a los vasos sanguíneos. Estas



anormalidades se han descrito en casos de hiperhomocisteinemia leve. En 1969 McCully postuló a la hiperhomocisteinemia como responsable de aterosclerosis. Las primeras investigaciones sobre la importancia de la alteración del metabolismo de la homocisteína fueron descritas en 1976 por Wilcken relacionando esta con problemas de coronariopatías. El primer meta-análisis en 1995 involucró a 27 estudios con mas de 4000 pacientes demostrando que la homocisteína es un factor de riesgo independiente para la enfermedad arterial coronaria, posterior a este existen múltiples revisiones sobre el tema, siendo una de los más importantes el estudio Framingham. Así la homocisteína constituye un factor de riesgo vascular.⁵⁻⁶

Los mecanismos de alteración de vasos sanguíneos continúan inciertos, estudios en animales han logrado obtener algunos detalles. La hiperhomocisteinemia actúa directamente en las paredes de los vasos sanguíneos ocasionando daño endotelial. Esto provoca fibrosis vascular y alteraciones funcionales endoteliales. Las células endoteliales se vacuolizan y se descaman por lo tanto se expone la capa subendotelial a la activación de la trombogénesis. Esta lesión es diferente a la observada en la hipercolesterolemia. También se observa hiperplasia del músculo liso vascular. La lesión puede resultar directamente por la homocisteína: auto-oxidación de residuos metilo de la homocisteína liberando radicales libres (iones peróxido) capaces de alterar la estructura celular y el metabolismo.

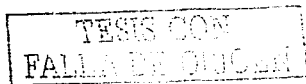
La homocisteína esta también implicada en mecanismos indirectos de toxicidad como: promoción de la oxidación de moléculas de colesterol LDL, alteraciones en el sistema de coagulación y activación plaquetaria. Adicionalmente la hiperhomocisteinemia tiene efecto trombótico: in vitro reduce la expresión de



glucosaminoglucanos que activan antitrombina III, disminuye la expresión de trombomodulina y la activación de proteína C y finalmente disminuye la expresión del receptor de la t-AP, el principal activador del sistema fibrinolítico.⁵

La inquietud de que algunas complicaciones obstétricas pueden estar relacionadas con la hiperhomocisteinemia es mucho más reciente (hace 15 años) y se desconoce todavía el valor exacto como un nuevo factor de riesgo obstétrico. La mutación C677T del gen de la MTHFR provoca la inactividad de esta enzima alterando el metabolismo de los folatos y el adecuado funcionamiento del metabolismo de la homocisteína, lo cual origina hiperhomocisteinemia.

La hiperhomocisteinemia esta asociada con problemas trombofílicos y desde el punto de vista obstétrico estos eventos se asocian a daño vascular placentario provocando entre otras, pérdidas gestacionales de repetición.⁵

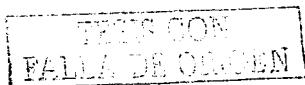


RELACIÓN DE LA MUTACIÓN C677T DEL GEN DE LA MTHFR Y PACIENTES CON PÉRDIDA GESTACIONAL RECURRENTE

Se han descrito múltiples asociaciones entre patologías obstétricas y la mutación C677T del gen de la MTHFR, así como con hiperhomocisteinemia. Entre estas patologías se pueden mencionar la enfermedad hipertensiva inducida del embarazo, desprendimiento prematuro de placenta normoinserta, defectos del tubo neural, restricción en el crecimiento intrauterino, trombosis venosa y PGR.⁵

La siguiente publicación es la primera que relacionó la hiperhomocisteinemia con PGR, esta publicación fue realizada por Wounters et al en 1993. Estudio 102 mujeres con 2 o más abortos espontáneos tempranos (< 16 SDG). 75% tenían más de 3 abortos. Se excluyeron otras causas de PGR. Utilizaron 41 pacientes sanas como grupo control. En el grupo de estudio el 21% presentó hiperhomocisteinemia. Ellos notaron que el 14% de las pacientes con pérdida gestacional recurrente primaria presentaban hiperhomocisteinemia al igual que el 33% de las pacientes con pérdidas secundarias. La principal hipótesis de la etiología del problema fue el daño prematuro de la decidua y de los vasos coriónicos, provocando una mala implantación del embrión.⁹

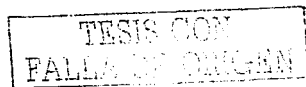
Quere et al en 1998 reportaron el caso de una paciente que presentaba óbitos entre la semana 26 y 28 de gestación y 3 pérdidas gestacionales tempranas, quien sólo como anomalía etiológica se encontró hiperhomocisteinemia y la mutación homocigota C677T del gen de la MTHFR. En su siguiente embarazo se suplementó con ácido fólico y piridoxina logrando un neonato a término. El mismo autor en un



estudio retrospectivo reportó en 100 pacientes con pérdida gestacional recurrente que el 12% presentaban hiperhomocisteinemia, sin diferencia con los controles y 20% eran homocigotos para la mutación termolábil de la MTHFR (14% grupo control). También observó que el 15% tenía niveles bajos de ácido fólico. Concluyendo que defectos del gen y alteraciones nutricionales pueden estar relacionadas con las causas de las pérdidas.¹³

En 1999 Holmes et al reportaron un estudio caso-control tratando de demostrar la importancia de la mutación C677T del gen MTHFR en la PGR, tomó 173 casos y 67 controles sanas. Los casos los dividió en 3 grupos de acuerdo a la edad de gestación en que fueron las pérdidas, todas tenían más de tres pérdidas. Todas recibían 400 µg al día de ácido fólico. La prevalencia de la mutación C677T de la MTHFR en el grupo de casos fue de 32.9% para heterocigotos y 8.1% para homocigotos, esta prevalencia no se diferencia del grupo control (p 0.194). No hubo diferencia entre la frecuencia del alelo C677T MTHFR en relación a las semanas de gestación en que se presentó la pérdida. Concluyendo que no existe ninguna relación entre la homocigocidad de la sustitución C677T del gen de la MTHFR en cuanto al incremento de las pérdidas gestacionales. Piensan que la administración de ácido fólico pudo haber silenciado la expresión fenotípica de la mutación.⁸

Lissak et al en 1999 (Israel) estudiaron a 41 pacientes con PGR menores a la semana 16 de gestación (> 2 abortos consecutivos o 3 abortos sin importar el orden). Con control de 18 mujeres sanas. Se excluyeron a todas las pacientes que tenían alguna etiología de la PGR. La frecuencia de la mutación homocigota en el grupo estudio fue de 9.7% y en el control de 22.2% y la mutación heterocigota en el grupo estudio fue de 48.8% y 38.9% en el grupo control con una p de 0.423. Se



realizó la comparación entre los resultados en dos grupos de pacientes, con embarazos anembrionicos y con pérdidas gestacionales tempranas encontrando la mutación heterocigota en el 79% de las pérdidas tempranas (p.0004) y en el 21% de los anembrionicos, la mutación homocigota se presentó en el 80% de las pérdidas tempranas y en el 20% de los anembrionicos. Concluyendo que el estado homocigoto de la mutación se asocia con mayor número de abortos que el estado heterocigoto, aunque no se alcanzó diferencia significativa.¹¹

Nelen et al en el 2000 estudiaron 123 mujeres con 2 o más pérdidas gestacionales tempranas (<16 SDG), se controlaron factores como la ingestión de suplementos vitamínicos. 12 pacientes tenían otro diagnóstico etiológico de la PGR. Se les realizó medición de prueba de tolerancia a la metionina, folatos sérico e intraeritrocitarios, cobalamina y piridoxina. El 13% de los casos eran portadoras del genotipo TT de la MTHFR comparado con 8% de los controles OR 1.7 (95% IC 0.7-4.9). El 27% de los casos presentaron hiperhomocisteinemia comparado con un 16% de los controles con un OR 2.0 (95%IC 1.0-4.0) Se realizó un ajuste en los OR y se observó mayor riesgo de PGR en pacientes que presentaban concentraciones de homocisteína en ayuno o post carga de metionina mayores a la percentil 90 o 95. Se compararon las pacientes abortadoras primarias y secundarias, observándose mayores niveles de homocisteína en ayuno y post carga de metionina en las primarias que en las secundarias. Concluyendo que si existe una relación entre la hiperhomocisteinemia y la PGR.¹⁰

En el mismo año Nelen publicó un meta-análisis, que implica la revisión en Medline de 7 años encontrando 32 artículos, reuniendo los requisitos sólo 10. Se maneja como hiperhomocisteinemia por arriba de los percentiles 95 de la

distribución normal. Concluyendo que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo para la PGR. Esto sugiere que la elevación en ayuno de la homocisteína esta más asociada con defectos en la remetilación mientras que el incremento en la concentración posterior a una carga de metionina refleja un defecto en la transulfuración. La definición de PGR varió en cada estudio. El papel de la mutación C677T del gen de la MTHFR esta menos claro. El estudio más largo encontró al genotipo MTHFR TT como riesgo para las pérdidas, sin embargo otros 5 estudios no encontraron ningún riesgo.¹²

Burke et al observaron la relación de hiperhomocisteinemia en un 12% de pérdidas gestacionales y en un 10% en muertes perinatales. Estas investigaciones muestran el hecho que la hiperhomocisteinemia puede ser responsable de muertes fetales o neonatales por múltiples mecanismos, algunos indirectos o directos.⁵

En 1999 Kutteh et al estudiaron a 50 pacientes con PGR (más de 3 abortos) y 50 controles sanas. Se realizaron múltiples medidas entre las que se incluyó PCR para la mutación C677T del gen MTHFR. Identificó en un 8% la homocigocidad de la mutación de la MTHFR y 4% con el grupo control. (OR 2.06 95IC 0.64-6.66), concluyendo que no existe un aumento en la frecuencia de esta mutación en pacientes con PGR.¹⁵

Raziel et al en el 2001 estudiaron a 36 pacientes con PGR (3 o más abortos consecutivos). 83% de los abortos fueron del primer trimestre. 16 mujeres eran abortadoras secundarias. Todas las pacientes fueron estudiadas sin encontrar causas aparentes. El grupo control fueron 40 mujeres sanas, todas de origen Judío. Se realizaron mediciones de homocisteína plasmática y la búsqueda de la mutación

C677T de la MTHFR. Se encontró hiperhomocisteinemia en 31% ($> 11\mu\text{mol/l}$), 18% de las mujeres fueron homocigotas para la mutación C677T del gen MTHFR, 59% fueron heterocigotas y 23% con genotipo normal. Los niveles mas altos de homocisteína se asociaron a pacientes con la mutación. Concluyen que existe una asociación entre la mutación, la hiperhomocisteinemia y la PGR, pero esta asociación no mostró significancia estadística, necesitando de estudios con muestras mayores.¹⁶

Unfried et al en el 2002 incluyeron 133 pacientes con PGR (mas de 3 abortos antes de la semana 20 de gestación) sin causa aparente, su grupo control consistió en 74 mujeres sin historia de abortos y 2 hijos vivos o mas. Se busco la mutación C677T de la MTHFR y se midió los niveles séricos de homocisteína. Reportaron la frecuencia de alelos, para el alelo mutado T fue de 34.6% en los casos y 21.6% en los controles y para el alelo C 65.4% para los casos y 78.4% para los controles ($p=0.007$ OR 1.9 IC95% 1.2-3.1). La frecuencia del genotipo fue para el grupo de casos 17.3% (T/T), 34.6% (C/T) y 48.1% (C/C) y para el grupo control fue de 5.4% (T/T), 32.4% (C/T) Y 62.2% (C/C) ($p=.03$, OR 3.7 IC95% 1.2-11.8). Concluyendo que portadores del alelo mutado para la MTHFR se asocian con PGR.²⁷

Como mecanismo fisiopatológico de lesión de la hiperhomocisteinemia se han descrito muchas teorías, siendo una de las más fuertes las alteraciones pro-trombóticas y el daño vascular placentario.

Los infartos placentarios, desprendimientos de placenta, PGR y preeclampsia tienen en común que el punto central de su fisiopatogenia se encuentra alterado el lecho vascular placentario. El éxito de un buen pronóstico perinatal depende de un

adecuado desarrollo placentario y una adecuada función. La perfusión placentaria se puede ver comprometida por la formación de microtrombos en esta. La hiperhomocisteinemia está relacionada como factor de riesgo para trombosis arterial y venosa por lo que se ha sugerido como un factor involucrado en pacientes con PGR. Ray en 1999 realizó una revisión de la literatura de 33 años, encontró 8 artículos que buscaban la relación entre vitamina B12, folatos, homocisteína y la mutación de la MTHFR con pacientes con PGR.

En una de las publicaciones se encontró un riesgo significativo aumentado en pacientes con PGR sin la variante homocigota de la mutación de la MTHFR comparado con el estado homocigoto o tipo salvaje. (OR 3.3 IC 1.2-9.2).¹⁷

En 1999 Sean et al demostraron en un estudio de 200 pacientes con embarazos a término sin complicaciones que la actividad enzimática de la MTHFR con la mutación C677T se encontraba disminuida en el tejido placentario, siendo el primer estudio que demuestra esta inactividad fuera del plasma.¹⁹

Khong et al en 1999 estudiaron la histopatología de la placenta en 11 mujeres con hiperhomocisteinemia, observando ausencia de los cambios vasculares fisiológicos inducidos por el trofoblasto, aterosclerosis, infartos, hematomas retroplacentarios, todas estas características son de una placentación anormal pero ninguna es específica de la hiperhomocisteinemia por lo que concluyen que no encontraron ninguna correlación.²¹

Van Der Molen et al en el 2000 estudiaron a la mutación C677T del gen de la MTHFR como factor de riesgo para vasculopatía placentaria. Se incluyeron 165 mujeres en el grupo de estudio y 139 mujeres control. Se tomaron pacientes con

vasculopatía placentaria (DPPNI y RCIU), no incluyeron PGR. Los niveles medios de homocisteína fueron mayores en el grupo de estudio que en el control ($p < .01$), 20 mujeres en el grupo de estudio tuvieron hiperhomocisteinemia comparado con 4 del grupo control. Homocigotos para la mutación se encontraron en un 12% del grupo estudio y 5% en el grupo control, con un OR 2.45 (95%IC 1-6). Concluyendo que la hiperhomocisteinemia y el estado de homocigocidad eran un factor de riesgo para vasculopatía placentaria. Las pacientes con la mutación homocigota presentaban mayores niveles de homocisteína plasmática. A pesar de no incluirse pacientes como PGR, es un dato de importancia el conocer la relación entre las alteraciones metabólicas y la vasculopatía como probable mecanismo fisiopatogenico en las PGR.¹⁸ El mismo autor publica un estudio que incluyó a 101 pacientes con historia obstétrica de vasculopatía placentaria y a 92 mujeres control sanas. Determinó la concentración de homocisteína y la frecuencia de la mutación C677T de la MTHFR. Se encontró un riesgo elevado para vasculopatía en pacientes con hiperhomocisteinemia con un OR 2.28 (95%IC 1.18-4.39) y en pacientes que presentaron la mutación con un OR 3.29 (95%IC 1.03-10.5).²²

En el 2000 Nelen et al publicaron un estudio de 19 mujeres con PGR que no tenían etiología aparente. 6 presentaron hiperhomocisteinemia y 14 en rangos normales. Se investigó la vascularización vellosa coriónica con histopatología e inmunohistoquímica en tejido de abortos espontáneos. Se realizó un perfil vascular. Concluyen que no existió diferencia entre los marcadores histopatológicos y medición de los elementos vasculares con los pacientes que presentaron hiperhomocisteinemia o concentraciones normales. Pacientes con hiperhomocisteinemia mostraron una disminución en el perímetro y área vascular media, con lo que se concluye que si existe un defecto de la vascularización vellosa coriónica en pacientes con hiperhomocisteinemia.²⁰

Foka y Murphy en el 2000 publicaron dos estudios, donde no encontraron ninguna relación entre las pacientes con PGR y la mutación C677T del gen de la MTHFR. Sin diferencia estadística significativa con sus grupos control. Ambos refieren que sí existe una relación con la mutación del Factor V de Leiden y pacientes con pérdidas gestacionales del segundo trimestre.²³⁻²⁴

En el 2001 Quere publicó un estudio interesante con 25 pacientes con hiperhomocisteinemia y genotipo homocigoto de la mutación C677T del gen MTHFR todas con más de 3 pérdidas gestacionales entre la semana 8 y 16 de gestación. Logró demostrar que la administración de ácido fólico preconcepcional y durante la gestación disminuye los niveles de homocisteína plasmáticos y mejora el pronóstico fetal.²⁵

Nelen en 1997 estudio a 185 mujeres blancas con PGR comparándolas con 113 mujeres con las mismas características socio-demográficas sin presencia de abortos. Buscó la mutación C677T, encontrando que en pacientes con PGR la prevalencia del genotipo homocigoto comparado contra los otros genotipos se observó un OR de 3.3 (IC 1.3- 10.1), lo cual relaciona a la presencia de esta mutación con un riesgo de 2 a 3 veces para presentar PGR. Mencionando que mejorando la suplementación de ácido fólico se puede reducir la incidencia de PGR.³⁰

Brenner en 1999 en Israel menciona que los polimorfismos trombofílicos son comunes en mujeres con pérdidas fetales del segundo y tercer trimestre, esto basado en el siguiente estudio. Se tomaron 76 mujeres con pérdida fetal recurrente de origen inexplicable (se incluían pérdidas de los 3 trimestres). Se tomaron 106 controles con

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

mujeres sin antecedentes de pérdida o enfermedad concomitante. Entre los polimorfismos trombofílicos se buscó la mutación C677T de la MTHFR. Se observó homocigocidad a la mutación en el 18% de los casos y 10% de los controles con un OR de 1.95 (IC 0.083-4.6 P =0.12). Al combinar polimorfismos, homocigocidad de la mutación MTHFR y homocigocidad para la mutación del Factor V de Leiden obtuvieron un OR de 3.4 (IC de 1.7 -6.1 P = 0.001) . Se observaron estas alteraciones más frecuentemente en pérdidas del segundo y tercer trimestre (P = 0.007).²⁹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIAL Y MÉTODOS

JUSTIFICACIÓN.

Pregunta del Problema

¿ Existe una mayor prevalencia de la mutación C677T del gen de la MTHFR en pacientes mexicanas con PGR temprana comparado con pacientes mexicanas sanas ?

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo General:

Determinar la mutación C677T del gen de la MTHFR en población mexicana con pérdida gestacional recurrente temprana comparado con pacientes sin patología similar asociada.

Objetivos Específicos:

- 1.- Localizar la mutación C677T del gen de la MTHFR por medio de la técnica PCR en pacientes mexicanas con PGR temprana y pacientes mexicanas sanas.
- 2.- Describir la prevalencia de la mutación C677T del gen de la MTHFR en pacientes con pérdida gestacional recurrente temprana y pacientes sanas.

Hipótesis Alterna

Existe una mayor prevalencia de la mutación C677T del gen de la MTHFR en las pacientes mexicanas con PGR temprana comparado con pacientes sanas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Hipótesis Nula

No existe una mayor prevalencia de la mutación C677T del gen de la MTHFR en las pacientes mexicanas con PGR temprana comparado con pacientes sanas

DISEÑO DEL ESTUDIO.

Tipo de Investigación: Clínica.

Tipo de Diseño: Transversal comparativo

Características del Estudio: Observacional y comparativo.

METODOLOGÍA.

Lugar y Duración: INPer de Enero 2002 a Enero 2003.

UNIVERSO

Casos: Pacientes con pérdida gestacional recurrente temprana (2 o mas abortos)

Control: Pacientes hospitalizadas puérperas sin patología de base y neonato sano.

Sin antecedente de abortos.

Unidades de Observación: Pacientes con perdida gestacional recurrente temprana

Métodos de Muestreo: No probabilístico de casos consecutivos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Casos

Pacientes mexicanas con 2 o más abortos primarios tempranos de etiología desconocida.

Control

Pacientes mexicanas sin abortos, puérperas, sin patología asociada y con recién nacido sano.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

Casos:

Pacientes con pérdida gestacional recurrente con etiología conocida.

Pacientes que no acepten el estudio.

Control:

Pacientes puérperas con recién nacido enfermo, antecedente de abortos y patología asociada.

VARIABLES DEL ESTUDIO:

Variable dependiente: Pacientes con pérdida gestacional recurrente temprana.

Variable independiente: Mutación C677T del gen de la MTHFR

Variable Cualitativa Dicotómica

Nivel de Medición: ausente o presente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS:

La mutación se buscó en sangre periférica de la siguiente forma:

1.- Se tomó una muestra de sangre (5ml) y se colocó en un tubo Vacutainer con EDTA.

2.- Se extrajo su ácido desoxirribonucleico (ADN) y se realizó PCR-RFLP para determinar la presencia de las mutaciones C677T mediante la digestión con enzimas de restricción *Inf* del producto de PCR de 234 bp. Los individuos heterocigotos (CT) muestran tres fragmentos (234 bp, 181 bp y 53 bp), mientras que los individuos homocigotos para el alelo mutante (TT) sólo muestran dos fragmentos (81bp y 53 bp). Los individuos silvestres (CC) presentan sólo los productos de PCR de 234 bp.

Iniciadores de PCR para la mutación C677T

677FWD 5'- GCA GGG AGC TTT GAG GCT GAC -3'

677RVS 5'- AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG -3'

Las condiciones de reacción para el PCR fueron de 50 ng de cada iniciador 02mM de los desoxinucleótidos, 1x de amortiguador de reacción, 1 mM de MgCl₂, 5% (v/v) de DMSO, 0.5 U de Taq DNA Pol, 1 de agua desionizada c.b.p. 50 µL

El programa de temperatura fue: 2 minutos a 96°C (desnaturalización del ADN); y 35 ciclos con las siguientes características: 1 minuto 92°C, 30 seg. 58°C, 30 seg. 72°C y 7 minutos 72°C.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El producto de PCR se identificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Posteriormente se tomaron 15 μ L del producto PCR para la digestión con la enzima de restricción y se agregaron 2 u de HinfI en buffer de reacción incubado 2 horas a 37°C. Finalmente se analizó el patrón de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa al 4%. El marcador de peso molecular a utilizar será el plásmido pUC 18 cortado con HaellI.



Imagen en gel de agarosa donde se indican las bandas que reflejan los pares de bases asociadas a la forma homocigota silvestre (CC), heterocigota (CT) y homocigota con mutación (TT).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Aspectos Éticos: Carta de Consentimiento para la toma de muestra sanguínea.

TEXTO INFORMATIVO

Estimada Señora:

Queremos informarle que la Subdirección de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología está llevando a cabo un estudio sobre la búsqueda de la mutación de un gen que se encuentra relacionado con las pacientes que presentan múltiples abortos.

El objetivo del estudio es reunir a todas las pacientes que han presentado más de dos abortos sin haber logrado tener un hijo vivo. A estas pacientes se buscará la mutación de un gen que se ha visto relacionado con esta enfermedad. Siendo la finalidad buscar alternativas de tratamiento para lograr ayudar a estas parejas.

El estudio consiste:

- 1.- Reunir pacientes que han presentado dos o más abortos sin causa aparente.
- 2.- Se citan para la toma de 10ml de sangre de una vena del brazo, la cual se realiza con material totalmente estéril y por personal capacitado.
- 3.- Se extrae el ácido desoxirribonucleico para la búsqueda de la mutación.
- 4.- Se informa a la paciente el resultado.

Su participación en este estudio ofrece el beneficio de la búsqueda de una probable causa más de sus abortos. Esto permitiendo abrir una puerta más para su tratamiento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Queremos aprovechar la oportunidad para invitarle a usted a participar en este estudio, aclarándole que en caso que no acepte participar, esta negativa no tendrá ninguna repercusión en la atención de usted o en el Instituto; además de que puede retirar su aceptación a participar en el momento que usted lo desee sin que esto repercuta en su atención.

La información obtenida del estudio será estrictamente confidencial, estos solo utilizados para fines de la investigación.

Las preguntas que considere necesarias para aclarar todas sus dudas, se pueden realizar con el Dr. José Jorge Dueñas Riaño o con el Dr. Ricardo García Cavazos en el departamento de la subdirección de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL
ESTUDIO

Yo

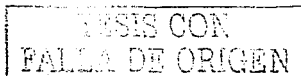
(Nombre del Participante)

Declaro libremente que he leído la información correspondiente, que se me han aclarado todas mis dudas y que voluntariamente estoy de acuerdo en participar en la investigación " IDENTIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO C677T DEL GEN DE LA METIL TETRAHIDROFOLATO REDUCTASA EN PACIENTES MEXICANAS CON PERDIDA GESTACIONAL RECURRENTE, cuyo objetivo, procedimientos, beneficios y riesgos se me han explicado previamente.

Es de mi conocimiento que los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta que al momento de firmar la presente no hubiese expresado o que me surja en el desarrollo de la investigación.

Se me ha manifestado que puedo retirar el consentimiento de participar en cualquier momento sin que ello signifique que la atención médica que se me brinde sea modificada. Además que mi participación no repercutirá en el costo de mi atención médica.

Para los fines que se estime conveniente, firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos más.



México D.F. a ____ de _____ del 200 ____

Participante _____

Investigador _____

Testigo _____

Testigo _____

RESULTADOS

Se reunieron 53 pacientes con PGR temprana, a quienes se les realizó el protocolo de estudio de la clínica de riesgo pregestacional que constó de cariotipo, anticuerpos anticardiolipina, anticoagulante lúpico, ultrasonido ginecológico, prueba de dilatadores, glucemia sérica, pruebas de funcionamiento tiroideo, perfil de TORCH, chlamydia, mycoplasma y ureaplasma; siendo todos estos resultados negativos por lo que se clasificaron como de etiología desconocida. Todas las pacientes son mexicanas, de la misma clase social con edad promedio de 29.6 años (rango 20-36) (Figura 1). El número total de abortos fue de 184, los cuales todos fueron del primer trimestre, el promedio de abortos fue de 3.47 (rango 2-12) (Figura 2). Los controles fueron 53 pacientes sin patología de base, con por lo menos un hijo vivo y sano y sin ningún aborto, todas de origen mexicano, de la misma clase social y con edad promedio de 30.3 años (rango 16-42) (Figura 1). El número total de embarazos (neonatos vivos y sanos) fue de 109, siendo el promedio de 2.05 (rango 1-5) (Tabla 2).

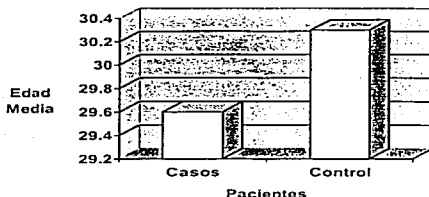


Figura 1
Relación de las pacientes con PGR y los controles en cuanto a la edad promedio.

La frecuencia de genotipos de la MTHFR en las pacientes con PGR que se obtuvo con el genotipo C/C (sin la mutación o silvestre) es del 28.31%, con el genotipo C/T (heterocigoto) es del 33.96% y con el genotipo T/T (homocigoto) es del 37.73%. Para las pacientes control la frecuencia del genotipo C/C es del 24.52%, con el genotipo C/T es del 54.73% y con el genotipo T/T es del 20.75% (Tabla 1.)

La frecuencia alélica de la MTHFR en las pacientes con PGR fue para el alelo C (silvestre) del 45.28%, y para el alelo T (mutado) del 54.72%. Para las pacientes control la frecuencia alélica para el alelo C es del 51.86% y para el alelo T es del 48.11%. (Tabla 1.)

La tabla 1 muestra la relación del número de pacientes tanto de PGR como las pacientes control de acuerdo al genotipo y los alelos de la mutación C667T de la MTHFR.

MTHFR Genotipo	No. PGR	%	No. CONTROLES	%
C/C	15	28.31	13	24.52
C/T	18	33.96	29	54.73
T/T	20	37.73	11	20.75
Total	53	100	53	100
Alelos				
C	48	45.28	55	51.86
T	58	54.72	51	48.12
Total	106	100	106	100

Tabla 1.
Relación del genotipo y frecuencia alélica de acuerdo a las pacientes con PGR y control

El promedio de números de abortos de pacientes con PGR de acuerdo al genotipo de la MTHFR se observa en la figura 2.

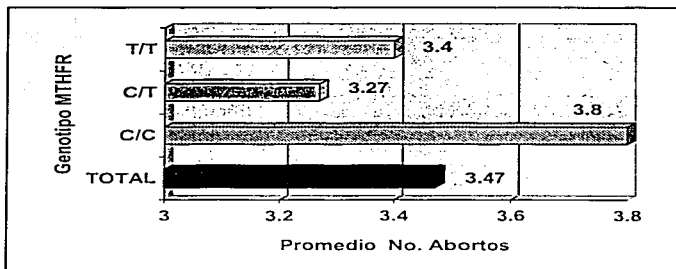


Figura 2.
Relación entre el promedio de abortos con el genotipo de la mutación de la MTHFR

La figura 3 muestra la distribución del genotipo de la mutación de la MTHFR de acuerdo al número de abortos:

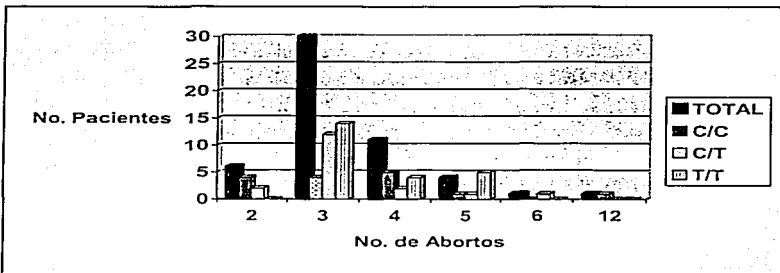


Figura 3.
Relación de acuerdo al número de abortos con el genotipo de la MTHFR

La distribución del porcentaje de abortos de acuerdo al genotipo de la mutación de la MTHFR se observa en la figura 4.

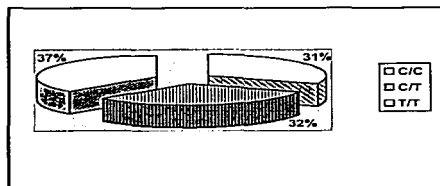


Figura 4.
Distribución del número total de abortos de acuerdo al genotipo de la MTHFR.

En la tabla 2 se muestra la relación de los promedio de los embarazos de las pacientes con PGR y los controles de acuerdo al genotipo de la mutación C667T de la MTHFR

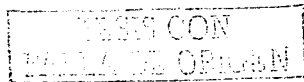
GENOTIPO MTHFR	PGR	CONTROLES
	No. Embarazos	No. Embarazos
Total	3.47 (2-12)	2.05 (1-5)
C/C	3.8 (2-12)	2.3 (1-5)
C/T	3.27 (2-6)	1.9 (1-4)
T/T	3.34 (3-5)	2.09 (1-4)

Tabla 2.
Relación del promedio de embarazos en pacientes con PGR y controles de acuerdo al genotipo de la MTHFR

DISCUSIÓN

En los últimos años las mutaciones que involucran al gen de la MTHFR y por lo tanto al metabolismo del ácido fólico han tomado mucho auge. La mutación mas estudiada es la C677T, la cual ha sido asociada claramente con defectos del tubo neural y cardiopatías⁷. En cuanto a la mutación de este gen y su asociación con pérdida gestacional recurrente la primera publicación se realizó en 1993 por Wounters⁹, teniendo a partir de esta fecha un crecimiento importante el numero investigaciones en todo el mundo que involucran este tema, siendo el principal autor Nelen y su equipo en Holanda con múltiples publicaciones. Esta bien establecido que la prevalencia normal de la mutación en personas sanas tiene una variación importante de acuerdo al área geográfica, en nuestro país no existe ninguna estudio grande que cuente con la prevalencia normal de esta mutación⁷⁻²⁸.

En la literatura solo existen 3 estudios que involucran a población mexicana, 2 estudios en relación a la mutación C667T de la MTHFR y defectos del tubo neural y un estudio que relaciona la mutación C677T de la MTHFR y la preeclampsia. Los tres estudios realizados en nuestro país tienen datos valiosos ya que cuentan con la monitorización de pacientes sanos. El primero realizado por Mutchinick reúne una muestra de pacientes sanos (250) de toda la republica mexicana, el segundo realizado por Dávalos reúne pacientes sanos (102) de la región de Guadalajara incluyendo a grupos indígenas y el tercer estudio realizado por Perales en Nuevo León incluye a 15 pacientes sanas.³¹⁻³²⁻³³ No esta descrito ningún estudio en población mexicana que busque la relación entre la mutación C677T de la MTHFR y pacientes con pérdida gestacional recurrente por lo que este estudio es el primero.



En nuestro estudio encontramos la presencia del genotipo T/T para la MTHFR en pacientes con PGR en un 37.73%, comparado con estudios realizados por Nelen con un 16%, Lissak con un 9.7% y Unfried con un 17.3%, se puede observar que nuestra frecuencia es mas alta que en la literatura mundial; en el siguiente cuadro se mencionan algunos resultados de los estudios más importantes comparados con nuestros resultados¹¹⁻²⁷⁻³⁰.

Genotipo MTHFR	Nelen 1997		Lissak 1999		Unfried 2002		Nosotros 2003	
	Casos n= 185	Control n=113	Casos n=41	Control n=18	Casos n=133	Control n=74	Casos N=53	Control n=53
C/C	42%	42%	41.50%	38.90%	48.10%	5.40%	28.31%	24.52%
C/T	43%	52%	48.80%	38.90%	34.60%	32.40%	33.96%	54.73%
T/T	16%	5%	9.70%	22.20%	17.30%	62.20%	37.75%	20.75%

TESIS CON
 FALLA DE CUCLEN

ESTA TESIS NO SALE
 DE LA BIBLIOTECA

La frecuencia alélica solo esta reportada en el estudio de Unfried siendo en nuestro estudio en pacientes con PGR para el alelo T (mutado) del 54.71% y en el estudio de Unfried de 34.6% mostrando la misma frecuencia alta que en los resultados del genotipo²⁷. En el siguiente cuadro se muestran la comparación de resultados del estudio de Unfried y el nuestro en comparación con la frecuencia alélica.

Frecuencia Alelica	Unfried 2002		Nosotros 2003	
	Casos n=133	Control n=74	Casos n=53	Control n=53
C	65.40%	78.40%	45.28%	51.88%
T	34.60%	21.60%	54.72%	48.12%

Al comparar nuestros resultados de las pacientes con PGR y las pacientes control, existe una diferencia porcentual de 17 puntos entre ambos grupos, al igual que existe una diferencia de 7 puntos en la frecuencia alélica entre los grupos, lo cual sugiere una tendencia entre la presencia de la mutación de la MTHFR y la PGR, por lo que se necesitara de un estudio con muestras mayores.

Al no existir un estudio grande que busque la prevalencia normal de la mutación C677T de la MTHFR en México, realizamos el análisis de todos los pacientes controles utilizados en los distintos estudios incluyendo el nuestro, aunque no tienen los mismos criterios de inclusión en general son personas sin enfermedad de base y son de distintas áreas del país.

MTHFR Genotipo	Mutchinick 1999 n=250	Dávalos 2000 n=102	Perales 2001 n=15	Nosotros 2003 n=53
C/C	17.60%	31%	53.30%	24.52%
C/T	47.60%	50%	26.60%	54.73
T/T	34.80%	19%	20%	20.75%
Alelos				
C	41.40%	56%	ND	51.88%
T	58.60%	44%	ND	48.12%

ND= no datos

El dato interesante comparado con los resultados de la literatura mundial es que la prevalencia normal, en personas sanas, mas alta del genotipo T/T reportada es en la población asiática con un 20% y la mas baja en un 0% en negros africanos, teniendo como promedio 12% de la población en general⁷⁻²⁸. En la población mexicana obteniendo el promedio de los 4 resultados mostrados en la tabla de arriba es del 23.63% siendo esta la prevalencia más alta de las reportadas en todo el mundo³¹⁻³²⁻³³.

Al igual que el genotipo T/T la frecuencia alélica para T más alta reportada en la población mundial es en la comunidad asiática con un 40% y las mas baja en un 4.7% en los australianos⁷⁻²⁸. En la población mexicana promediando los datos de 3 estudios es del 50.2% siendo también la más alta de las reportadas en todo el mundo³¹⁻³²⁻³³.

En conclusión este es el primer estudio en población mexicana que busca la asociación de la mutación C677T de la MTHFR en pacientes con PGR. Nuestro estudio mostró una diferencia de proporción entre la presencia del genotipo T/T de la mutación de la MTHFR entre ambos grupos, requiriendo de una muestra mayor para poder realizar una asociación. La presencia del genotipo T/T y la frecuencia alelica para T en paciente con PGR comparando nuestros resultados con los de la literatura mundial muestran prevalencias mucho más altas. La prevalencia normal de un grupo de mexicanos sanos del genotipo T/T y la frecuencia alelica T comparados con los valores de la literatura mundial, también son los más altos, lo cual demuestra que México es una zona endémica para la mutación. Estos resultados nos hacen pensar que la mutación de la C677T de la MTHFR, la hiperhomocisteinemia y los problemas del metabolismo del ácido fólico asociados a distintas patologías obstétricas son un problema de salud en nuestro país.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.- Speroff L. Recurrent Early Pregnancy Losses. En: Speroff L. Glass R. Kase N. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. Sixth Edition Ed. Lippincott Williams and Wilkins 1999. p 1043-1056.
- 2.- Hatasaka H. Recurrent Miscarriage: Epidemiologic Factors, Definitions and Incidence. Clin Obstet Gynecol 1994;37(3):625-634.
- 3.- Regan L. Rai R. Epidemiology and the Medical Causes of Miscarriage. Baillieres Clin Obstet Gynecol 2000;14(5):839-854.
- 4.- Goddijn M. Leschot N. Genetic Aspects of Miscarriage. . Baillieres Clin Obstet Gynecol 2000;14(5):855-865.
- 5.- Aubard Y. Darodes N. Cantaloube M. Hiperhomocisteinemia and Pregnancy: Review of Our Present Understanding and Therapeutic Implications. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2000;93:157-65 .
- 6.- Selhub J. Homocysteine Metabolism. Annu Rev Nutr 1999;19:217-46.
- 7.- Fodinger M. Walter H. Sunder G. Molecular Biology of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductasa. J Nephrol 2000;13:20-33.
- 8.- Holmes Z. Regan L. Chilcott I. Cohen H. The C677T MTHFR gene mutation is not predictive of risk for recurrent fetal loss. Br J Haematol 1999;105(1):98-101.
- 9.- Wouters M. Boers G. Blom H. Trijbels F. Thomas C. Borm G. Hyperhomocysteinemia: a Risk Factor in Women with Unexplained Recurrent Early Pregnancy Loss. Fétil Steril 1993;60:820-5.
- 10.- Nelen W. Blom H. Steegers E. Thomas C. Homocysteine and Folate Levels as Risk Factors for Recurrente Early Pregnancy Loss. Obstet Gynecol 2000;95:519-24.
- 11.- Lissak A: Sharon A. Fruchter O. Kassel A. Sanderovits J. Polymorphism for Mutation of Cytosine to Thyamine at Location 677 in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene is Associated with Recurrent Early Fetal Loss. Am J Obstet Gynecol 1999;181(1):1200-5.

- 12.- Nelen W. Blom H. Steegers E. Heijer M. Esker T. Hyperhomocysteinemia and Recurrent Early Pregnancy Loss: a Meta-analysis. *Fertil Steril* 2000;74(6):1186-1199.
- 13.- Quere I. Bellet H. Hoffet M. Janbon C. Mares P. A Woman with Five Consecutive Fetal Deaths: Case Report and Retrospective Analysis of Hyperhomocysteinemia Prevalence in 100 Consecutive Women with Recurrent Miscarriages. *Fertil Steril* 1998;69:152-4.
- 14.- Coumans A. Huijgens P. Jakobs C. Schats R. Vries J. Dekker G. Haemostatic and Metabolic Abnormalities in Women with Unexplained Recurrent Abortion. *Hum Reprod* 1999;14:211-4.
- 15.- Kutteh W. Vicki M. Steven D. Hypercoagulable State Mutation Analysis in with Early First-Trimester Recurrent Pregnancy Loss. *Fertil Steril* 1999;71(6):1048-53.
- 16.- Razieli A. Kornberg Y. Friedler S. Schachter M. Sela A. Ron E. Hypercoagulable Thrombophilic Defects and Hyperhomocysteinemia in Patients with Recurrent Pregnancy Loss. *Am J Repr Immunol* 2001;45:65-71.
- 17.- Ray G. Laskin C. Folic Acid and Homocysteine Metabolic Defects and the Risk of Placental Abruption, Preeclampsia and Spontaneous Pregnancy Loss: A systematic Review. *Placenta* 1999;20:519-529.
- 18.- Van der Molen E. Arends G. Nelen W. Heil S. Blom H. A Common Mutation in the 5-10 Methylene-tetrahydrofolate Reductase Gene as a New Risk Factor for Placental Vasculopathy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183(5):1210-5.
- 19.- Sean F. Molloy A. Mills J. Lee J. Cnley M. Kirke N. Scott J et al The Influence of 5,10 Methylene-tetrahydrofolate Reductase Genotypes on Enzyme Activity in Placental Tissue. *Br J Obstet Gynecol* 1999;106:1214-8.
- 20.- Nelen W. Bulten J. Steegers E. Blom H. Eskes T. Maternal Homocysteine and Chorionic Vascularization in Recurrent Early Pregnancy Loss. *Hum Reprod* 2000;15(4):954-60.

- 21.- Khong T. Hague W. The Placenta in Maternal Hiperhomocysteinemia. Br J Obstet Gynecol 1999;106:273-8.
- 22.- Van Der Molen E. Verbruggen B. Novakova I. Blom H. Hiperhomocysteinemia and Other Thrombotic Risk Factors in Women with Placental Vasculopathy. Br J Obstet Gynecol 2000;107:785-791.
- 23.- Foka Z. Lambropoulos A. Saravelos H. Karas G. Karavida A. Et al Factor V Leiden and Prothombin G20210A Mutations, But no Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T, Are associated with Recurrent Miscarriages. Hum Reprod 2000;15(2):458-62.
- 24.- Murphy R. Donoghue C. Nallen R. D Mello M. Fitzgerald D. Propective Evaluation of the Risk Conferred by Factor V Leiden and Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms in Pregnancy. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20(1):266-70.
- 25.- Quere I. Mercier E. Bellet H. Janbon C. Mares P. Vitamin supplementation and pregnancy outcome in women with recurrent early pregnancy loss and hiperhomocysteinemia. Fertil Steril 2001;75(4):823-5.
- 26.- Cunningham F. Et al. Disease and Injuries of the Fetus and Newborn. En: Cunningham F. Gant N. Leveno K. Gilstrap L. Haunt J. Williams Obstetrics 21sd Edition Ed. Mc Graw Hill 2001 p 1073-8.
- 27.- Unfried G. Griesmacher A. Weismuller W. Nagele F. Huber J. Tempfer C. The C677T Polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Idiopathic Recurrent Miscarriage. Obstet Gynecol 2002;99:614-9.
- 28.- Franco F. Araujo G. Guerreiro F. Elion J. Zago A. Análisis of the 677 C T Mutation of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene in Diferente Ethnic Group . Thromb Haemost 1998;79:119-21.
- 29.- Brenner B. Sarig G. Winer Z. Younis J. Blemenfeld Z. Lanir N. Thrombophilic Polymorphisms Are Common in Women with Fetal Loss without Apparent Cause. Thromb Haemost 1999;82:6-9.

- 30.- Nelen W. Van del Molen E. Blom H. Heil S. Steegers E. Recurrente Early Pregnancy Loss and Genetic-Related Disturbance in Folate and Homocysteine Metabolism. BJHM 1997;58:511-3.
- 31.- Mutchinick O. Lopez M. Luna L. Waxman J. Babinsky V. High Prevalence of the Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase Variant in Mexico: A Country with a Very High Prevalence of Neural Tube Defects. Mol Genet Metab 1999;68:461-7.
- 32.- Dávalos I. Olivares N. Castillo M. Cantu J. Ibarra B. Sandoval L. Et al. The C677T Polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene in Mexican Mestizo Neural-Tube Defect Parents, Control Mestizo and Native Populations. Ann Genet 2000;43:89-92.
- 33.- Perales J. Martínez L. García-Cavazos R. Triana H. Saldivar D. Barrera H. Et al. Niveles de Ácido Fólico, Homocisteína y Polimorfismo de la Enzima Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR) en Pacientes con Preeclampsia Severa y Eclampsia. Ginec Obst Mex 2001;69:6-11.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN