

112424



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

"IDENTIFICACION DEL POLIMORFISMO C677T DEL GEN DE LA
5,10-METILENTRAHIDROFOLATO REDUCTASA EN PACIENTES CON
PREECLAMPSIA-ECLAMPSIA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN:

MEDICINA MATERNO FETAL

P R E S E N T A:

DRA. MAY MILENA FIERROS ADAME

Firma manuscrita de Dr. Mario Estanislao Guzmán Huerta.

TITULAR: DR. MARIO ESTANISLAO GUZMAN HUERTA
TUTOR: DR. RICARDO JUAN GARCIA CAVAZOS



INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

MEXICO, D.F.

2004



DIRECCION DE ENSEÑANZA



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA - INPer -

**“ULTRASONIDO DOPPLER PARA DETECCION DE ANEMIA FETAL EN
MADRES CON ISOINMUNIZACION RH: UNA REVISION SISTEMATICA”**

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALISTA EN MEDICINA MATERNO FETAL

PRESENTA:

DRA. MAY MILENA FIERROS ADAME


TITULAR: DR. MARIO ESTANISLAO GUZMÁN HUERTA


TUTOR: DR. RICARDO JUAN GARCIA CAVAZOS

MEXICO DF., 2004



SUBDIVISION DE ESPECIALIZACION
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U.N.A.M.

INDICE

ANTECEDENTES.....	4
JUSTIFICACIÓN.....	11
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	12
HIPÓTESIS.....	12
OBJETIVOS.....	12
CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	12
DESCRIPCION DE LAS VARIABLES.....	13
DISEÑO DEL ESTUDIO.....	16
TIPO DE MUESTREO.....	16
TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	16
ANALISIS ESTADISTICO.....	16
ASPECTOS ÉTICOS.....	17
DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO.....	17
RESULTADOS.....	18
CONCLUSIONES.....	20
DISCUSION.....	21
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
ANEXO 1.....	28
ANEXO 2.....	29
ANEXO 3.....	31

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: May Milena
Fierros Adams

FECHA: 04. 10. 04.

FIRMA: [Firma]

ANTECEDENTES

La preeclampsia es una importante causa de morbilidad materno fetal y neonatal. Afecta del 5 al 10% de la población embarazada. Es un desorden que sólo ocurre en el embarazo humano. La causa de esta patología aún se desconoce. Algunos autores han sugerido que puede no ser una enfermedad única sino más bien un síndrome con múltiples orígenes, lo cierto es que es impredecible, progresiva y solamente remite con la interrupción de la gestación¹.

Aunque la naturaleza exacta del evento primario causante de la preeclampsia se desconoce, en los últimos años se ha tratado de identificar los factores de riesgo en entidades cardiovasculares que pudieran formar parte del complejo multifactorial de su etiología, entre ellos la hiperhomocisteinemia, la cual ha sido extensamente estudiada e identificada como un factor de riesgo independiente para daño vasculo-endotelial (que en la preeclampsia es el órgano de choque).²

En el estudio de la preeclampsia se ha descrito evidencia morfológica del daño endotelial renal –la endoteliosis glomerular-, también se ha descrito el daño ultra estructural del lecho placentario y en los vasos uterinos adyacentes. Uno de los puntos iniciales para que se desencadenen estas alteraciones es el hecho de la presencia de una perfusión placentaria reducida, dada a su vez por una alteración en la placentación durante la segunda oleada de invasión trofoblástica. Algunos estudios epidemiológicos han descrito algunos patrones

genéticos de aparición, sin embargo no se ha podido establecer un patrón de herencia específico.³

HIPERHOMOCISTEINEMIA Y EMBARAZO.

Se ha descrito múltiples asociaciones entre patologías obstétricas y la hiperhomocisteinemia, como es la enfermedad hipertensiva del embarazo, desprendimiento prematuro de placenta normo-inserta, defectos del tubo neural, retardo en el crecimiento intrauterino, trombosis venosa, óbitos y PGR. En estos trabajos concluyen que existe una asociación significativa entre la hiperhomocisteinemia y mayor riesgo de complicaciones diversas en el embarazo incluyendo la preeclampsia.^{2, 3, 4, 5, 6, 13}

En 1997 se publicó el primer trabajo en que se relacionaba los niveles elevados de Homocisteína y Preeclampsia por el grupo del Dr. Aleksandar Rajkovic en Ohio. Este fue un estudio de trasversal, en el que se estudiaron 20 casos y 20 controles (pacientes nulíparas) en el que midieron niveles séricos de homocisteína, reportaron una media del valor de homocisteína de 8.60 ± 3.05 Mol/L en los casos mientras que en los controles reportaron una media de 4.99 ± 1.1 ($P < 0.001$), concluyendo que existía una relación significativa en mujeres nulíparas que desarrollaban preeclampsia, pero sin poder afirmar que este factor sea determinante en la etiología de la preeclampsia.⁷

MECANISMOS DE ACCIÓN PATOLÓGICA DE LA HOMOCISTEÍNA.

Los mecanismos de alteración de vasos sanguíneos continúan inciertos, en estudios en animales se ha 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 con la activación de la trombogénesis, también se observa hiperplasia del músculo liso vascular. La lesión puede resultar por acción directa de la homocisteína: la auto-oxidación de residuos metilo de la homocisteína libera 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 la anti -trombina III. Disminuye la expresión de trombomodulina y la activación de proteína C y finalmente disminuye la expresión del receptor de la t-AP, que es el principal activador del sistema fibrinolítico.^{4, 14,16}

VÍAS METABÓLICAS DE LA HOMOCISTEÍNA

La homocisteína, es un sulfuro aminoácido no formador de proteínas, cuyo metabolismo se encuentra en la intersección de dos vías metabólicas: remetilación y transulfuración, estos ciclos se llevan a cabo por una serie de procesos enzimáticos, los cuales se ilustran en la figura 1.

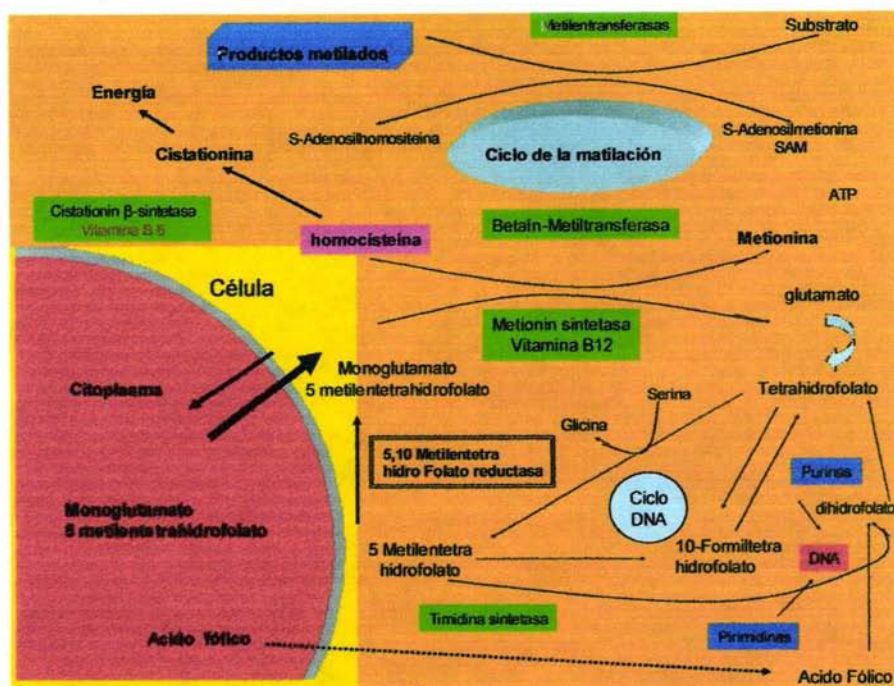


Figura 1: Principales ciclos enzimáticos relacionados con la homocisteína
PNAS/ Diciembre 18,2001/ Vol. 98/ No. 26/ 14755

PATOGENESIS DE HIPERHOMOCISTEINEMIA

La patogénesis de la hiperhomocisteinemia se debe a anomalías en las reacciones enzimáticas de la transulfuración y la remetilación del ciclo de la homocisteína. Estas anomalías las podemos dividir en dos grandes grupos:

1. Factores ambientales: Se ha mencionado que el ciclo de la homocisteína necesita cofactores (vitamina B6 y B12) y sustratos como el ácido fólico para su funcionamiento normal. Así, una reducción en la ingesta en estas vitaminas afecta el metabolismo de la homocisteína (disminuyendo su conversión a sustancias no tóxicas) y es responsable de la elevación de

los niveles de ésta. Existen causas iatrogénicas como son el consumo de fármacos que interfieren en el metabolismo de las vitaminas del grupo B, como ejemplo tenemos agentes que interfieren en el metabolismo de los folatos como el metrotexate, fenotiazidas y carbamacepina. También fármacos que interfieren en el metabolismo de la vitamina B6 como son teofilina, azarabina, tabaquismo y anticonceptivos orales. En el metabolismo de la vitamina B12 tenemos al óxido nítrico. En la insuficiencia renal los niveles de homocisteína se elevan por falla en el metabolismo de este en el riñón. También se relaciona a insuficiencia hepática, cánceres, hipotiroidismo, anemia perniciosa, psoriasis y alcoholismo crónico.⁴

2. Factores genéticos: anomalías en los genes que codifican las enzimas implicadas en el ciclo de la homocisteína:

Como ejemplo se han descrito 33 distintas mutaciones del gen de la Cistationín β -sintetasas (CBS). Estas mutaciones son autosómicas recesivas. La rara presentación homocigota (1/200,000) presenta el cuadro clínico clásico de la hiperhomocisteinuria congénita en donde hay acumulación de la homocisteína en sangre y una eliminación urinaria elevada de la homocisteína en su forma oxidada. Clínicamente se presenta como retraso mental, anomalías oculares y óseas y aterosclerosis prematura. Personas heterocigotas son mucho más frecuentes (1/70)³ y de acuerdo a Walker de 0.5% a 1.5% en la población general.¹¹ Los niveles de homocisteína de las personas heterocigotas son

esencialmente normales es su estado basal pero anormales en la prueba de carga de metionina.

Mutaciones que provoquen una reducción severa de la actividad de la 5,10 Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) e hiperhomocisteinemia severa son raras. Existen dos polimorfismos comunes asociados a la reducción de la actividad de la MTHFR.

A) Polimorfismo A1298C se encuentra en el exon 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.^{4, 6}

B) Una mutación puntual localizada en el exon 4 del sitio de unión de los folatos (C677T), convirtiendo una alanina en valina. En sujetos homocigotos la enzima se convierte en termolábil con lo cual pierde un 35% de su actividad. En los sujetos sanos con genotipo C677T, este se asocia a niveles mas elevados de homocisteína que en heterocigotos o en individuos con alelos C tipo salvaje.^{8, 9, 10, 11}

Se ha demostrado 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. Evidencias preeliminares indican que la frecuencia de la homocigidad 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.²⁰ El genotipo TT esta presente en el 12% de la población en general, 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.¹⁴ En México la prevalencia de la mutación en estado heterocigoto es del 42 % y el homocigoto es mayor al 30 %.³

Individuos con el genotipo homocigoto para C677T (T/T) de la MTHFR tienden a la deficiencia en la utilización de folatos por la termolabilidad de la enzima.

Aunque conocemos el efecto de la termolabilidad de la MTHFR en la concentración plasmática de la homocisteína, el impacto clínico de ello no es claro. En un estudio reciente se demostró la interrelación entre el genotipo de la termolabilidad de MTHFR y el estado nutricional de folatos^{8, 10, 17, 18}. 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.⁵

En mujeres no embarazadas con dos copias del alelo mutante, la deficiencia en la utilización de folatos, solo es detectables en los eritrocitos, mientras que las concentraciones plasmáticas son normales. Sin embargo mujeres embarazadas que son homocigotas para el alelo mutante T usualmente tienen concentraciones bajas de folatos en los eritrocitos y niveles bajos plasmáticos comparado con

mujeres con el genotipo de la MTHFR CC normales o CT heterocigotos y con ello pudieran relacionarse a una población con mayor frecuencia de alteraciones derivadas de la hiperhomocisteinemia, entre las que nos ocupa: LA PREECLAMPSIA.⁶

JUSTIFICACIÓN

- La preeclampsia-eclampsia es una entidad de etiología no determinada, se considera que es multifactorial, encontrar un factor genético podría ser determinante en ubicar a su vez el factor ambiental precipitante. El metabolismo del ácido fólico y la mutación C677T del gen de la enzima 5-Metilentetrahidrofolato reductasa localizados en el cromosoma 1 podrían corresponder a éste factor genético.
- Encontrar un marcador temprano de riesgo de preeclampsia permitiría la identificación de pacientes que se beneficiarían de vigilancia estrecha y de medidas de profilaxis ¹⁶. hasta ahora en la práctica clínica, la vigilancia estrecha sigue siendo la mejor manera de prevenir las complicaciones derivadas de esta enfermedad, de tal forma que aún en este contexto el predecir el riesgo de preeclampsia es importante por el hecho de seleccionar a las pacientes que deberán someterse a un cuidado prenatal más intenso.^{16, 12}

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La mutación C677T es más frecuente en las pacientes con preeclampsia-eclampsia que en aquellas pacientes que no desarrollan preeclampsia – eclampsia en el embarazo?

HIPÓTESIS

- Existe una diferencia por lo menos del 20% en la presencia de la mutación C677T entre mujeres con preeclampsia-eclampsia y mujeres que no desarrollan preeclampsia-eclampsia.

OBJETIVOS

1. Identificar la mutación C677T del gen de la enzima 5-Metiltetrahidrofolato Reductasa en pacientes con preeclampsia-eclampsia.
2. Identificar la mutación C677T del gen de la enzima 5-Metiltetrahidrofolato Reductasa en pacientes con embarazo que no desarrollan preeclampsia-eclampsia.

CRITERIOS DE SELECCIÓN.

Criterios de inclusión para los casos:

- a. Mujeres embarazadas o puérperas con diagnóstico de preeclampsia – eclampsia (por criterios Instituto Nacional de Perinatología) y resuelvan su embarazo en el Instituto Nacional de Perinatología.

- b. Pacientes que acepten participar en el estudio y firmen hoja de consentimiento informado.

Criterios de inclusión para los controles:

- a. Mujeres puérperas sin Diagnóstico, ni antecedente personal de preeclampsia al momento del parto, atendidas en el Instituto Nacional de Perinatología.
- b. Pacientes que acepten participar en el estudio y firmen hoja de consentimiento informado.

Criterios de no-inclusión para casos y controles:

- a. Pacientes con Hipertensión Arterial Sistémica, Diabetes Mellitus Pregestacional, o gestacional del embarazo actual, Enfermedades de la Colágena, Patología Renal, Antecedente de Aborto Habitual, Epilepsia con Tratamiento.

DESCRIPCION DE LAS VARIABLES

Variables en estudio:

Preeclampsia-Eclampsia.

Definición conceptual:

- A. Preeclampsia: Padecimiento que complica el embarazo mayor de 20 semanas de gestación o al puerperio (pero no más allá de 6 semanas), que se caracteriza por hipertensión arterial, proteinuria y edema y en casos severos presenta además alteraciones hematológicas, hepáticas y del sistema nervioso central. Se clasifica en 2 tipos leve y severa de

acuerdo a parámetros establecidos en base la gravedad de la proteinuria e hipertensión.

Eclampsia: Presencia de convulsiones en la paciente preecláptica.

Definición operacional: entidad clínica que afecta a la mujer embarazada caracterizada esencialmente por hipertensión proteinuria y edema:

Preeclampsia leve: después de la semana 20 aparecen 2 o más de los siguientes signos:

- ❖ Presión arterial media mayor o igual a 106 mmHg. *
- ❖ Presión diastólica mayor o igual a 90 mmHg. menor a 110 mmHg. *.
- ❖ Presión arterial sistólica mayor o igual a 140 mmHg. menor a 160 mmHg.*.
- ❖ Proteinuria mayor a 3 gr. en orina de 24 hrs. menor a 3 grs. ó 2 exámenes cualitativo con proteinuria ++ en 2 tomas separada por 6 hrs.
- ❖ Edema persistente de extremidades o cara.
- ❖ Afección renal, hepática y del SNC mínima o ausente

Preeclampsia severa:

- ❖ Presión arterial media mayor o igual a 126 mmHg. *.
- ❖ Presión diastólica mayor o igual a 110 mmHg. *.
- ❖ Presión sistólica mayor o igual a 160 mmHg. *.
- ❖ Proteinuria mayor a 3 gr. en orina de 24 hrs. ó 2 exámenes cualitativo con proteinuria +++ en 2 tomas separada por 6 hrs.

- ❖ Afección sistémica severa

*Tomas de presión arterial deben ser 2 tomas consecutivas con un intervalo de 6 hrs. y con la paciente sentada.

Eclampsia

- ❖ Presencia de convulsiones y/o coma en el curso de la preeclampsia.

Tipo de variable dependiente: dicotómica.

Nivel de medición: presente o ausente.

B. Presencia de mutación C677T del gen de la 5-MTHFR

Definición conceptual.

Mutación del gen C677T de la enzima 5-MTHFR : Cambio de la secuencia del DNA en la que se sustituye una citosina por una timina en la posición 677 que trae consigo el cambio de una alanina por una valina en el exón 4 del sitio de unión a folato del gen de la 5-MTHFR

Definición operacional de mutación C677T de la enzima 5-MTHFR: Presencia de fragmentos del gen de 181 y 53 bp. en electroforesis en gel posterior a la digestión del gen con la enzima HinfI. En estado homocigoto.

Tipo de variable independiente: dicotómica.

Nivel de medición: presente o ausente.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Transversal comparativo.

TIPO DE MUESTREO

No Probabilístico de Casos Consecutivos

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se calculó una muestra para diferencia de proporciones entre embarazadas preeclámpticas y no preeclámpticas de las mutaciones C677T del gen de la enzima 5-Metiltetrahidrofolato Reductasa del 20%, con una proporción en paciente sanas del 20% y una proporción aproximada de la mutación en pacientes preeclámpticas del 40%.¹¹

Se utilizó el estadígrafo Z con:

$$\alpha = 0.05$$

$$\beta = 0.20$$

Diferencia del 20%

Muestra de 64 pacientes por grupo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Estadística descriptiva para definir las características de la población y χ^2 para diferencia de proporciones.

ASPECTOS ÉTICOS

Consideramos que este estudio tiene un riesgo mínimo de acuerdo a sus características por requerir de toma de líquidos biológicos.

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

El grupo de estudio será conformado por las pacientes que ingresan con diagnóstico de preeclampsia-eclampsia, en el Instituto Nacional de Perinatología, que acepten mediante consentimiento informado participar en forma voluntaria, previa explicación del estudio. Posteriormente se llenará un formato para obtener datos clínicos de la paciente, se obtendrán además datos de variables consignadas en el expediente clínico. Se realizará la toma de una muestra de 3 ml sangre venosa en tubos con EDTA (anticoagulante), se deberán preservar muestras en refrigeración entre 2-8°C; el ADN se aislará a partir de células nucleadas de sangre venosa de acuerdo al protocolo del fabricante (24), Se realizarán las pruebas de integridad y pureza del material genético, así como su cuantificación mediante espectrofotometría con lecturas a 260, 280 y 320 nm. Alcanzando las condiciones óptimas para la amplificación. El material genético se preservará mediante refrigeración a 2°C para su posterior amplificación mediante PCR (27) y su digestión con enzimas HinfI para mutación C677T. Los protocolos estarán autorizados por ambos comités de enseñanza e investigación hospitalarios.

Análisis de muestras:

- El gen será amplificado mediante PCR utilizando enzima Taq.

- El gen amplificado será sometido a digestión con enzima HinfI.
- Las digestiones serán sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 2% para analizar los fragmentos obtenidos, y corroborar la presencia de la mutación así como su hetero u homocigocidad.
- (ver anexo 1).

Posteriormente se lleva a cabo El análisis de los resultados

RESULTADOS

En el periodo de recolección de muestras comprendido entre 06.08.03 al 23.04.04 se recolectó la muestra calculada, para un total de 64 casos y 64 controles consecutivos. Los casos incluyeron 33 mujeres con preeclampsia leve, 27 con preeclampsia severa y 4 con diagnóstico de eclampsia.

El promedio de edad en el grupo de casos fue de 28.12 años (± 5.13), mientras que en los controles fue de 28.65 (± 8.41), el índice de masa corporal (IMC) de los casos fue de 25.37 (± 5.13), mientras que el promedio de IMC en los controles fue de 24.61 (± 3.52). La mediana del No. de embarazos en el grupo de casos fue de 1 (rango de 1-8), mientras que en el grupo control 2 (1-6) (tabla I, II).

TABLA I.
Descripción de características epidemiológicas de los grupos en estudio.

GRUPO	EDAD*		IMC		EMBARAZOS (#)	
	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.	Mediana	Rango
Casos	27.4	± 5.13	24.43	± 5.13	1	1 - 8
Controles	28.6	± 8.41	24.64	± 3.52	2	1 - 6

*El promedio de edad y su medida de dispersión se encuentran calculados en escala decimal.

Tabla II. Descripción de No. de gestaciones por grupo de estudio

GRUPO	PROPORCIÓN DE PACIENTES		
	Primigestas	2-3 embarazos	Más de 3 embarazos
Casos	50 %	37.5 %	12.5 %
Controles	28.12 %	43.75 %	28.12 %

Entre los casos 13 pacientes habían cursado previamente con preeclampsia, no se incluyó ninguna paciente con antecedente personal de preeclampsia en el grupo control (ver criterio de inclusión), los antecedentes familiares o por parte del esposo de preeclampsia no difirieron entre los grupos de estudio y solo 3 pacientes en ambos grupos (1 en el grupo control y 2 dentro de los casos) tuvieron más de uno de este tipo de antecedente (tabla III).

Tabla III. Antecedentes familiares de preeclampsia.

GRUPO	PROPORCIÓN DE PACIENTES CON ANTECEDENTE DE PREECLAMPSIA	
	Antecedente familiar	Antecedente en familia de la pareja.
Casos	15.6 %	7.8 %
Controles	17.1 %	9.37 %

A 8 pacientes en el grupo de casos se les tomó muestra aún embarazadas, mientras que al resto del grupo y al grupo control se les tomó la muestra ya en el puerperio.

Los resultados del polimorfismo C677T de la MTHFRse presentan en las tablas IV y V.

Tabla IV. Presencia homocigocidad para el polimorfismo C677T en los grupos de estudio.

GRUPO	HOMOCIGOTOS CON POLIMORFISMO C677T	SIN HOMOCIGOCIDAD PARA EL POLIMORFISMO C677T
Controles	11 (17.2%)	53
Casos	15 (23.4%)	49
Diferencia de proporciones	6.2%	4%

Se aplicó X² para diferencia de proporciones X²=0.762, P>0.05.

Tabla V. Estado de cigocidad en la población diana.

GRUPO		CIGOSIDAD			Total
		Homocigoto con mutación	Heterocigoto	Homocigoto sin la mutación	
CASOS	Eclampsia	1	2	1	4
	Preeclampsia severa	8	14	5	27
	Preeclampsia leve	6	18	9	33
	Total	15	34	15	64
CONTROLES		11	38	15	64

La proporción de pacientes preeclámpticas (casos) con estado homocigoto de la mutación C677T 23.4% (15/64), mientras que la proporción de pacientes con la mutación C677T en el grupo control fue de 17.2% (11/64), Se aplicó X² para diferencia de proporciones, la cual fue de 0.092 (por debajo del nivel crítico), P= 0.762.

CONCLUSIONES

La diferencia de proporciones de homocigocidad para la mutación C677T entre el grupo control y los casos fue de 6.2%; la prevalencia de la homocigocidad con la mutación C677T entre los casos fue de 23.4% (15/64 pacientes), mientras que entre los controles esta fue de 17.2 (11/64 pacientes). La muestra calculada se

completo y al aplicar χ^2 para diferencia de proporciones, obtuvimos un resultado de 0.434, con un valor de $P = 0.510$; de esta manera la diferencia encontrada no fue estadísticamente significativa ($P > 0.05$).

Al observar el grupo de casos de acuerdo a la gravedad de la enfermedad hipertensiva, encontramos una proporción de pacientes con homocigocidad para la mutación C677T del 25% en las pacientes eclámpticas (1/4 pacientes), del 29.6% en el caso de las preeclámpticas severas (8/27 pacientes) y 23.1 % en las pacientes con preeclampsia leve (6/33 pacientes),

Con los datos del estudio es puede obtenerse la frecuencia alélica de la mutación C677T en la población diana (presencia del gen mutado independientemente de la cigocidad), la cual fue de 46.8% para los controles y de 50% para los casos, la cual evidentemente es muy similar en ambos grupos.

DISCUSION

Aunque la preeclampsia es una de las enfermedades obstétricas de mayor importancia a nivel mundial, y a pesar de todos los estudios sobre ella, la etiología de la misma permanece aún desconocida, sin embargo lo que si es bien conocido es que el daño endotelial está involucrado en la fisiopatología de esta enfermedad, y es el punto en el que se basan algunos estudios para establecer la relación entre hiperhomocisteinemia y preeclampsia.

Hace casi 30 años que Mc Cully reportó el caso de un niño con hiperhomocisteinemia, que presentaba lesiones arteriales y esta observación

llevó a proponer que las concentraciones elevadas de homocisteína pudieran ser responsables de enfermedad vascular oclusiva a edades tempranas.¹⁶

Ya que los niveles séricos de la homocisteína dependen entre otras cosas de la actividad de las enzimas que participan en su metabolismo (predominantemente Cistein β -sintetasa y la metilentetrahidrofolato reductasa), el pensamiento lógico es la búsqueda de asociaciones entre los defectos de estas enzimas (polimorfismos en los genes que las traducen), que nos lleven a hiperhomocisteinemia y con ello a daño endotelial y particularmente durante el embarazo a preeclampsia (efectos del estado homocigoto para mutación C677T se hacen más evidentes durante el embarazo).⁶

Se ha comentado previamente que la prevalencia de la mutación objeto de nuestro estudio tiene variaciones demográficas importantes. En México existen reportes donde se han determinado prevalencias del estado homocigoto para la mutación C677T cercanas al 20% en la población general, en nuestro estudio la prevalencia de la mutación en el grupo control fue de 17.2% (muy similar a la referida en estudios previos), la prevalencia de la mutación entre los casos fue de 23.4% (igualmente próxima a la prevalencia reportada en la población general)

En la población de nuestro estudio solo 2 pacientes fueron suplementadas de acuerdo a la Norma Mexicana sobre suplementación con ácido fólico durante el embarazo (NOM-034-SSA2-2002) y ambas pacientes presentaron preeclampsia, por lo que podemos concluir que la ingesta de folatos suplementados no fue un

factor determinante en la falta de significancia estadística de la diferencia de proporciones en nuestros resultados ($P = 0.510$).

La frecuencia alélica tampoco jugó un papel determinante en nuestros resultados, ya que la frecuencia alélica para la mutación C677T entre los casos fue del 50%, mientras que para los controles fue del 46.8%.

Llama la atención el subgrupo de pacientes con preeclampsia severa en quienes la prevalencia de homocigocidad para la mutación en cuestión (29.6% - 8/27 pacientes) es mayor que en el resto de los subgrupos. Por ello pensamos que la homocigocidad para la mutación C677T pudiera, con estudios diseñados para dicho propósito, abordarse como factor pronóstico de la gravedad de la enfermedad hipertensiva en el embarazo más que como un factor causal para la misma.

Ciertamente es necesario el estudio de otros factores implicados tanto en la etiopatogenia de la preeclampsia, como en otros trastornos relacionados con alteraciones del metabolismo de los folatos. Este trabajo forma solamente una parte de una línea de investigación sobre ácido fólico que actualmente se desarrolla en el departamento de genética y biología molecular del Instituto Nacional de Perinatología, en el que se busca realizar un estudio poblacional bioquímico y genético en el que se incluyen mediciones como homocisteína sérica, folatos eritrocitarios, determinaciones de otros polimorfismos relacionados al metabolismo del ácido fólico entre otros rubros; y que abarca múltiples patologías como defectos del tubo neural, labio y paladar hendidos, diabetes y

por supuesto preeclampsia entre muchas otras y cuyos resultados aún están en espera para realizar un análisis general de la línea de investigación completa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Redman CW. Current topic: Preeclampsia and placenta. *Placenta* 1991; 12:301 - 308.
2. Young JK, Roger AW, Jeffrey CM, et. al. Genetic susceptibility to Preeclampsia: Roles of cytosine-to-thimine substitution at nucleotide 677 of the gene for the methylenetetrahydrofolate reductase, 68-base pair insertion at nucleotide 844 of the gene for cystathionine β -synthase, and factor V Leiden mutation. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184(6): 1211-1217.
3. Perales DJ, García CR. Niveles de ac. fólico, homocisteína y polimorfismo de la enzima metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en pacientes con preeclampsia severa y eclampsia. *Ginec Obstet Mex* 2001; 69: 6 - 11.
4. Dekker GA, Devries JIP, Doelitzch PM, et. al. Underlying disorders associated with severe early onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173:1042 - 1048.
5. Powers WR, Robert WE, Alana KM, et. al. Plasma homocysteine concentration is increased in preeclampsia and is associated with evidence of endothelial activation., *Am J Obstet Gynecol*, 1998; 179: 6(1) 1605-1611.
6. Ray JG, Laskin CA. Folic acid and Homocysteine Metabolic Defects and the risk of Placental Abruption, Pre-eclampsia and Spontaneous Pregnancy Loss: A Systematic Review; *Placenta* 1999; 20: 519 - 529.

7. Rajkovic A, catalano P and Malinow R Elevated Homocysteine levels with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1997; 90: 168 - 171.
8. Selhub J M, Homocysteine metabolism, USDA Human Nutrition Research Center on Aging. *Annu. Rev. Nutr.* 1999; 19:217 - 246.
9. Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. *Journal Am Coll Cardiol* 1996; 27:517 - 527.
10. Olszowski AJ, McCylly KS. Homocysteine metabolism and the oxidative modification of proteins and lipids. *Free Rad Biol Med* 1993; 14:683 - 693
11. Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease. *The clinical Pharmacology Unit. Edit. Department of Pharmacology and Toxicology; University Of Bergen. 1st edition. 1989; p. 473 - 501.*
12. Conde-Agudelo Agudelo A, Lede R and Belizán J. Evaluation of methods used in the prediction of hypertensive disorders of pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 1994; 49: 210 - 222.
13. Els F, Guus E, Williane LDM; A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene as a new risk for placental vasculopathy; *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 182(5): 1258 - 1263.
14. Gemmati D, Previati M, Serino ML, Morateli S, et al. Low Folate levels and thermolabile methylenetetrahydro-folate reductase as primary determinant of mild hyperhomocysteinemia in normal and thromboembolic patients. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology.* 1999; 19(7): 1761 - 1769.

15. Lachmeijer A.M.A., Arngrimsson R., Bastiaans E.J. et al. Mutations in the gene for methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine levels, and vitamin status in women with a history of preeclampsia; Am J Obstet Gynecol 2001; 184: 394 - 402.
16. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia; implications for pathogenesis of atherosclerosis. Am J Pathol 1969; 56: 111- 128.

ANEXO 1

REACCION DE POLIMERASA EN CADENA.

Material:

1. Agua destilada		39 μ l
2. Buffer 10X	5 μ l	
3. dNTPs	1 μ l	
4. Oligoiniciador directo(5')	1 μ l	
5. Oligoiniciador indirecto (3')	1 μ l	
6. DNA molde	2 μ l	
7. Taq polimerasa	1 μ l	

Procedimiento:

1. Se programa el termociclador para que se realicen los siguientes pasos
 - a) Incubación inicial 94°C por 60 seg.
 - b) Naturalización 94°C por 60 seg.
 - c) Análisis 65°C por 45 seg.
 - d) Polimerización 72°C por 45 seg.
 - e) Ciclos de PCR 31
 - f) Termal Cycler MJR RTC-100.
2. Adicionar los reactivos anteriormente enumerados en el orden indicado un tubo de PCR DE 0.2ml para cada muestra.
3. Mezcle con la punta de la micropipeta y de ser necesario centrifugue un pulso para centrar la mezcla de la reacción en el fondo del tubo.
4. Coloque los tubos cerrados en el termociclador y supervise el primer ciclo.
5. corres en el gel de azarosa 1%. El gel deberá mostrar una banda de 300pb aproximadamente, correspondiente al segmento del gen en estudio.

PREPARACIÓN DEL GEL AGAROSA.

Material:

1. solución búfer TBE	50 ml.
2. Agarosa	0.50 gr.

La solución se coloca en el microondas 1.5 minutos, hasta que se disuelva y quede cristalina, colocándose la solución en un porta gel, dejándose enfriar.

ANEXO 2

Carta informativa para paciente

Estimada Señora:

En el instituto Nacional de Perinatología se llevan a cabo varios estudios de investigación, Por medio de esta carta informativa le invitamos a formar parte de un protocolo de investigación que tiene como título: "Preeclampsia-Eclampsia y su relación que existe con la mutación del gen de la 5-MTHFR". Este protocolo tiene como finalidad determinar si existe una relación entre la mutación del gen de la enzima 5 Metiltetrahidrofolato reductasa y la presentación de preeclampsia-eclampsia. Para este estudio se requiere analizar sangre de pacientes que han presentado preeclampsia-eclampsia y sangre de pacientes sanas para compararlas entre si.

De aceptar participar en el, le pediremos nos regale una pequeña muestra de sangre. Esta muestra se enviará a un laboratorio especializado localizado en la torre de investigación de este hospital, en la muestra que nos done se estudiara la presencia de algunas sustancias como: homocisteina, ácido fólico y por supuesto se estudiará el gen ya mencionado. Usted puede decidir retirarse del estudio en el momento que lo desee.

Con la toma de esta muestra de sangre no tiene ningún riesgo, solo el "piquete" con la aguja al tomar la muestra, quien tomará la muestra es una persona experta. El análisis se llevará acabo en el Instituto, sin cargo extra.

El presente protocolo de investigación clínica ha sido aceptado por la comisión científica y de ética de este Instituto. Sólo persigue fines académicos y de investigación y no de lucro.

Usted ha sido elegida para participar en este importante estudio, con su colaboración aportara un gran beneficio para el estudio y entendimiento de una de las enfermedades más graves de la mujer embarazada, de tal forma que en un futuro próximo pueda se tratada.

Su colaboración es de suma importancia.

Gracias.

TEXTO DECLARATORIO. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____

(Nombre del participante o de su representante legal)

Declaro libremente que estoy de acuerdo en participar (En que participe mi representado), en este protocolo de investigación cuyo objetivo, procedimiento, beneficios, y riesgos se especifican en la primera sección de este documento.

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

Se me ha informado que el participar en este estudio no aumentará los costos de la atención médica que se me deba brindar, y que toda información que se otorgue sobre mi (su) identidad y participación será confidencial, excepto cuando yo lo autorice y que puedo retirarme del estudio cuando lo decida.

Para los fines que se estime conveniente firmo la presente junto con el investigador que me informo, y dos testigos, conservando una copia de:

- a) Consentimiento informado
- b) Información proporcionada para obtener mi autorización.

México D.F. a _____ de _____ de 200__.

Participante _____ Firma _____

Representante _____ Firma _____

Investigador _____ Firma _____

Testigo _____ Firma _____

Testigo _____ Firma _____

ANEXO 3

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

Pacientes con Preeclampsia-Eclampsia- Controles

No. de Caso _____

DATOS GENERALES

Nombre de la Paciente: _____

Registro: _____ Edad: _____

Peso: _____ Talla: _____

IMC: _____

Cifras de TA al Diagnóstico: _____ mmHg. Proteinuria _____

Paciente: Preecláptica () Leve () Severa () Ecláptica ()

Control ()

Menarca _____ Ciclos _____ Parejas Sexuales _____ IVSA _____

Gesta _____ Para _____ Aborto _____ Cesárea _____

Óbito _____ FUM _____ FPP _____ MPF _____

Antecedentes Familiares

Preeclampsia Previa SI () NO ()

Preeclampsia Madre o Hermana(s) SI () NO ()

Antecedentes Familiares del Esposo SI () NO ()

Ingesta de ácido fólico (inicio, duración y presentación) _____

MEDICIONES

Semanas de gestación al momento de la toma: _____

(Por FUM y US antes de las 20 semanas o únicamente US si no es confiable la FUM)

Fecha de la toma: _____

Homocisteína plasmática total: _____ μ moles por litro

Ácido fólico plasmático: _____

Ácido fólico intraeritrocitario: _____

Vitamina B12: _____

Cisterna: _____

Ácido metilmalónico: _____

Defectos estructurales en el recién nacido evidentes:

Si _____ No _____ Especifique _____

Resultado: Mutación _____

Heterocigoto _____

Homocigoto _____