



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**“Análisis de polimorfismos eNOS G894T y
MTHFR C677T, asociados con preeclampsia en
población mestiza e indígena mexicanas”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARÍA DEL ROCÍO JUÁREZ VELÁZQUEZ

**ASESORES: Dra. HAYDEÉ ROSAS VARGAS
Dr. RAMÓN M. CORAL VÁZQUEZ**



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
 Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Análisis de los polimorfismos eNOS G894T y MTHFR C677T,
asociados con preeclampsia en población mestiza e
indígena mexicanas"

que presenta la pasante: María del Rocío Juárez Velázquez
 con número de cuenta: 9606533-4 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Mayo de 2004

PRESIDENTE	<u>Dra. Gilda Flores Rosales</u>	
VOCAL	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Ramón M. Coral Vázquez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Patricia Campos Peón</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC. Rosa Isela Alvarez González</u>	

Ma del Rocío Juárez Velázquez

A mis padres Lilia y Jorge

Agradecimientos

A mis padres, por la gran formación que recibí desde pequeña, por todo su amor, su confianza y su apoyo, se que este logro también es suyo.

A mis hermanos Víctor y Erín, por el ejemplo que recibí de ustedes para ser un buen estudiante, por su apoyo y por su cariño.

A mis hermanas Karina y Rosy, por su cariño y porque se que cuento con ustedes.

A mis sobrinos K. Eurídice y Jorge Arturo, por su alegría y su amor.

A José Manuel, por todo el tiempo compartido, por tu ayuda incondicional y por tanto amor, Te amo.

Al grupo de amigos que encontré durante la carrera, con su compañía todo fue mas fácil.

A Haydeé R., por enseñarme a trabajar en un laboratorio de biología molecular , por tu dedicación para lograr que este trabajo se lograra, por tu confianza y tu amistad.

A Ramón C., por tus aportaciones a este trabajo y tu amistad.

A mi familia porque siempre estuvieron al pendiente de este trabajo.

Yo lo pregunto
Yo Nezahualcóyotl lo pregunto:
¿Acaso de veras se vive con raíz en la tierra?
Nada es para siempre en la tierra:
Sólo un poco aquí.
Aunque sea de jade se quiebra,
Aunque sea de oro se rompe,
Aunque sea plumaje de quetzal se desgarrá.
No para siempre en la tierra:
Sólo un poco aquí.

Nezahualcóyotl.

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría en el Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, bajo la tutoría de la Dra. Haydeé Rosas Vargas.

Índice	<i>i</i>
Índice de tablas	<i>ii</i>
Índice de figuras	<i>iii</i>
Abreviaturas	<i>iv</i>
Resumen	<i>v</i>
1. Introducción	
1.1 Preeclampsia	
1.1.1 Definición de preeclampsia	1
1.1.2 Etiología de preeclampsia	2
1.2 Los polimorfismos genéticos y su relación con patologías	4
1.3 Sintetas de óxido nítrico	
1.3.1 Sintetas de óxido nítrico y su importancia biológica	5
1.3.2 Sintasa de óxido nítrico endotelial	9
1.3.3 Polimorfismos del gen de la óxido nítrico sintasa endotelial	10
1.4 Metilentetrahidrofolato reductasa	
1.4.1 Importancia biológica de la metilentetrahidrofolato reductasa	11
1.4.2 Polimorfismos del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa	13
2. Justificación	14
3. Objetivos	14
4. Material y Métodos	
4.1 Poblaciones de estudio	15
4.2 Extracción de DNA	16
4.3 Reacción en cadena de la polimerasa PCR	17
4.4 RFLP	17
4.5 PCR tiempo real. (TaqMan®)	18
4.6 Análisis estadístico	21
5. Resultados	
5.1 Análisis del polimorfismo Glu298Asp de la eNOS	22
5.2 Análisis del polimorfismo Ala226Val de la MTHFR	25
6. Discusión	29
7. Conclusiones	31
8. Bibliografía	32

Índice de tablas

Tabla 1.	Características de las isoformas de las sintasas de óxido nítrico humanas	6
Tabla 2.	Alteraciones vasculares y hematológicas causadas por la hiperhomocisteinemia	13
Tabla 3.	Características clínicas de mujeres mayas con preeclampsia	15
Tabla 4.	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Glu298Asp del gen de la eNOS en población mestiza e indígena maya mexicanas	23
Tabla 5.	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Glu298Asp del gen de la eNOS en mujeres mayas con embarazo normal y con preeclampsia	24
Tabla 6.	Frecuencias del polimorfismo Glu298Asp del gen de la sintasa de óxido nítrico en diferentes poblaciones	24
Tabla 7.	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Ala226Val del gen de la MTHFR en población mestiza e indígena maya mexicanas	27
Tabla 8.	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Ala226Val del gen de la MTHFR en mujeres mayas con embarazo normal y con preeclampsia	27
Tabla 9.	Frecuencia del polimorfismo Ala226Val del gen Metilentetrahidrofolato reductasa, en diferentes poblaciones	28

Índice de figuras

Figura 1.	Reacción de las enzimas sintasas de óxido nítrico (NOS)	5
Figura 2.	Uniformidad en la estructura de los dominios de las óxido nítrico sintasas	7
Figura 3.	Reacción catalizada por las óxido nítrico sintasas	7
Figura 4.	Activación de las sintasas de óxido nítrico en el endotelio	8
Figura 5.	Representación esquemática de la estructura de los dominios de la MTHFR	11
Figura 6.	Esquematzación de la participación de la MTHFR en diversas rutas metabólicas	12
Figura 7.	Sitios de reconocimiento al corte con las enzimas BanII y MboI	17
Figura 8.	Reacción de TacMan (5' exonucleasa)	19
Figura 9.	Discriminación alélica mediante el software ABI PRISM 7000 SDS®	19
Figura 10.	Electroforesis representativa del producto de PCR en gel de agarosa al 2%	22
Figura 11.	Determinación genotípica del polimorfismo Glu298Asp presente en el exón de la eNOS	22
Figura 12.	PCR tiempo real para el análisis de los polimorfismos Ala226Val del gen de la MTHFR	25
Figura 13.	Validación de las sondas utilizadas en el ensayo de TacMan	26

Abreviaturas.

A	Adenina
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ala	Alanina
ARN	Ácido ribonucleico
Asp	Aspártico
BH4	Tetrahidrobiopterina
C	Citocina
CaM	Calmodulina
cGMP	Guanilato Monofosfato cíclico
dL	Decilitro
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfato
eNOS	Sintasa de oxido nítrico endotelial
FAD	Flavina Adenina Dinucleótido
FMN	Flavina Mononucleótido
g	Gramo
G	Guanina
Glu	Glutámico
iNOS	Sintasa de oxido nítrico inducible
Kb	Kilopares de bases
KDa	Kilodalton
Met	Metionina
mg	Miligramo
µl	Micro litro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetro de mercurio
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
NAD	Nicotinamida dinucleótido
NADPH	Nicotinamida dinucleótido fosfato reducido
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nNOS	Sintasa de oxido nítrico neuronal
NO	Oxido nítrico
NOS	Sintasas de oxido nítrico
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pmol	Picomolar
Pro	Prolina
RCLB	Buffer de lisis de células rojas (por sus siglas en ingles)
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
SNP's	Polimorfismos de un solo nucleótido
T	Timina
Thr	Treonina
Val	Valina

Resumen

Análisis de los polimorfismos eNOS G894T y MTHFR C667T, asociados con preeclampsia en población mestiza e indígena mexicanas

La preeclampsia es un síndrome específico del embarazo caracterizado por hipertensión arterial, proteinuria y edema generalizado que afecta entre 4 y 6% de los embarazos en México. La etiología de este padecimiento es multifactorial; entre las posibles causas de éste se encuentran los cambios fisiológicos en la gestación, deficiencias nutricionales, alteración en la función endotelial, placentación anormal, mala adaptación inmunológica y predisposición genética. La sospecha de un origen genético para el desarrollo de la preeclampsia ha llevado a la búsqueda de mutaciones en genes involucrados con la regulación del tono vascular, por lo que se han estudiado diversos genes que pueden representar un riesgo.

Se sospecha que algunos alelos polimórficos causan diferencias en la función del gen, en la proteína resultante o en la regulación del mismo y que esto contribuye de alguna manera al desarrollo de una enfermedad. Dentro de los polimorfismos que se han asociado con diversos padecimientos se encuentran el cambio de guanina por timina de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) G894T y el cambio de citosina por timina de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) C677T, los cuales se han visto involucrados con la regulación del tono vascular por lo que se ha estudiado y comprobado su relación con patologías cardiovasculares e hipertensión arterial. Debido a que la preeclampsia se debe principalmente a un aumento en la tensión arterial, se ha propuesto el estudio de estas variantes genéticas como un posible factor de riesgo a presentar preeclampsia.

En este trabajo se analizó la frecuencia de los polimorfismos G894T de la eNOS y C677T de la MTHFR mediante RFLP's y discriminación alélica por PCR-tiempo real respectivamente; en población mestiza y maya mexicanas, así como en un grupo de riesgo (mujeres mayas con preeclampsia). Los resultados muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la población mestiza y la maya, para ambos polimorfismos. A demás se encontró que la presencia del alelo mutado para el polimorfismo G894T del gen de la sintasa de óxido nítrico endotelial es un factor de riesgo para el desarrollo de preeclampsia en mujeres mayas; por otro lado la presencia del polimorfismo C677T del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa no presenta un riesgo para el desarrollo de preeclampsia en las mujeres mayas.

1. Introducción

1.1 Preeclampsia

1.1.2 Definición de Preeclampsia

La preeclampsia es un síndrome específico del embarazo caracterizado y diagnosticado por incremento de la presión sanguínea, edema generalizado y proteinuria (Roberts y Cooper, 2001). Generalmente estos síntomas aparecen después de una edad gestacional de 20 semanas (Marja y col, 2000). En ocasiones, la mujer desarrolla cuadros convulsivos, convirtiéndose la preeclampsia en eclampsia (Marja y col, 2000).

En la mayor parte de los países la preeclampsia se considera como la principal causa aislada de muerte materna y fetal . De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, es la primera causa de mortalidad y morbilidad perinatal (Zuzpan y Schiff, 1991). La preeclampsia ocurre entre el 4-5% de todas las mujeres gestantes (Marja y col, 2000) y se ha calculado que provoca aproximadamente 50,000 muertes cada año en todo el mundo por lo que constituye un problema de salud pública principalmente en países pobres o en vías de desarrollo (Villanueva y Alanis, 2000).

De acuerdo con las tasas conocidas de la frecuencia de la preeclampsia y eclampsia en México se estima que anualmente hay de 2190 a 6570 casos. Durante 1999 las causas más frecuentes de ingreso hospitalario en mujeres de 15 a 44 años de edad fueron las complicaciones de embarazo, representando el 60% del total de ingresos de los cuales el 28% se debió a preeclampsia (Villanueva y Alanis, 2000). El 85% de las mujeres que presentan preeclampsia son primigestas, del 14 al 20% ocurre en multigestas, del 11 al 27% en embarazos gemelares, el 30% de los casos en mujeres con malformaciones uterinas y el 25 % de las mujeres con antecedentes de hipertensión arterial crónica o enfermedades vasculares (Soto, 2001).

El diagnóstico de preeclampsia basado en las recomendaciones del grupo de Trabajo Americano sobre Presión Sanguínea Elevada en el Embarazo (Lenfant y col, 1990) y el grupo de trabajo de la Sociedad Alemana de Obstetricia y Ginecología (Rath y col, 2000), considera los siguientes parámetros:

1. Incremento de la presión sanguínea sistólica de 30 mm Hg o más y/o un incremento en la presión sanguínea diastólica de 15 mm Hg o más antes de 20 semanas de gestación. Dos lecturas de 140/90 mm Hg o más en dos diferentes ocasiones con diferencia de 4 horas entre lecturas.
2. Proteinuria con una excreción de proteínas de 0.3 g o más en un espécimen de 24 horas o dos muestras de orina con una concentración de proteínas de 30 mg/dL con diferencia de 4 horas entre la recolección de muestras.
3. Presentar síntomas por primera vez después de 20 semanas de gestación a partir del último periodo menstrual y hasta 6 semanas postparto.

1.1.2 Etiología de la Preeclampsia

La preeclampsia es una patología de etiología multifactorial, por lo que ha sido difícil dilucidar cada una de las causas que ocasionan el desarrollo de este síndrome. A la fecha se han reconocido diversos factores entre los que se encuentran:

i. Cambios fisiológicos en el aparato cardiovascular

Durante el embarazo se sufren diversos cambios fisiológicos principalmente en el aparato cardiovascular (Cajiga y col, 1994). Dichos cambios incluyen un incremento en el volumen total de sangre circulante, incremento en la función cardíaca, vasodilatación generalizada y alteración en la síntesis de sustancias vasoactivas como el óxido nítrico, prostaglandinas, endotelinas y angiotensina; por lo que es necesaria una adaptación vascular que al ser deficiente conlleva al desarrollo de preeclampsia (Marja y col, 2000).

ii. Alteraciones nutricionales y metabólicas

Deficiencias nutricionales principalmente de calcio, alteraciones en los sistemas antioxidantes, mayor sensibilidad a la acción de angiotensina, o un desequilibrio en la relación prostaglandina / tromboxano, alteraciones en el metabolismo intracelular de sodio, calcio, magnesio, un estado de sobre actividad del sistema nervioso y diabetes por insuficiencia de insulina (Villanueva y Paderna, 1999).

iii. Alteración generalizada en la función endotelial

Ya que las alteraciones en la estructura y función del endotelio causan vasoconstricción y trombosis vascular, el endotelio produce lo que se conocía como factor relajante derivado de endotelio y ahora se sabe es el óxido nítrico (Alderton y col, 2001). Existen evidencias de un incremento en la síntesis de actividad del óxido nítrico en el embarazo normal, probablemente por un mecanismo mediado por estrógenos, en mujeres con preeclampsia se ha observado la inhibición en la producción de óxido nítrico (Morris y col, 1996).

iv. Placentación anormal

De manera normal, durante el primer trimestre de embarazo, las ramas terminales de las arterias uterinas (arterias espirales) son invadidas por células del citotrofoblasto. Estas células reemplazan al endotelio y a la pared vascular de las arterias espirales, transformándolas en arterias deciduales con una pared delgada y de baja resistencia (Gallery y col, 1997; Villanueva y col, 1999). Este cambio en las arterias espirales dan como consecuencia la placentación defectuosa en la que pueden participar mecanismos genéticos e inmunológicos. Al parecer en las primeras etapas del desarrollo los genes paternos son los que controlan en mayor parte el desarrollo de los tejidos placentarios, mientras que los genes maternos desempeñan un papel más importante en el desarrollo del embrión (Cajiga y col, 1994).

v. Mala adaptación inmunológica

Se ha considerado una respuesta inmunológica hacia los antígenos proporcionados por el padre como una probable causa de este síndrome debido a que la mayor parte de las mujeres que la presentan son nulíparas o sus embarazos tienen un origen paterno diferente (Marja y col, 2000).

vi. Predisposición genética

La sospecha de predisposición de origen genético para la preeclampsia ha llevado a la búsqueda de mutaciones en genes involucrados con la regulación del tono vascular, entre estos factores genéticos se han propuesto loci que estadísticamente representan un riesgo, entre los genes implicados están el gen de angiotensina cuya variante Met235Thr se ha relacionado con preeclampsia e hipertensión (Jeunemaitre y col, 1992; Wilton y col, 1995), el gen de la óxido nítrico sintasa endotelial del cromosoma 7, el cual presenta una variante Glu984Asp que se ha visto implicado en hipertensión arterial y afecciones coronarias (Amgrimsson y col, 1997),

mutación en el factor V de Leiden (1691 G-A) (Morgan *et al.*, 1999) y la hiperhomocisteinemia producida por una mutación C677T en el gen MTHFR (Sohda y col, 1997).

1.2 Los polimorfismos genéticos y su relación con patologías

Para encontrar diferencias genéticas entre individuos, se han utilizado diversas técnicas que originalmente fueron los fenotipos, posteriormente secuencias de proteínas, electroforesis de productos de PCR, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) y microsatélites. Con las nuevas tecnologías para la secuenciación del ADN y detección de diferencias en una sola base, ha surgido un nuevo término para un concepto antiguo que es el de polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs por sus siglas en inglés (single nucleotide polymorphism) (Pui-Yan Kwok, 2003).

Un polimorfismo se define como la existencia de dos o más alelos de un gen presentes en una población en una frecuencia de al menos el 1% de la población. Los polimorfismos de un solo nucleótido o SNP ocurren en el genoma humano con una frecuencia de uno de cada 1 Kb. El estudio de estas variantes en la secuencia codificante de las proteínas se inició principalmente en enzimas metabólicas (Knudsen y col, 2001). Estos cambios en la secuencia de ADN contribuyen en las características individuales, la variación fenotípica, predisposición a alguna enfermedad y la respuesta al ambiente.

Se han estudiado diversos SNPs con el fin de encontrar genes que contribuyan de diferentes maneras al desarrollo de padecimientos. Se sospecha que algunos alelos polimórficos causan diferencias en la función del gen y en la proteína resultante, o alteran la regulación del mismo y esto contribuya de alguna manera al desarrollo de una enfermedad, aunque algunos polimorfismos parecen resultar inocuos. Estos polimorfismos se han utilizado como marcadores genéticos para determinar la existencia de polimorfismos funcionales (Pui-Yan Kwok, 2003).

Dentro de los SNPs que se han asociado con diversos padecimientos se encuentran el cambio de guanina por timina de la eNOS G894T y el cambio de citosina por timina de la MTHFR C677T, los cuales se han visto involucrados con la regulación del tono vascular por lo que se ha estudiado y comprobado su relación con patologías cardiovasculares e hipertensión arterial. Debido a que la preeclampsia se debe principalmente a un aumento en la tensión arterial, se ha propuesto el estudio de estas variantes genéticas como un posible factor de riesgo a presentar preeclampsia.

1.3 Sintetas de óxido nítrico

1.3.1 Sintetas de óxido nítrico (NOS) y su importancia biológica

Las enzimas responsables de la formación de NO son conocidas como sintetas de óxido nítrico (NOS) (Philip y col., 1993) que catalizan la conversión de L-arginina a L-citrulina en presencia de oxígeno molecular. Las NOS presentan diferentes propiedades entre sí, dependiendo del tejido en donde se encuentran, lo que sugiere algún tipo de metabolismo particular, de acuerdo a la función en cada tipo de tejido.

El NO se origina a partir de la oxidación de uno de los átomos de nitrógeno terminales del aminoácido L-arginina por las NOS, teniendo a N^G-Hidroxi-L-arginina (NHA) como intermediario (Hemmens y Mayer, 1997) (fig.1).

La degradación del NO se da por la acción del anión superóxido, que es producido bajo condiciones fisiológicas como parte normal del metabolismo y puede reaccionar con otras especies reactivas de oxígeno o ser degradado por la enzima superóxido dismutasa a peróxido de hidrógeno y oxígeno.

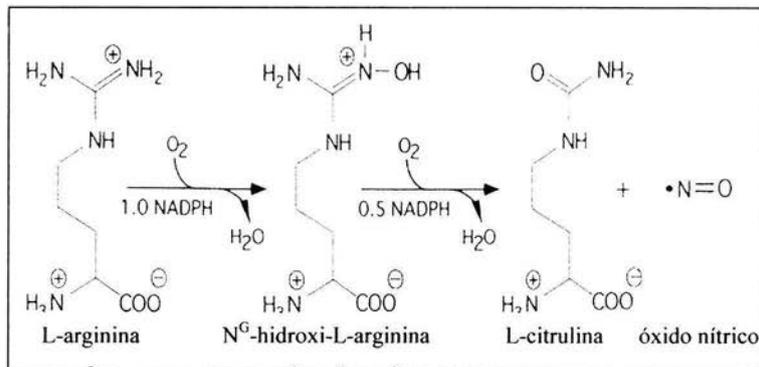


Figura 1. Reacción de las enzimas sintetas de óxido nítrico (NOS).
 Las NOS catalizan la conversión de L-arginina en L-citrulina en presencia de Nicotinamida Dinucleótido Fosfato reducido (NADPH) y oxígeno molecular, todas las NOS utilizan L-Arginina como sustrato. (Hemmens y Mayer, 1997)

La familia de las NOS humanas está formada por tres diferentes isoformas que comparten un 51-57% de homología, producidas por diversos genes, con diferente localización, regulación, propiedades catalíticas y sensibilidad a inhibidores. Estas isoformas han sido referidas a la nomenclatura mas común: nNOS (también conocida como tipo I, NOS-1) referida a la isoforma primordialmente encontrada y predominante en tejido neuronal, iNOS (también conocida como tipo II, NOS-2) referida a la isoforma que es inducible en un amplio rango de células y tejidos y eNOS (también conocida como tipo III, NOS-3) referida a la isoforma primordialmente encontrada en células del endotelio vascular (tabla 1). Estas isoformas eran anteriormente diferenciadas basándose en su expresión constitutiva (eNOS y nNOS) e inductiva (iNOS) y en su dependencia de calcio (eNOS y nNOS) o independencia (iNOS) (Wendy y col, 2001).

Tabla 1. Características de las isoformas de las sintasas de óxido nítrico humanas

Isoforma	Abreviatura	Locus	Longitud y constitución del gen	Proteína	Expresión	Dependencia a Ca ²⁺	Expresión en tejidos
NEURONAL	nNOS	12q24.2-	200 kpb	1434 aa	Constitutiva	Dependiente	Células neuronales y de músculo esquelético
	Tipo I	12q24.3	29 exones 28 intrones	161 kDa			
INDUCIBLE	iNOS	17cen-	37 kpb	1203 aa	Inducible mediante proceso inflamatorio	Independiente	Músculo liso, macrófagos, miocitos, neutrófilos.
	Tipo II	17q11.2	26 exones 25 intrones	133 kDa			
ENDOTELIAL	eNOS	7q35-	21-22 kpb	1203 aa	Constitutiva	Dependiente	Células endoteliales, epiteliales y de músculo liso
	Tipo III	7q36	26 exones 25 intrones	133 kDa			

(Hemmens y Mayer, 1997; Wendy y col., 2001)

Las NOS tienen una estructura formada por dos dominios principales: el dominio oxigenasa en el extremo amino terminal que contiene sitios de unión a tetrahydrobiopterina (BH₄) y a L-arginina, mientras que el dominio reductasa contiene sitios para Flavina Mononucleótido (FMN), Flavina Adenina Dinucleótido (FAD) y Nicotinamida Dinucleótido Fosfato reducido (NADPH) (Alderton y col, 2001) (fig. 2).

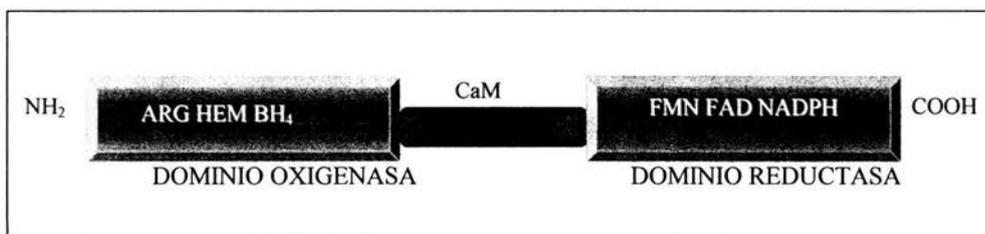


Figura 2. Uniformidad en la estructura de los dominios de las óxido nítrico sintasas

Los dominios oxigenasa y reductasa son mostrados como cajas sólidas en los que se observa para el dominio oxigenasa el sitio de unión al sustrato L-arg así como para los cofactores Hem y BH₄ (Alderton y col, 2001).

Las NOS son caracterizadas como citocromos P₄₅₀ y como hemoproteínas ya que requieren tetrahydrobiopterina (BH₄), FMN Y FAD como cofactores y catalizan la oxidación de L-arginina, dependiente de NADPH, para formar NO y L-citrulina (Marsden y col, 1992; White y Marletta, 1992) (fig.3).

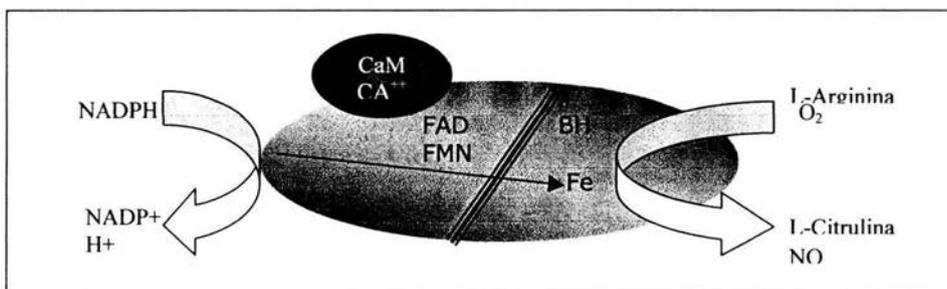


Figura 3. Reacción catalizada por las óxido nítrico sintasas

Los electrones son donados por NADPH al dominio reductasa de la enzima y son llevados al dominio oxigenasa vía FAD Y FMN., en este dominio los electrones interactúan con el hierro y BH₄, y esto activa el sitio catalítico de la reacción de oxidación de L-arginina, generando citrulina y óxido nítrico como productos. Los electrones que fluyen a partir del dominio reductasa requieren la presencia de Ca²⁺ y calmodulina ligados (Alderton y col., 2001).

Las NOS están reguladas mediante la interacción con calmodulina (CaM), lo cual resulta necesario para la actividad enzimática en las tres isoformas. La dependencia de Ca^{2+} en la síntesis de NO es notable en las enzimas nNOS y eNOS ya que, a diferencia de iNOS, requieren altas concentraciones de Ca^{2+} . La unión de CaM incrementa la tasa de transferencia de electrones a partir de NADPH a las flavinas del dominio reductasa (Fulton y col, 2001).

El NO es una molécula mensajera ubicua, que se encuentra involucrada en diversas funciones tales como el proceso de angiogénesis y permeabilidad vascular (Fukumura y col, 2001), también participa en el control de la agregación plaquetaria y la agregación leucocitaria a endotelio, así como en la regulación de la actividad mitótica de células de músculo liso, el tono vascular, la quimiotaxis monocítica, que representan funciones de importancia fundamental en la fisiología cardiovascular.

El óxido nítrico dilata todo tipo de vasos sanguíneos por la estimulación de la guanilato ciclasa soluble y el incremento de cGMP en células de músculo liso (fig. 4).

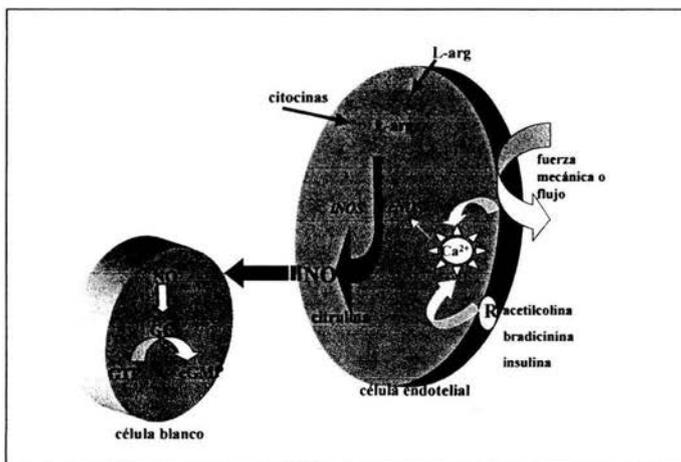


Figura 4. Activación de las sintasas de óxido nítrico en el endotelio.

La activación por flujo sanguíneo es dependiente de calcio por parte de la eNOS, convirtiendo la L-arginina a L-citrulina, liberando en la reacción óxido nítrico y la producción subsiguiente de cGMP.

1.3.2 Sintasa de óxido nítrico endotelial

La sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) es una enzima constitutiva de 1203 aminoácidos y un peso molecular de 133 kDa (Bredt y Snyder, 1989); esta isoforma es responsable de la homeostasis cardiovascular, regulación de la presión sanguínea y angiogénesis (Fulton y col, 1999). Esta sintasa de óxido nítrico es una proteína de membrana que está localizada en células especializadas y sus microdominios de superficie están implicados con procesos de transducción de señales. La eNOS es una proteína periférica de la membrana celular, que aunque no tiene alguna fracción hidrofóbica transmembranal, se encuentra localizada principalmente en microdominios especializados denominados caveolas que se caracterizan por la presencia de la proteína caveolina. Las caveolas son pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática (Karantzoulis-Fegaras y col, 1999), tiene presentes algunos receptores e inclusive proteínas G (Arnal y col., 1999).

La enzima eNOS es una NADPH-oxidasa dependiente de calcio, el NO producido por esta isoforma regula el tono vascular mediante una vía de señalización dependiente de cGMP, además el NO tiene efectos independientes de cGMP dentro de la vasculatura (Wang y col, 2000).

De las tres isoformas principales de las NOS, la eNOS es la única que está sujeta a N-miristoilación co-traducciona, y palmitolación de cisteínas post-traducciona. Ambos procesos son necesarios para la localización subcelular de la enzima en la periferia del aparato de Golgi (Sessa *et al.* 1995) y en las caveolas (Fulton y col, 1999), mientras la miristoilación del residuo de glicina en la posición 2 es irreversible, la palmitoilación de las cisteínas 16 y 26 es reversible (Hemmens y Mayer, 1997). Probablemente la depalmitoilación contribuye a la disociación de la enzima de la caveola (Arnal y col, 1999).

1.3.3 Polimorfismos del gen de la óxido Nítrico Sintasa endotelial

Se han reportado diversos polimorfismos genéticos dentro del gen de la eNOS con un papel en la susceptibilidad de diferentes padecimientos, entre ellos se encuentran T786C, A922G y T1468A, que han sido asociados con espasmos coronarios (Marsden y col, 1992). Existe una variante polimórfica que consiste en un cambio en el número de repetidos de 27 pb en el intrón 4, la cual se encuentra correlacionada junto con el tabaquismo en el aumento de riesgo a padecer enfermedades coronarias (Philip y col, 1993).

Un polimorfismo en el exón 7 del gen humano eNOS G894T (Glu298Asp) corresponde a una sustitución de aminoácido glutámico por aspártico. Se ha descrito una asociación entre el polimorfismo Glu298Asp y el infarto agudo al miocardio (Shimasaki y col, 1998), así como su presencia como factor de riesgo a padecer enfermedades coronarias y arteriales.

Se cree que los polimorfismos dentro de los exones del gen NOS3 en pacientes con enfermedades coronarias o hipertensión pueden afectar la función de la eNOS (Tesauro y col, 2000); tal como ocurre con el cambio Glu298Asp. Esta variante parece aumentar el rompimiento intracelular de la eNOS en condiciones de acidez (Fairchild y col, 2001), debido a la creación de una unión lábil entre el Asp²⁹⁸ y la Pro²⁹⁹, particularmente en el carboxilo α del Asp²⁹⁸. Es posible que este cambio produzca una proteína lábil *in vivo*, por lo que se puede dar una disminución en la producción de óxido nítrico derivado de la reacción catalizada por la eNOS; aún cuando no se descarta la posibilidad de que este cambio de aminoácido puede estar afectando de alguna manera la unión de esta enzima con otras proteínas.

1.4 Metilentetrahidrofolato reductasa

1.4.1 Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y su importancia biológica

Otra de las enzimas que se ha relacionado con la preeclampsia es una proteína citoplasmática dimérica conocida como MTHFR. En el amino-terminal de esta enzima se han localizado determinantes de unión de FAD, NAD(P) y 5, 10- metilentetrahidrofolato; el dominio carboxilo-terminal regula la actividad enzimática en respuesta a la demanda de adenosilmetionina y contiene el sitio de ligación al inhibidor alostérico (fig. 5) (Brian y col, 1999).

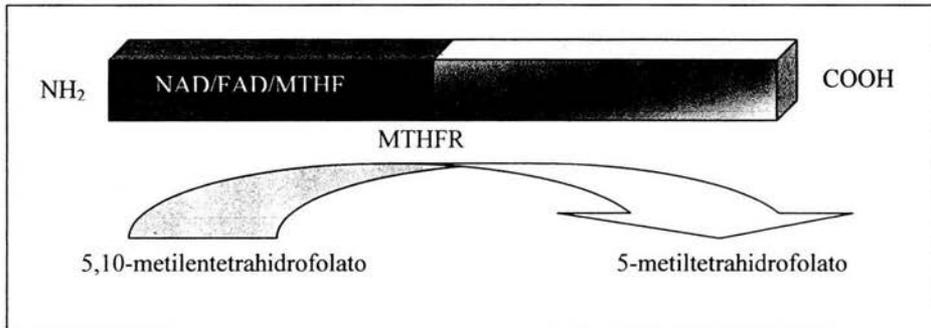


Figura 5. Representación esquemática de la estructura de los dominios de la MTHFR.

En la figura se muestra el sitio de unión al NAD, FAD y al sustrato metilentetrahidrofolato en la región amino terminal.

El gen de la 5, 10-metilentetrahidrofolato reductasa está localizado en el cromosoma 1 en la banda 1p36.3 y está conformado por 11 exones cuya secuencia de cDNA es de una longitud de 2.2 kilobases (Gollete y col, 1998 y Lorenzo y col, 2000). Este gen codifica para una proteína de 656 aminoácidos (Derval y col, 2000). En humanos, el producto mayoritario del gen MTHFR catalíticamente activo es una proteína con un peso de 77 kDa , aunque una isoforma menor de aproximadamente 70 kDa ha sido observada *in vitro* (Rozen, 1997).

La enzima MTHFR cataliza la reacción de reducción del 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, forma predominante de donador de folato y metilo para la remetilación dependiente de vitamina B-12 de la homocisteína a metionina (fig. 6) . La metionina es convertida a

S-adenosilmetionina, que es el donador de metilo utilizado en numerosas reacciones por las cuales se metilan substratos como ADN, ARN, hormonas y lípidos. El 5,10-metilentetrahidrofolato es esencial para la generación de purinas y pirimidinas, la MTHFR es la enzima clave en la regulación de la metilación y la síntesis de ácidos nucleicos (Derval y col, 2000).

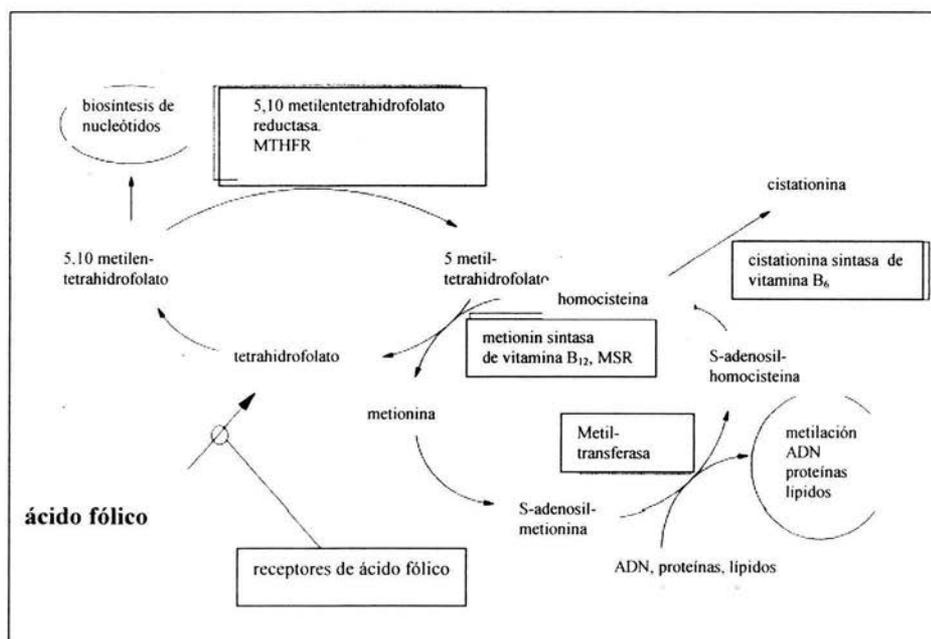


Figura 6. Esquematación de la participación de la MTHFR en diversas rutas metabólicas.

Simplificación de las rutas metabólicas en las que esta involucrada la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), MSR, metionin sintasa reductasa (Derval y col, 2000).

Cuando la actividad de la enzima MTHFR es disminuida hay una acumulación de homocisteína en sangre lo que se conoce como hiperhomocisteinemia, que ha sido relacionada con alteraciones vasculares y hematológicas (tabla 2) lo que se refleja en afecciones coronarias e hipertensión arterial (Kluijtmans y col, 1997 y Morita y col, 1997).

Tabla 2. Alteraciones vasculares y hematológicas causadas por la hiperhomocisteinemia
Células endoteliales agraviadas

Deterioro de la vaso dilatación dependiente de endotelio
Deterioro del activador endógeno del plasminógeno

Incremento en la agregación plaquetaria

Incremento en la síntesis de tromboxano A₂
Decremento en la síntesis de protaciclina

Anormalidades de la fibrinólisis (cascada de coagulación)

Activación de los factores de coagulación V, X y XIII
Inhibición de antitrombina III y factor C (anticoagulantes naturales)
Incremento en los niveles de fibrinógeno

(James y col, 1998)

1.4.2 Polimorfismos del gen de la Metilentetrahidrofolato reductasa

Diversas mutaciones del gen MTHFR (Meter y col, 2002) han sido asociadas con una deficiencia severa de MTHFR, hiperhomocisteinemia, homocistinuria, neuropatía periférica, hipotonía y trombosis (Kluijtmans y col, 1996; Gollete y col, 1998; Sibani y col, 2000).

El polimorfismo del exón 7 A1298C, resulta en una sustitución de aminoácido (glutamato por alanina) en la enzima (Viel y col, 1997 y Van der Put y col, 1998), que deriva en una actividad disminuida (Van der Put y col, 1998 y Weisberg y col, 1998).

El polimorfismo C677T da como resultado una sustitución de aminoácido (alanina por valina) en la enzima (Frosst y col, 1995; Rozen y col, 1997). Esta sustitución produce una enzima termo lábil por lo que su actividad es reducida a 37° C o más (Frosst y col, 1995). Se ha observado que las personas homocigotas para el alelo C677T, presentan un incremento en los niveles sanguíneos de homocisteína (Rozen y col, 1998), y en consecuencia una mayor probabilidad de riesgo cardiovascular (Kluijtmans y col, 1997 y Morita y col, 1997).

2. Justificación

Existen diversos polimorfismos genéticos implicados en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Debido a su importancia epidemiológica, es importante conocer la frecuencia de estos polimorfismos en poblaciones con características diferentes como son la mestiza e indígena mexicanas; de la misma manera es importante el estudiar grupos de riesgo como es el caso de las mujeres con preeclampsia, considerando que éste último es uno de los desordenes mas serios del embarazo que afecta entre el 4-5% de las mujeres gestantes y que es considerada la causa principal de muerte materna y perinatal.

3. Objetivos

Objetivo General

- § Estudiar los polimorfismos G984T del gen de la eNOS y C677T del gen de la MTHFR, para establecer su relación con la preeclampsia.

Objetivos Particulares

- § Formar un banco de ADN de población mestiza mexicana y población indígena maya para ser utilizado en diversos estudios sobre polimorfismos genéticos.
- § Conocer la frecuencia del polimorfismo G894T del gen eNOS en población mestiza e indígena maya mexicanas.
- § Conocer la frecuencia del polimorfismo C677T del gen MTHFR en población mestiza e indígena maya mexicanas.
- § Conocer la frecuencia de los polimorfismos eNOS G894T y MTHFR C677T en mujeres mayas con embarazo normal y con preeclampsia.
- § Determinar si los polimorfismo eNOS G894T y MTHFR C677T constituyen un factor de riesgo para la preeclampsia.

4. Materiales y Métodos

4.1 Poblaciones de estudio

Las diferentes poblaciones utilizadas en este estudio fueron:

§ Población mestiza

Conformada por 101 individuos de sexo masculino y femenino

§ Población maya

Conformada por 72 adultos de sexo masculino y femenino.

§ Grupo Control.

109 Mujeres mayas gestantes sin complicaciones durante el desarrollo del embarazo y posterior al parto.

§ Grupo Problema

61 Mujeres mayas gestantes que durante el embarazo o posterior al parto se les diagnosticó preeclampsia cuyas características clínicas fueron:

Tensión arterial sistólica mayor a 140 mmHg

Tensión arterial diastólica mayor a 90 mmHg

Eliminación de proteínas en orina (tabla 3)

Las muestras de la población mestiza, fueron recolectadas en el Laboratorio de Investigación en Genética Humana del hospital de pediatría en el Centro Médico Nacional SXXI.

Las muestras de la población maya, fueron recolectadas en el Centro de Investigaciones Regionales Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Tabla 3. Características clínicas de mujeres mayas con preeclampsia

	Edad	Tensión arterial sistólica mmHg	Tensión arterial diastólica mmHg	Índice de masa corporal	Proteinuria	Antecedentes de preeclampsia	Preeclampsia previa
Grupo problema	22.5 ± 3.85	146.7 ± 4.38	96.05 ± 3.14	28.07 ± 3.32	Positivo	5.4%	32%
Valores normales		110	70	22-25	Negativo		

Previo consentimiento con permiso firmado se obtuvieron 5ml de sangre periférica de las diferentes personas que conforman nuestros grupos de estudio.

4.2 Extracción de ADN

La muestra de sangre periférica anticoagulada con EDTA se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos, se obtuvo la interfase de leucocitos por aspiración con un bulbo a través de una pipeta pasteur. Se realizaron de 2 a 3 lavadas del paquete de células blancas con el objetivo de eliminar los eritrocitos que se encontraban en el paquete celular, estos lavados se realizaron con solución de lisis RCLB (del inglés: Red Cell Lysis Buffer; TRIS 10 mM pH 7.6, MgCl₂ 5mM y NaCl 10m M). Las células blancas se resuspendieron en 60 µl de NaCl 5mM, y se agregaron 90 µl de SDS al 10% con el fin de romper las membranas de las células. Se agitó vigorosamente con ayuda de un vortex, y se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 600 µl de NaCl saturado, para precipitar las proteínas y restos celulares producto de la lisis, se mezcló por pipeteo con punta ancha y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó por 15 minutos a 15000 rpm, recuperando el sobrenadante, ya que en este se encuentra el ADN en solución. El ADN se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto, con respecto al volumen recuperado a partir de la centrifugación. Se dejó reposar para permitir que el DNA precipitara por completo y posteriormente se eliminó el sobrenadante. Con el fin de eliminar el exceso de sales y obtener un ADN limpio, se hicieron de 2 a 3 lavados con 1ml de etanol al 75%, se centrifugó y se eliminó el etanol dejando secar el ADN para posteriormente solubilizarlo con agua estéril, en un volumen dependiente de la cantidad de ADN extraído.

Se realizó una dilución 1:50 del ADN y se determinó su concentración por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 y 280 nm. La lectura dada a longitud de onda de 260 nm se multiplicó por un factor de 2500 que se obtiene a partir de la multiplicación de la dilución por la constante de una densidad óptica igual a 50 ng de ADN. Con la relación de absorbancias 260/280 se determinó la pureza de la muestra que en condiciones óptimas debe ser de 1.8 a 2.0, valores inferiores indican contaminación con proteínas, mientras que valores superiores indican contaminación por ARN. Finalmente se observó la integridad del ADN, corriendo 1µl de ADN en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio a 120 Volts durante 15 min. Todas las muestras se ajustaron a una concentración de 100 ng / µl.

4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para realizar el análisis del polimorfismo Glu298Asp de la eNOS, se amplificó el exón 7 del gen, con los oligonucleótidos: 5'-CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC-3' (para la cadena sentido) y 5'-AGTCAATCCCTTTGGTGCTCAC- 3' (para la cadena antisentido). Las condiciones de reacción fueron: 200 ng de ADN genómico, 1.5 unidades de enzima Taq polimerasa, 10 pmol de cada primer, 0.2 mM de dinucleótidos trifosfatados (dNTP's), 3 mM de cloruro de magnesio, 50 mM de cloruro de potasio, 20mM de Tris-HCl (pH 8.4) y agua para llevar a un volumen final de 25 µl. La PCR consistió de una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguida de 33 ciclos conformados por desnaturalización de 30 segundos a 94°C, alineamiento 30 segundos a 60° y extensión de 30 segundos a 70°C. Se comprobó la amplificación corriendo 3ml del producto de PCR (206 pb) en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio a 120 Volt durante 15 minutos.

4.4 RFLPs

La variante Glu298Asp puede ser reconocida por endonucleasas debido a que la mutación ocasiona un cambio en el sitio de reconocimiento para enzimas de restricción. Al digerir el producto de PCR con un tamaño de 206pb, la enzima *Ban*II reconoce el alelo silvestre (G en la posición 894) generando fragmentos de 124 y 82 pb, mientras que *Mbo*I reconoce el alelo mutante (T en la posición 894) generando fragmentos de 119 y 87 pb. La secuencia de reconocimiento de las enzimas *Ban*II y *Mbo*I se muestra en la figura 7.

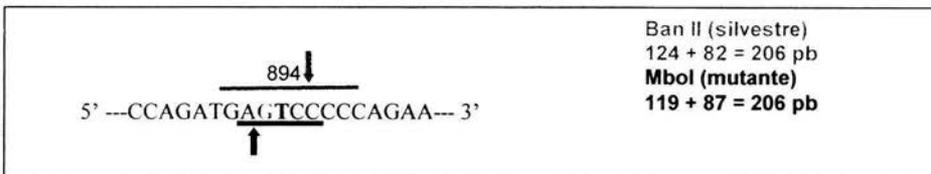


Figura 7. Sitios de reconocimiento al corte con las enzimas *Ban*II y *Mbo*I

(Flores-Segura, 2003).

Para el análisis del polimorfismo Glu298Asp del gen de la eNOS se dividió en producto de PCR en volúmenes iguales, para su digestión con las enzimas de restricción BanII y MboI, respectivamente, la restricción se realizó durante 16 horas a 37° teniendo las siguientes condiciones de reacción: 10 µl del producto de PCR, cuatro unidades de endonucleasa, 2.5 µl de 1x NEB Buffer 4® para BanII y 1x NEB Buffer 3® para MboI a un pH de 7.9 y agua para llegar a un volumen final de 25 µl. El Buffer 4® está conformado por 50 mM acetato de potasio, 20 mM Tris acetato, 10 mM acetato de magnesio y 1 mM DTT. La conformación del Buffer 3® es 100 mM cloruro de sodio, 50 mM Tris ácido clorhídrico, 10 mM cloruro de magnesio, 1 mM DTT.

Los productos de digestión se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% a 80-90 volts durante 30min revelado con bromuro de etidio.

4.5 PCR- Tiempo real (Taqman ®)

El ensayo de la 5' exonucleasa o Taqman ®, utiliza la propiedad de la polimerasa de 5' exonucleasa, en donde se utilizan dos sondas de ADN las cuales tienen las secuencias pertenecientes a los polimorfismos a estudiar, estas sondas tienen en el 5' un marcador fluorescente de distinta naturaleza y en el 3' un apagador con el cual absorbe la fluorescencia emitida por el marcador.

La reacción de la 5' exonucleasa consiste en un PCR convencional (Fig. 8), en el cual al desnaturar el ADN se permite que las sondas se apareen con su secuencia blanco, posteriormente se alinea el oligonucleótido y comienza el alargamiento del producto de PCR, en el momento que la polimerasa se encuentra con la sonda apareada en la secuencia blanco de ADN, la enzima comienza su acción de exonucleasa, rompiendo la sonda y liberando al marcador fluorescente o reportero del apagador que comienza a emitir fluorescencia; posteriormente la sonda es degradada por completo y finaliza la extensión del producto.

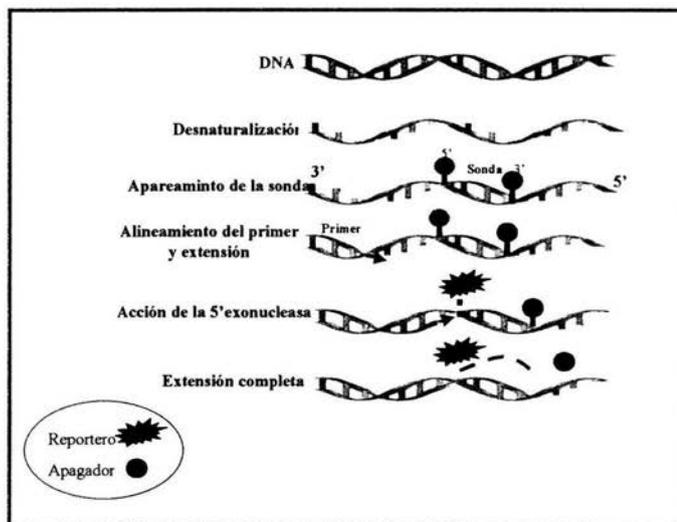


Figura 8. Reacción de TaqMan (5' exonucleasa)
 Representación gráfica de los diferentes pasos involucrados en la reacción de TaqMan.

La señal emitida por el reportero (fluoróforo) específico de cada sonda (VIC para la sonda silvestre y FAM para la sonda con la mutación) es detectada en cada uno de los ciclos de la reacción mediante el software ABI prism 7000 SDS® para realizar posteriormente la discriminación alelica (fig. 9) mediante la cuantificación de la fluorescencia emitida por cada una de las muestras. El equipo ABI PRISM ® 7900HT, fotografía esta fluorescencia y presenta la agrupación de las muestras según la sonda que se apareo con la secuencia de ADN analizado (fig. 9).

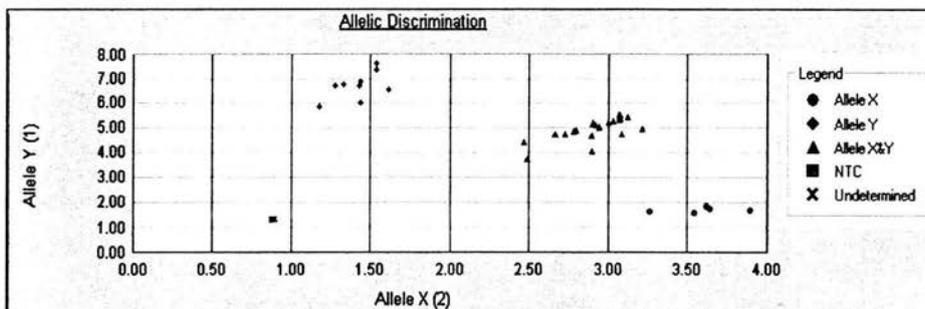


Figura 9. Discriminación Alelica mediante el Software ABI PRISM 7000 SDS ®
 Discriminación alelica del ensayo de 5' exonucleasa en donde el alelo X corresponde a la secuencia tipo silvestre (sonda marcada con VIC) y el alelo Y corresponde a la secuencia con la mutación (sonda marcada con FAM).

Las condiciones de reacción para el estudio del polimorfismo C677T de la MTHFR fueron: 20 ng de ADN, 1.25 µl de SNP Assay Mix 10x ® (oligos y sondas marcadas con diferentes fluoróforos), 6.25 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix® (Taq polimerasa, dNTP's, buffer, cloruro de magnesio), con un volumen final de 12.5 µl.

La reacción de PCR consistió de una activación de la polimerasa por 10 minutos a 95°C, seguida de cuarenta ciclos que residen de 15 segundos de desnaturalización a 92°C y 1 minuto de alineación / extensión a 60°C. Los oligonucleótidos utilizados para el análisis del polimorfismo Ala226Val de la MTHFR fueron: 5'-GCACTTGAAGGAGAAGGTGTCT-3' (para la cadena sentido) y 5'-CCTCAAAGAAAAGCTGCGTGATG-3' (para la cadena antisentido). Las sondas utilizadas en el ensayo fueron las siguientes: 5' -ATGAAATCGGCTCCCGC-3' marcada con el fluoróforo VIC, la cual empalma con la secuencia silvestre y 5' -ATGAAATCGACTCCCGC -3' marcada con el fluoróforo FAM que se aparea con la secuencia que presenta la mutación.

Para validar el método de PCR tiempo real se secuenció el producto de PCR de dos muestras que daban señal con diferente fluoróforo y se realizó la secuenciación automática del producto de PCR de estas muestras para corroborar que la sonda marcada con VIC identificaba el alelo silvestre y la sonda marcada con FAM identificaba el alelo mutado.

Para la secuenciación se amplificó un producto de PCR de 61 pb con las siguientes condiciones de reacción: 200 ng de ADN, 1.5 unidades de enzima Taq polimerasa, 5 pmol de cada primer, 0.2 mM de dNTP's, 3 mM de cloruro de magnesio, 50 mM de cloruro de potasio, 20mM de Tris-HCl (pH 8.4) y agua para llevar a un volumen final de 25 µl. La PCR consistió de una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguida de 25 ciclos conformados por desnaturalización de 30 segundos a 94°C, alineamiento 30 segundos a 60°C y extensión de 30 segundos a 60°C.

El producto de PCR se purificó a partir de gel de agarosa al 2%, del cual se cortó la banda correspondiente al producto de PCR y se colocó en un tubo de 1.5 ml y se cubrió con Buffer TE 1X y se agitó a temperatura ambiente por 16 horas, se recuperó el buffer que contenía al ADN en un tubo nuevo al cual se le agregó 1 µl de glicógeno y acetato de sodio para una concentración final de 0.3 M más dos volúmenes de etanol absoluto. Se mezcló e incubó por 15 minutos a 4°C, posteriormente se centrifugó 15 minutos a 15000 rpm, se desechó el sobrenadante y se lavó el

sedimento con 500 µl de etanol al 70% , se centrifugó 15 minutos a 15000 rpm, se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 30 µl de agua estéril. Posteriormente se realizó la reacción de secuenciación con 4 µl de Big Dye, 30ng de ADN purificado, 2 µl Buffer, 3.2 pmol de oligo para la cadena antisentido y agua estéril para completar un volumen final de 20 µl.

La reacción de PCR para secuenciar constó de desnaturalización inicial 5 minutos a 96°C, seguido de 25 ciclos, cada uno con las siguientes características: 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 60°C y cuatro minutos a 60°C.

4.6 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos a partir de los diversos grupos de estudio se realizó la prueba de X^2 (chi-cuadrada) con el programa SPSS versión 12.0. Esta prueba permite saber si las frecuencias observadas difieren significativamente entre diferentes grupos con un intervalo de confianza del 95%.

Para establecer si la presencia de las variantes estudiadas en este trabajo representan un incremento de riesgo para el desarrollo de preeclampsia en población maya, se estimó la razón de probabilidades (OR) Odds Ratio = A/A vs. A/B + B/B, siendo A el polimorfismo silvestre y B el polimorfismo que corresponde a la mutación, en esta prueba se utilizó un intervalo de confianza del 95%.

5. Resultados

5.1 Análisis del polimorfismo Glu298Asp de la eNOS

La frecuencia del polimorfismo Glu298Asp, del gen de la eNOS se analizó con muestras de 101 mestizos, 68 mayas, 109 mujeres con embarazo sin complicaciones y 59 mujeres con preeclampsia. El análisis se realizó mediante la restricción del producto de amplificación por PCR de 206pb del exón 7 de la eNOS (fig. 10). El patrón de restricción obtenido por la digestión del producto de PCR mediante las enzimas *BanII* y *MboI*, se muestra en la figura 11.

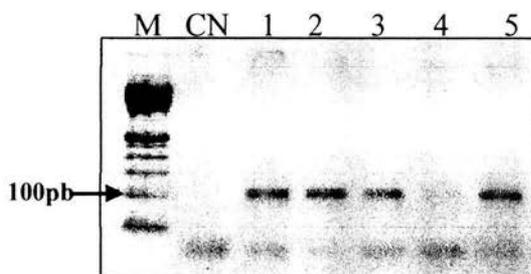


Figura 10. Electroforesis representativa del producto de PCR en gel de Agarosa al 2%.
M: marcador de peso molecular de 100pb, CN: control negativo sin ADN, 1, 2,3,4 y 5 amplificación de 206 pb del exón 7 del gen eNOS de diferentes muestras.

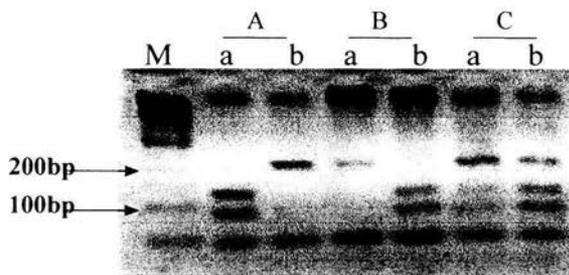


Figura 11. Determinación genotípica del polimorfismo Glu298Asp presente en el exón 7 de la eNOS.

*Electroforesis de los productos de PCR digeridos con las enzimas de restricción *BanII*(a) y *MboI*(b). M: escalera de 100 pb; A: homocigoto Glu298(G/G); B: homocigoto Ala298(T/T); C: heterocigoto Glu/Asp (G/T).*

En la población mestiza la frecuencia genotípica para el polimorfismo Glu298Asp del gen eNOS fue de 75.6% para Glu/Glu, 22.5% para Glu/Asp y 1.9% para Asp/Asp con una distribución alelica de 87% para Glu y 13% para Asp. En población Maya las frecuencias genotípicas fueron del 80.8% para Glu/Glu, 19.1% para Glu/Asp y 0% para Asp/Asp con distribución alelica del 90% para Glu y 10 para Asp (Tabla 4).

No se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas ($X^2_{\alpha 95\%}=1.76$, $p=0.184$) y alélicas ($X^2_{\alpha 95\%}=1.12$, $p=0.289$) entre las poblaciones mestiza y maya.

Tabla 4. Frecuencias genotípicas y alelicas del polimorfismo Glu298Asp del gen de la eNOS en población mestiza e indígena mexicanas.

Población	Frecuencias genotípicas			Total	Frecuencias alélicas		Total
	Glu/Glu (%)	Glu/Asp (%)	Asp/Asp (%)		Glu (%)	Asp (%)	
Mestiza	76 (75.6)	23 (22.5)	2 (1.9)	101	175 (87.0)	27 (13.0)	202
Maya	55 (80.8)	13 (19.1)	0	68	123 (90.0)	13 (10.0)	136
$X^2_{\alpha 95\%}=1.76$, $p=0.184$				$X^2_{\alpha 95\%}=1.12$, $p=0.289$			

En el grupo control (mujeres mayas con embarazo normal) la frecuencia genotípica del polimorfismo Glu298Asp del gen eNOS fue de 71.5% para Glu/Glu, 28.5% Glu/Asp y 0% para Asp/Asp, con distribución alelica de 88.7% para Glu y 14.3% de Asp. En el grupo de riesgo (mujeres mayas con preeclampsia) se obtuvo una frecuencia de 62.7% homocigotos para Glu298, 30.5% heterocigotos y 6.8% para homocigotos Asp298, con una distribución alelica de 78% para el alelo Glu y 22% para el alelo Asp.

Al comparar la distribución genotípica del polimorfismo Glu298Asp entre el grupo de mujeres mayas con embarazo normal y mujeres mayas con preeclampsia (tabla 5) muestran diferencias significativas ($X^2_{\alpha 95\%} = 7.88$, $p=0.019$); mientras que la distribución alélica no presenta diferencias significativas entre estos grupos ($X^2_{\alpha 95\%} = 3.31$, $p=0.068$).

Tabla 5. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Glu298Asp del gen de la eNOS en mujeres con embarazo normal y mujeres con preeclampsia .

Población	Frecuencias genotípicas			Total	Frecuencias alélicas		Total
	Glu/Glu (%)	Glu/Asp (%)	Asp/Asp (%)		Glu (%)	Asp (%)	
ME	78 (71.5)	31 (28.5)	0	109	187 (85.7)	31 (14.3)	218
MP	37 (62.7)	18 (30.5)	4 (6.8)	59	92 (78.0)	26 (22.0)	118
$X^2_{\alpha 95\%} = 7.88, p = 0.019$				$X^2_{\alpha 95\%} = 3.31, p = 0.068$			

ME= Mujeres con embarazo normal.

MP= Mujeres con preeclampsia.

Se compararon las frecuencias alélicas de las poblaciones analizadas en este estudio con las reportadas por diversos autores (tabla 6). Tanto la población mestiza e indígena presentaron diferencias significativas con las poblaciones caucásicas, encontrando una frecuencia alélica Glu298 mas elevada en las poblaciones mestiza y maya ($p < 0.05$). Por otro lado, es interesante mencionar que la población maya y asiática (Japón) no muestran diferencias ($p < 0.2$) mientras que entre la población mestiza y la asiática si hay diferencias significativas ($p < 0.025$).

Se calculó la razón de probabilidades (OR= odds ratio) asumiendo un efecto dominante del alelo Asp298, del gen de la sintasa de oxido nítrico $X^2_{\alpha 95\%} = 7.88, p = 0.019$. Se encontró un aumento en la probabilidad de desarrollar preeclampsia en presencia del alelo Asp298 del gen de la eNOS (Odds Ratio = (Glu/Glu vs. Glu/Asp + Asp/Asp) = 1.49, α 95%, intervalo de confianza = 0.764-2.929, $p = 0.2388$).

Tabla 6. Frecuencia del polimorfismo Glu298Asp de gen de la sintasa de óxido nítrico en diferentes poblaciones.

Población	Glu	Asp	Referencia
Mestizos (México)	0.86	0.14	Rosas-Vargas y col, 2003.
Huastecos (México)	0.88	0.12	Rosas-Vargas y col, 2003.
Mayas (México)	0.94	0.06	Rosas-Vargas y col, 2003.
Mayos (México)	0.92	0.08	Rosas-Vargas y col, 2003.
Caucásicos (Inglaterra)	0.69	0.31	Ignoran y col, 1999.
Caucásicos (Australia)	0.67	0.33	Cai y col, 1999.
Asiáticos (Japón)	0.96	0.04	Yoshimura y col, 1998.
Mestizos (México)	0.87	0.13	Presente estudio
Mayas (México)	0.90	0.10	Presente estudio

5.2 Análisis del polimorfismo Ala226Val de la MTHFR

La frecuencia del polimorfismo Ala226Val, del gen de la MTHFR se analizó en 101 mestizos, 72 mayas, 109 mujeres con embarazo sin complicaciones y 61 mujeres con preeclampsia. El análisis se realizó mediante el ensayo de la 5' exonucleasa por PCR tiempo real, con la utilización de dos sondas de secuencias complementarias a cada uno de los alelos Ala226 (silvestre) y Val226 (mutado), marcadas con fluoróforos diferentes.

Las curvas de amplificación correspondientes a un homocigoto Ala226, un heterocigoto y un homocigoto Val226 se muestran en la figura 12. La discriminación alélica se realiza posteriormente a la PCR como se describe en materiales y métodos.

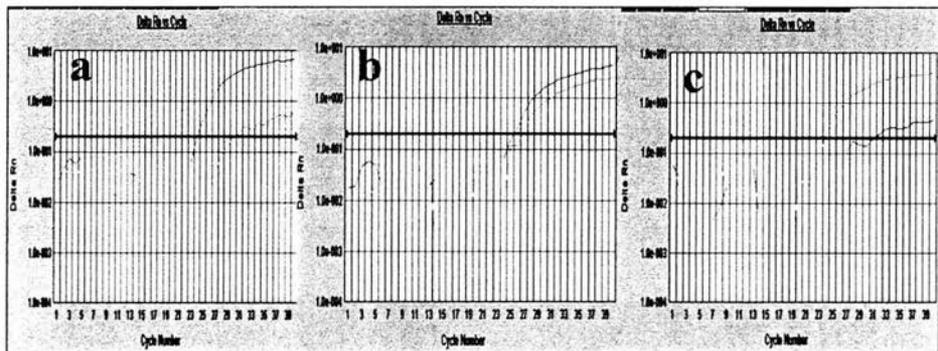


Figura 12. PCR tiempo real para el análisis del polimorfismo Ala226Val de MTHFR.

a) Curva de amplificación de un homocigoto Val 226 que identifica la sonda marcada con FAM . b) Curva de amplificación de un heterocigoto c) Curva de amplificación para un homocigoto Ala 226 que identifica la sonda marcada con VIC.

La secuenciación de las dos muestras que daban señal con los diferentes fluoróforos resultó que la sonda que aparee con la secuencia silvestre está marcada con VIC y la sonda que aparee con la secuencia que contiene la mutación se encuentra marcada con FAM lo que se muestra en la figura 13.

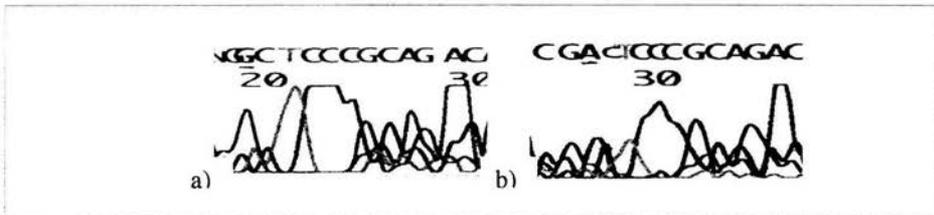


Figura 13. Validación de las sondas utilizadas en el ensayo de TaqMan.

- a) ATGAAATCGGCTCCCGC Secuencia de un alelo silvestre (MTHFR) identificado con la sonda marcada con VIC.
 b) ATGAAATCGACTCCCGC Secuencia de un alelo mutante (MTHFR) identificado con la sonda marcada con FAM.

En la población mestiza la frecuencia genotípica para el polimorfismo Ala226Val del gen MTHFR fue de 27.7% para Ala/Ala, 44.6% para Ala/Val y 27.7% para Val/Val con una distribución alélica de 50% para Ala y 50% para Val. En población maya las frecuencias genotípicas fueron del 16.6% para Ala/Ala, 45.8% para Ala/Val y 37.5% para Val/Val con distribución alélica del 40% para Ala y 60% para Val (tabla 7).

Mediante el análisis estadístico de los datos por la prueba de X^2 no se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas ($X^2_{\alpha 95\%} = 3.50$, $p = 0.061$) y alélicas ($X^2_{\alpha 95\%} = 3.67$, $p = 0.055$) entre las poblaciones Mestiza y Maya.

Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Ala226Val del gen de la MTHFR en población mestiza e indígena mexicanas.

Población	Frecuencias genotípicas			Total	Frecuencias alélicas		Total
	Ala/Ala (%)	Ala/Val (%)	Val/Val (%)		Ala (%)	Val (%)	
Mestiza	28 (27.7)	45 (44.6)	28 (27.7)	101	101 (50.0)	101 (50.0)	202
Maya	12 (16.6)	33 (45.8)	27 (37.5)	72	57 (40.0)	87 (60.0)	144

$X^2_{\alpha 95\%} = 3.50, p = 0.061$ $X^2_{\alpha 95\%} = 3.67, p = 0.055$

La frecuencia genotípica del polimorfismo Ala226Val del gen MTHFR fue de 20.2% para Ala/Ala, 45.9% Ala/Val y 33.9% para Val/Val en el grupo control (mujeres mayas con embarazo normal), con distribución alélica de 43.1% para Ala y 56.9% de Val., en el grupo con preeclampsia, los genotipos se distribuyen con un 32.8% de homocigotos para Ala226, 52.5% para heterocigotos y 14.7% para homocigotos Val226, y la distribución alélica de la manera siguiente 59% para el alelo Ala y 41% para el alelo Val (tabla 8).

Las distribuciones entre el grupo de mujeres mayas con embarazo normal y mujeres mayas con preeclampsia muestran diferencias significativas tanto en la distribución genotípica ($X^2_{\alpha 95\%} = 8.18, p = 0.016$), como en la distribución alélica ($X^2_{\alpha 95\%} = 7.91, p = 0.004$).

Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alelicas del polimorfismo Ala226Val del gen de la MTHFR en mujeres con embarazo normal y mujeres con preeclampsia.

Población	Frecuencias genotípicas			Total	Frecuencias alélicas		Total
	Ala/Ala (%)	Ala/Val (%)	Val/Val (%)		Ala (%)	Val (%)	
ME	22 (20.2)	50 (45.9)	37 (33.9)	109	94 (43.1)	124 (56.9)	218
MP	20 (32.8)	32 (52.5)	9 (14.7)	61	72 (59.0)	50 (41.0)	122

$X^2_{\alpha 95\%} = 8.18, p = 0.016$ $X^2_{\alpha 95\%} = 7.91, p = 0.004$

ME= Mujeres con embarazo normal.

MP= Mujeres con preeclampsia.

La frecuencia del polimorfismo Ala226Val del gen MTHFR ha sido estudiada por diversos autores en distintas poblaciones (tabla 9), al comparar las frecuencias alélicas de este polimorfismo de diversas poblaciones mexicanas con las analizadas en este trabajo, no se encuentran diferencias significativas ($p < 1.0$); mientras que con las poblaciones de caucásicos (Alemania) y asiáticos (Japón) si se observan diferencias significativas ($p < 0.025$).

Tabla 9. Frecuencia del polimorfismo Ala226Val del gen metilentetrahidrofolato reductasa, en diferentes poblaciones.

Población	Ala	Val	Referencia
Mestizos (Nuevo León)	0.64	0.36	Martinez de Villarreal y col, 2001.
Mestizos (Yucatán)	0.46	0.54	Gonzales-Herrera y col, 2002.
Mestizos (Guadalajara)	0.56	0.44	Davalos y col, 2000.
Tarahumaras (México)	0.64	0.36	Davalos y col, 2000.
Purepechas (México)	0.42	0.58	Davalos y col, 2000.
Caucásicos (Alemania)	0.64	0.36	Morita y col, 1997.
Asiáticos (Japón)	0.66	0.34	Prasmusito y col, 2002.
Mestizos (México)	0.50	0.50	Presente estudio
Mayas (México)	0.40	0.60	Presente estudio

6. Discusión

En este estudio se analizó la frecuencia del polimorfismo G894T (Glu298Asp) del gen de la eNOS y el polimorfismo C677T (Ala226Val) del gen de la MTHFR en población mestiza e indígena (maya) mexicanas; así como su posible asociación con el desarrollo de preeclampsia en mujeres mayas.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de la frecuencia del polimorfismo G894T del gen de la eNOS de las poblaciones mestiza y mayas; siendo los homocigotos para el alelo silvestre Glu298 los que prevalecen sobre los genotipos heterocigotos y homocigotos para el alelo mutado Asp298, en la población indígena maya no se encontró ningún individuo homocigoto para el alelo Asp298; por lo que la variante alélica Glu298 se presenta en mayor proporción en estas poblaciones. Estos resultados coinciden con los observados en el trabajo realizado por Rosas-Vargas *et al.*, 2003; en el cual se estudiaron diversas poblaciones mexicanas además de las poblaciones mestiza y maya, en donde todas las diversas poblaciones mexicanas mostraron mayor frecuencia del alelo silvestre Glu298 de la eNOS.

Asumiendo un efecto dominante del alelo Asp298, del gen de la sintasa de óxido nítrico el análisis de razón de probabilidades (OR= 1.47, α 95%) sugiere que el polimorfismo Glu298Asp de eNOS es un factor de riesgo para el desarrollo de preeclampsia en mujeres mayas. A pesar de que el incremento de las probabilidades OR es bajo, este constituye un factor de riesgo al tener un valor mayor a uno. Esta conclusión se ve reforzada por el hecho de que el genotipo homocigoto para el alelo mutante Asp298 es nulo tanto en población maya como en el grupo control de mujeres con embarazo sin complicaciones, por lo que resulta importante resaltar que únicamente en el grupo de mujeres con preeclampsia se encontraron 4 individuos (6.8%) homocigotos para el alelo mutante Asp298 del gen de la eNOS. Yoshimura y col, en 1997; encontró asociación en la presencia de la variante Glu298Asp del gen de la eNOS en mujeres con preeclampsia severa en población asiática, por lo que propone que la variante Glu298Asp puede ser un marcador de incremento en el riesgo a desarrollar preeclampsia severa. Estos resultados están apoyados en lo observado por Delacretaz y col, en 1995; el cual sugiere que el desarrollo de hipertensión en el embarazo o preeclampsia se debe a una inapropiada producción de óxido nítrico.

Los resultados obtenidos a partir del análisis del polimorfismo C677T del gen MTHFR confirman una alta frecuencia del alelo mutado para el polimorfismo Ala226Val, ya que se han observado resultados similares en diferentes poblaciones mexicanas (Mutchinick y col, 1999), la elevada frecuencia del alelo mutado Val226 del gen de la MTHFR a llevado a considerar la variante C677T como un marcador genético para las poblaciones étnicas mexicanas (González-Herrera y col, 2002). En este estudio el genotipo heterocigoto es el que se muestra en mayor proporción tanto en población maya como en población mestiza, la proporción de los genotipos homocigotos Ala226 y Val226 es idéntica en población mestiza, por lo que la frecuencia de los alelos es la misma en esta población; la población maya presenta una mayor proporción del genotipo homocigoto mutado Val226 reflejándose en las frecuencias alélicas, donde el alelo mutado Val226 es el que predomina.

La asociación del polimorfismo Asp226Val del gen MTHFR con patologías cardiovasculares, particularmente con preeclampsia dieron pauta para el estudio de una posible asociación de este polimorfismo con el desarrollo de preeclampsia que se caracteriza principalmente por el aumento de la tensión arterial durante el embarazo. En la población analizada, la mutación C677T del gen MTHFR no se encontró asociada con un incremento en el riesgo a desarrollar preeclampsia, de manera contraria a lo esperado, en el grupo de mujeres con preeclampsia, se encontró en mayor frecuencia el alelo silvestre Val226 del gen MTHFR, esto se puede atribuir al papel que juega el azar, en este tipo de estudios; retomando que la preeclampsia es considerada una enfermedad multifactorial en donde no solamente influye la carga genética sino que se ven involucrados otras determinantes como la interacción con el medio en el que se desarrollan, una mala nutrición, entre otras. En estudios reportados por diversos autores no se encuentra una asociación de la variante C677T del gen de la MTHFR en poblaciones caucásica, asiática y americana. (Kim Young y col, 2001 y Prasmusinto y col, 2002).

7. Conclusiones

- I. La presencia del alelo mutado para el polimorfismo G894T del gen de la sintasa de óxido nítrico es un factor de riesgo para el desarrollo de preeclampsia en mujeres mayas.
- II. El polimorfismo C677T del gen metilentetrahidrofolato reductasa no está asociado con el desarrollo de preeclampsia en mujeres mayas.
- III. El alelo mutado del polimorfismo C677T tiene una alta frecuencia en las poblaciones mestiza y maya mexicanas comparadas con diversas poblaciones.
- IV. La distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos eNOS G894T y MTHFR C677T de las poblaciones mestiza y maya mexicanas no muestran diferencias estadísticamente significativas.

8. Bibliografía

Alderton, WK., Cooper, CE y Knowles, RG. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *J Biochem.* **357**: 593- 615.

Amgrimsson, R., Hayward, C., Nadaud, S., Baldursdóttir, A., James, J., Walker, Liston, W., Ragnheiður, Baldursdóttir, R., Brock, D., Geirsson, R., Connor, M y Soubrier, F. (1997). Evidence for a familial pregnancy-induced hypertension locus in the eNOS-gene region. *Am J Hum Genet.* **61**: 354-362.

Arnal, JF., Dinh-Xuan, AT., Pueyo, M., Darbladea, B y Rami, J. (1999). Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci.* **55**: 1078-1087.

Bredt, DS. y Snyder SH. (1989). Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *PNAS.* **86**: 9030-9033.

Brian, D., Guenther, CA., Sheppard, Tran, P., Rozen, R., Rowena, G., Mattheus y Ludwig, ML. (1999). The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nature Structural Biology.* **6**: 359-365.

Cajiga, MF., Sereno GB. y Murguía GH. (1994). Estudio de los histiocitos placentarios en la toxemia como enfermedad auto inmune. *Medicina en Ginecología, Obstetricia y Perinatología.* **16**: 233-235.

Dávalos, IP., Olivares, N. y Castillo, MT. (2000). The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native population. *Ann Genet.* **43**: 89-92.

Derval, JG., Sandrine, B., Leo AJ Kluijtmans y Alexander S. Whitehead. (2000). The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene.* **257**: 279-289.

Fairchild, T., Fulton, D., Fontana, J., Gratton, J., McCabe, T. y Sessa, W. (2001). Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu298Asp-variant of human endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* **276**: 26674-26679.

Flores-Segura, Adrián. (2003). *Análisis de la frecuencia del polimorfismo Glu298Asp de la enzima sintasa endotelial de óxido nítrico en poblaciones indígenas y mestiza mexicana.* TESIS Profesional. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.

Frosst, P., Blom, HJ., Milos, R., Gollote, P., Sheppard, C., Matthews, R., Boers, G., Den-Heijer, M., Kluijtmans, L. y van der Hewel. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase [letter]. *Nat Genet.* **10**: 111-113.

Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C., Buerk, D., Huang, P. y Jain, R. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *PNAS.* **5**: 2604-2609.

Fulton, D., Fontana, J., Sowa, G., Gratton, JP., Lin, M., Li, KX., Michell, B., Kemp, BE., Rodman, D. y Sessa, WC. (2001). Localization of endothelial nitric oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane define the existence of two pools of active enzyme. *J Biol Chem.* **277**: 4277-84.

Gallery, EM., Campbell, S. y Lldovski, B. (2001). A novel in vitro co-culture system for the study of maternal decidual endothelial cell-trophoblast interactions in human pregnancy. *Br J. of Obstetrics and Gynecology.* **108**: 651-653.

Gonzales-Herrera, L., García-Escalante, G., Castillo-Zapata, I., Canto-Herrera, J., Ceballos-Quintal, J., Pinto-Escalante, D., Diaz-Rubio, F., Del-Angel, RM. y Orozco-Orozco, L. (2002). Frequency of the thermolabile variant C677T in the MTHFR gene and lack of association with neural tube defects in the State of Yucatan, Mexico. *Clinical Genetics.* **62**: 394-398.

Goyette, P., Pai, A., Milos, R., Frosst, P., Tran, P., Chen, Z., Chan, M. y Rozen, R. (1998). Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome.* **9**: 652-656.

Hemmens, B. y Mayer, B. (1997). *Enzimology of nitric oxide synthase*. En: *Methods in Molecular Biology*. Vol. 100. Nitric Oxide Protocols. Humana Press. New Jersey, USA.

James, HS., Patrick, EM. (1998). Hyperhomocysteinemia and Atherosclerotic Vascular Disease. *Arch Intern Med.* **158**: 1301-1305.

Jeunemaitre, X., Soubrier, f., Kotelevtsev, YV., Lifton, RP., Williams, CS., Charru, A., Hunt, SC., Hopkins, PN., Williams, RR. y Lalovel, JM. (1992). Molecular basis of human hypertension: role of antiotensinogen. *Cell.* **71**: 169-180.

Karantzoulis-Fegaras, F., Antoniou, H., Sheue-Lim, ML., Kulkarni, G., D'Abreo, C., Wong, GK., Miller, TL., Chan, Y., Atkins, J., Wang, Y. y Marsden, PA. (1999). Characterization of the Human Endothelial Nitric-oxide Synthase Promoter. *J Biol Chem.* **274**: 3076-3093.

Kilpatrick, DC. (1999). Influence of human leukocyte antigen and tumour necrosis factor genes on the development of pre-eclampsia. *Hum Reprod Update.* **5**: 354-362.

Kim, Young Ju., Williamson, Roger A. MD., Murray, Jeffrey., Andrews, Janet. y Pietscher. (2001). Genetic susceptibility to Preeclampsia: Roles of cytosine-thymine substitution at nucleotide 677 of the gene for methylenetetrahydrofolate reductase, 68-base pair insertion at nucleotide 844 of the gene for cystathionine (beta)-synthase, and factor V Leiden mutation. *General Obstetrics And Gynecology Obstetrics.* **134**: 1211-1217.

Kluijtmans, LAJ., Kastelein, JJP., Lindemans, J., Boers, GH., Heil, SG., Bruschte, AV., Jekema, JW., van der Hauvel, LP., Trijbels, FJ., Boerma, GJ., Verheugt, FW., Willems, F. y Blom, HJ. (1997). Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation.* **96**: 2573-2577.

Kluijtmans, LAJ., Van den Heuvel, LP., Boers, GH., Frosst, P., Stevens, EM., van Oost, BA., den Heijer, M., Tribels, FJ., Rozen, R. y Blom, HJ. (1996). Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet.* **58**: 35-41.

Lenfant, C., Gifford, RW Jr. y Zuspan, F. (1990). National High Blood Pressure on Education Program Working Group report on high blood pressure in pregnancy. Consensus report. *Am J Obstet Gynecol.* **163**: 1689-1712.

Lorenzo, D., Botto y Guanhe, Yang. (2000). 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene variants and Congenital Anomalies: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology.* **151**: 862-877.

Marja, J., VanWijk, K., Kublickiene, Dees Boer. y VanBavel E. (2000). Vascular function in preeclampsia. *Cardiovascular Research.* **47**: 38-48.

Marsden, PA., Heng, HHQ., Scherer, SW., Stewart, RJ., Hall, AV., Shi, X., Tsui, C. y Schappert, KT. (1993). Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* **268**: 17478-17488.

Morgan, T. y Ward, K. (1999). New insights into the genetics of preeclampsia. *Semin Perinatol.* **23**: 14-23.

Mutchinick, MO. (1999). High Prevalence of the Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase Variant in Mexico: A Country with a Very High Prevalence of Neural Tube Defects. *Molecular Genetics and Metabolism.* **68**: 461-467.

Morita, H., Taguchi, J., Kurihara, H., Kitaoka, M., Kaneda, H., Kurihara, Y., Maemura, K., Shindo, T., Minamino, T., Ohno, M., Yamaoki, K., Ogasawara, K., Aizawa, T., Suzuki, S. y Yazaki, Y. (1997). Genetic polymorphism of 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation.* **95**: 2032-2036.

Morris, NH., Eaton, BM. y Dekker, G. (1996). Nitric oxide, the endothelium, pregnancy and preeclampsia. *Br J Obstet Gynecol.* **103**: 4-15.

Peter, L., Rady, S., Szucs, Grady, J., Hunall, SD., Kellner, LH., Nitowsky, H., Tying, SK., y Matalon, RK. (2002). Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Methionine Synthase Reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic Site, G1793A. *Am J of Med Gene.* **107**: 162-168.

Philip, A., Marsden, Henry, HQ., Heng, Stephen, W., Scherer, Rober J., Stewart, Anne V Hall, Xiao-Mei, Shi., Lap-Chee, Tsui y Keith, T Schappert. (1993). Chromosomal Localization of the Human Constitutive Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene. *J Biol Chem.* **268**: 17478-17488.

Prasuminto, MD., Sdrablin, S., Hofstacter, C., Fimmers, MD., y van del Ven, K. (2002). The Methylenetetrahydrofolate Reductase 677 C-T Polymorphism and Preeclampsia in Two Populations. *The Am Coll of Obs and Gin.* **99**: 1085-1092.

Pui-Yan Kwok, MD PhD. (2003). *Methods in Molecular Biology.* Vol. 212: Single Nucleotide Polymorphism: Methods and Protocols. P_Y Kwok.

- Rosas-Vargas, H., Flores-Segura, A., Guizada-Claure, B., Vargas-Alarcón, G., Granados, J., Salamanca, F. y Coral-Vázquez, R. (2003). Endotelial Nitric Oxide Nitric Shyntase Polymorphism in the Indian and Mestizo Poputation in Mexico. *Human Biology*. **75**: 91-96.
- Roberts, JM. y Cooper, DW. (2001). Phatogenesis and genetics of pre-ecampsia. *Lancet*. **357**: 53-56.
- Rozen, R. (1997). Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb. Haemost.* **78**: 523-526.
- Sessa, W., García-Cardeña, G., Liu, J., Keh, A., Pollock, J., Bradley, J., Thiru, S., Braverman, I. y Desai, K. (1995). The golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*. **270**: 17641-17644 .
- Shimasaki, Y., Yasue, H., Yoshimura, M., Nakayama, M., Ogawa, H., Harda, E., Masuda, T., Koyama, W., Saito, Y., Miyamoto, Y., Ogawa, Y. y Nakao, K. (1998). Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. **31**: 1506-1510.
- Sibani, S., Christensen, B., O'Ferrall, E., Saadi, I., Hiou-Tim, F., Rosenblatt, DS. y Rozen, R. (2000) Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. *Human Mutat*. **15**: 280-287.
- Sohda, S., Arinami, T., Hamada, H., Yamada, N., Hamaguchi, H. y Kubo, T. (1997). Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphismand pre-eclampsia. *J Med Genet*. **34**: 525-6.
- Soto-Alvarez, Ma Silvia. (2001). Revisión bibliográfica del manejo terapéutico de pacientes con preeclampsia. TESIS Profesional. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
- Tesauro, M., Thompson, W., Rogliani, P., Chaudhary, P. y Moss, J. (2000). Intracellular processing of endothelial nitric oxide isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: Cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *PNAS*. **97**: 2832-2835.
- Van der Put, NM., Gabreels, F., Stevens, EM., Smeitink, JA., Trijbels, FJ., Eskes, TK., van der Heuvel, LP. y Blom, HJ. (1998). A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?. *Am J Hum Genet*. **62**: 1044-1051.
- Viel, A., Dall'Agnese, L., Simona, F., Canzonieri, V., Capozzi, E., Visentin, MC., Valle, R. y Boiocchi, M. (1997). Loss of heterozygosity at the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase locus in human ovarian carcinomas. *Br J Cancer*. **75**: 1105-1110.
- Villanueva, ELA. y Alanís, LP. (2000). Prognostic factors associated to progression of preeclampsia to eclampsia. *Ginec Obstet Mex*. **68**: 312-316.
- Villanueva, LA. y Padernera, E. (1999). Bases fisiopatológicas de la preeclampsia: Una hipótesis. *Ginec Obtet Mex*. **67**: 246-252.

Wang, W., Wang, S., Yan, L., Madara, P., Cintron, A., Wesley, RA. y Danner, RL. (2000). Superoxide production and reactive oxygen species signaling by endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* **275**: 16899-16903.

Weisberg, I., Tran, P., Christensen, B., Sibani, S. y Rozen, R. (1998). A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab.* **64**: 169-172.

White, KA. y Marletta, MA. (1992). Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type homoprotein. *Biochemistry.* **31**: 6627-6631.

Wilton, AN., Kaye, JA., Guo, G. (1995). Is angiotensin a good candidate gen for preeclampsia. *Hypert Preg.* **14**: 251-260.

Zuzpan, F. y Schiff, E. (1991). New concepts in the underlading of hipertensive disease during pregnancy. *Clinic of Perinatology.* **18**: 426.