

11217



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA  
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES

"IDENTIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO 677 C>T  
DEL GEN DE LA 5-10 METIL TETRAHIDROFOLATO  
REDUCTASA EN PACIENTES Y SU PAREJA CON  
PÉRDIDA GESTACIONAL RECURRENTE TEMPRANA"

# TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA  
Y OBSTETRICIA

PRESENTA:  
DRA. GABRIELA GARCÍA JIMÉNEZ

DR. VALENTÍN IBARRA CHAVARRÍA  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN  
DIRECTOR DE TESIS:  
DR. RICARDO GARCÍA CAVAZOS

0351617



INPer

MÉXICO, D.F.

2005



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA

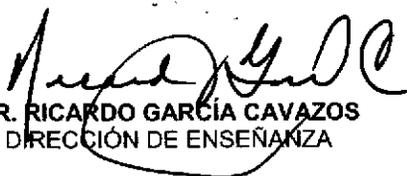
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES

TESIS DE ESPECIALIDAD  
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA



DRA. GABRIELA GARCIA JIMENEZ

AUTORIZACION DE TESIS

  
DR. RICARDO GARCÍA CAVAZOS  
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA

  
DR. VALENTÍN IBARRA CHAVARRÍA  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO

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

NOMBRE: Gabriela García Jimenez  
FECHA: 28.09.05  
FIRMA: [Handwritten Signature]

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA



DIRECCION DE ENSEÑANZA

## DEDICATORIA

A Dios por haberme acompañado en estos cuatros años, y siempre llevarme de su mano.

Al que dio todo para que pudiera culminar mi preparación, que fue mi apoyo y guía y lo seguirá siendo desde el cielo, en señal de agradecimiento por su esfuerzo lucha y tenacidad ejemplares, con todo mi corazón y amor.

A la más entregada y amorosa de las madres, fuente inagotable de cariño y comprensión, por su fe, paciencia, apoyo, y por ser, ante todo, mi mejor amiga. Para mis hermanos con los que he compartido tantos sueños y realidades, por ser mi ejemplo a seguir, por siempre apoyarme y por hacerme sentir su amor y comprensión en todos los momentos por formar esa familia que sabes nunca falla, para sus parejas y los 4 hermosos sobrinos que me han dado que me hacen seguir creyendo.

Para las que han compartido un momento de mi vida y la han enriquecido, mis amigas por siempre: Karla, Luzma, Vero, Marla, y mis comadres Edda y Lupita. Para mis maestros, por todas sus enseñanzas, especialmente para aquellos que confiaron siempre en mí, que fueron más que profesores amigos, y me dieron la oportunidad de aprender ese tipo de cosas que no se encuentran en los libros Dr. Oliver Cruz y Dr. Canales.

A mis compañeros que hicieron más fácil este camino con los que compartí un sin fin de sentimientos, hasta llegar a ese punto de convivencia, confianza y complicidad que llamamos amistad, muy especialmente para Nina, Esperanza, Emma, Pedro, Topete, Frankie, David, Margara y Emilia.

Y un agradecimiento muy especial al Dr. García Cavazos, coordinador de esta tesis, árbol de sabiduría y experiencia que enseña, ayuda y dirige a todos aquellos que bajo su sombra seremos los árboles del mañana.

## INDICE

RESUMEN .....	1
<b>MARCO DE REFERENCIA</b>	
PERDIDA GESTACIONAL RECURRENTE .....	2
HOMOCISTEINA .....	6
PREVALENCIA DEL POLIMORFISMO .....	12
DESARROLLO EMBRIONARIO.....	15
POLIMORFISMO Y SU RELACION CON PGRT .....	17
ALELOS 677T MATERNOS Y FETALES EN LA PGRT .....	18
MATERIAL Y METODOS .....	21
RESULTADOS .....	25
DISCUSION .....	30
ANEXOS .....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	35

## RESUMEN:

**INTRODUCCION:** La pérdida gestacional involucra una compleja interacción de factores ambientales y genéticos, cuando se presenta en forma recurrente temprana (PGRT) existe una firme asociación con la deficiencia en el metabolismo del folato. El polimorfismo 677 C>T de la MTHFR causa concentraciones elevadas de homocisteína asociadas a la patogénesis del aborto espontáneo. **OBJETIVOS:** Determinar la mutación 677 C>T del gen de la MTHFR en parejas mexicanas con PGRT. **DISEÑO DEL ESTUDIO:** Clínico, transversal, observacional, descriptivo. **MATERIAL Y METODOS:** Se estudiaron un total de 118/59 pacientes/parejas, con dos o más pérdidas gestacionales tempranas, a las cuales se les toma 4 ml. de sangre venosa periférica en tubos con EDTA se extrae el ADN para la técnica de PCR-RFLP para su lectura en un gel de agarosa. **RESULTADOS:** Se identifica la prevalencia del alelo mutado 677T en un 51.2% de las parejas. El riesgo materno al presentar genotipo 677 T>T es del 33.8% y el riesgo fetal por la combinación materna-paterna de 677T es del 57.6%. **CONCLUSIONES:** La alta prevalencia del polimorfismo 677 C>T en la población estudiada incrementa el riesgo para pérdida gestacional por lo que consideramos que en estos datos existe una relación importante entre el polimorfismo y la PGRT, por lo cual es recomendable la administración periconcepcional de ácido fólico.

## MARCO DE REFERENCIA

### PERDIDA GESTACIONAL RECURRENTE

#### DEFINICIONES:

La pérdida gestacional se divide en dos grandes grupos: pérdidas tempranas o abortos y tardías u óbitos. Aborto es definido como la terminación del embarazo antes de la semana 20 de gestación (a partir de la fecha de última menstruación) o un peso fetal menor de 500g.<sup>1</sup>

La pérdida gestacional recurrente (PGR) se ha definido históricamente como la presencia de tres o más abortos espontáneos, esta definición ha sido modificada para identificar como riesgo de recurrencia dos abortos espontáneos consecutivos siendo similares los resultados posteriores en mujeres que han tenido dos o tres pérdidas previas.<sup>2</sup> La definición utilizada en esta tesis será de dos a más abortos consecutivos.<sup>2,3</sup>

El término abortadoras primarias se refiere a las pacientes con pérdidas tempranas que nunca han tenido un embarazo exitoso y abortadoras secundarias a aquellas con pérdidas tempranas que han tenido al menos un hijo vivo.<sup>3</sup>

## EPIDEMIOLOGIA:

El aborto es la complicación más frecuente del embarazo, su incidencia depende de la población estudiada, se reporta del 12% al 20% de todos los embarazos entre la semana 4 y 20 de gestación, siendo esto solo la punta del iceberg de las pérdidas tempranas reproductivas totales.<sup>2-3</sup> La incidencia real de la pérdida gestacional temprana esporádica va del 50% al 60% debido al alto número de pérdidas no reconocibles clínicamente que ocurren entre las semanas 2 y 4 de gestación, esto ha sido posible detectarlo por el desarrollo de estudios de alta sensibilidad para la medición de la fracción Beta de Gonadotropina Coriónica Humana.<sup>1-3</sup>

Hablando de PGR, cuando se define como 2 o más abortos, la incidencia es del 3% en todas las parejas.<sup>4</sup> Tomando que la frecuencia de una pérdida gestacional al azar es del 15% y si cada evento es independiente, la posibilidad de que una pareja tenga un segundo aborto es del 2.3% y un tercer aborto es del 0.3% siendo estos valores solo cálculos estadísticos.<sup>2</sup> Existen pocos estudios en la literatura que documenten la incidencia de abortos en mujeres embarazadas sanas en una población representativa. Stirrat en 1990 da la probabilidad de un aborto de acuerdo a la historia obstétrica previa., mencionando: sin historia previa de pérdidas el riesgo es del 12.8% (12-15%), un aborto previo es de 21.3% (16-26%), dos abortos previos es del 29% (19-35%) y tres abortos previos es del 31.1% (26-37%)<sup>3</sup>. Regan en 1989 reporta la incidencia de acuerdo al historial obstétrico del 20% con un aborto, de 28% con dos abortos y de 43 % con tres o más abortos. Knudsen en 1991 reporta un 16% sin abortos previos, un 25% con un aborto previo, un 45% con dos abortos y un 54% con tres.<sup>4</sup> (Cuadro 1).

En conclusión el riesgo de presentar un aborto aumenta con el número de pérdidas previas y mujeres con historia de PGR tienen características reproductivas que las diferencian de aquellas que no presentan abortos por lo que su estudio integral dirigido es de vital importancia.

Cuadro 1 CÁLCULO DE RIESGO PARA PGR

PERDIDAS	Regan 1989	Stirrat 1990	Knudsen 1991
1	20%	21.3%	25%
2	28%	29%	45%
3	43%	31.1%	54%

Cálculo de riesgo para aborto en relación al número de abortos previos.

## ETIOLOGIA:

Los factores de riesgo asociados a la PGR se basan en factores genéticos, ambientales, endocrinos, anatómicos, infecciosos, trombofilicos, e inmunológicos.<sup>2</sup>

Wounters reporta que del 24 al 60% de todos los casos de PGR queda sin resolver o sea de origen idiopático.<sup>4-6</sup> La gran mayoría de los factores etiológicos continúan sin ningún avance científico en los últimos años teniendo auge en la actualidad aspectos trombofilicos genéticos e inmunológicos.

Los aspectos genéticos involucrados en las pérdidas gestacionales espontáneas se pueden categorizar en alteraciones citogenéticas numéricas y estructurales con o sin mosaicismo, alteraciones monogénicas o sea de un solo gen.<sup>5</sup>

Las anomalías numéricas se subdividen en aneuploidias (trisomías o monosomías) y poliploidias. Las trisomías son las más frecuentes 52%, seguidas de las poliploidias 21% y monosomías de X 13%. Las anomalías estructurales se subdividen a su vez en deleciones, translocaciones, inversiones y duplicaciones pero solo las translocaciones e inversiones tienen un papel en el aborto recurrente. Estas anomalías se ven el 6% de las causas genéticas en aborto recurrente. El mosaicismo depende de la etapa en el desarrollo embrionario en el que se produce la alteración, significando esto la presencia de dos o más líneas celulares en el mismo individuo.<sup>5</sup>

Recientemente se ha referido en la literatura la relación de polimorfismos genéticos relacionados con la pérdida gestacional recurrente, como son la mutación del factor V de Leiden, la mutación 20210 G>A de la protrombina y la mutación 677 C>T del gen de la MTHFR.<sup>4</sup> Las tres mutaciones relacionadas con defectos protromboticos, específicamente en vasculopatía placentaria.<sup>7</sup> Este trabajo se dirige al estudio molecular del polimorfismo 677 C>T del gen de la 5,10 MTHFR localizado en el cromosoma 1p36.3.

## **HOMOCISTEINA:**

La homocisteína (Hcy) es un aminoácido no esencial, sulfurado, producto del metabolismo intermedio de la demetilación del aminoácido esencial metionina.

Desde su descubrimiento en 1932 por el ganador del premio Nobel en 1955 Vincent DuVigneaud, y su asociación con la enfermedad vascular aterosclerótica prematura descrita por Kilmer McCully en 1969, la homocisteína surgió como un nuevo marcador de riesgo para la enfermedad vascular.

El aumento leve a moderado de los niveles séricos de la homocisteína se observa en un 5-7% de la población general, hay factores clínicos que se asocian con hiperhomocisteinemia (HHcy) algunos de los cuales son:

1. **EDAD Y SEXO:** La HHcy se asocia con la edad y con el género masculino, generalmente las mujeres tienen niveles de Hcy 20% más bajos que los hombres, hasta que llegan a la menopausia, cuando los niveles de Hcy en ayuno son similares para hombres y mujeres.
2. **GENÉTICOS, INCLUYENDO LA DISFUNCIÓN SECUNDARIA A VARIOS POLIMORFISMOS:** Como la deficiencia de Cistationina Beta Sintetasa, deficiencia de 5,10 metilendetrahidofolato reuctasa, deficiencia de Metionina sintetasa.
3. **INSUFICIENCIA RENAL:** Los niveles de Hcy aumentan, por aumento en su producción por un metabolismo alterado o por una disminución en su excreción por una tasa de filtración glomerular disminuida.
4. **ESTADO NUTRICIONAL:** Disminución en la ingesta de los cofactores vitamínicos (folato, vitamina B12 y B6), alteración en la mucosa gástrica que afecte el factor intrínseco, enfermedad inflamatoria del intestino como enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa.
5. **ENFERMEDADES SISTÉMICAS:** Como el hipertiroidismo, carcinomas particularmente el de mama, ovarios y páncreas, Insuficiencia renal crónica, LES, y Psoriasis.

6. **MEDICAMENTOS:** Anticonvulsivantes, como fenitoina, Metrotexate, inhibidores de la fosfodiesterasa como teofilina, L-dopa, carbamacepina, niacina, y fibratos.
7. **DISFUNCION DE LAS CELULAS ENDOTELIALES:** Cualquier causa de la disminución en la actividad de la oxido nítrico sintetasa endotelial.

Siendo los 2 principales factores que afectan la concentración de homocisteína sérica, la dieta con la ingesta de folatos y vitamina B12 y B6, y los polimorfismos en los genes que codifican las enzimas del ciclo de la homocisteína en las proteínas transportadoras de la transcobalamina.

## **FISIOPATOLOGIA DE LA HOMOCISTEINEMIA:**

Así tenemos que los efectos dañinos de la HHcy son:

1. Disfunción de las células endoteliales por la disminución de la viabilidad del óxido nítrico endotelial.
2. Toxicidad celular endotelial. (Apoptosis)
3. Proliferación de células del músculo liso, hiperplasia e hipertrofia de la intima.
4. Remodelación de la matriz extracelular, que resulta en fibrosis.
5. Promueve la vasoconstricción.
6. Promueve la modificación de LDL a LDL-C por la oxidación de sus moléculas.
7. Efecto proinflamatorio: IL-8
8. Promotor de macrófagos, con la formación de células espumosas.
9. Efectos protrombóticos al disminuir la trombosulina y los niveles de heparin sulfato, así como inhibir la actividad de la proteína C, y de la tAP principal activador del sistema fibrinolítico, también activa los factores V y XII, e induce agregación plaquetaria.
10. Pro estrés oxidativo por la autooxidación de los residuos metilo de la homocisteína con la formación de radicales libres.
11. Formación de radicales superóxido.
12. Promueve la aterogénesis, arteriosclerosis, aterosclerosis y ateroscleropatía.

Es importante señalar que el daño encontrado en el endotelio por la HHcy es diferente al encontrado por la hipercolesterolemia.<sup>24</sup>



La enzima metilendetrahidrofolato reductasa es una enzima clave en el metabolismo de la homocisteína, esta enzima cataliza la conversión de 5,10 metilendetrahidrofolato en 5 metiltetrahidrofolato la forma predominante del folato circulante. 5 metiltetrahidrofolato participa en la remetilación de homocisteína a metionina dependiente de vitamina B12, la metionina es convertida a S-adenosilmetionina que sirve como donador de grupos metilo en la metilación del ADN, proteínas, neurotransmisores y fosfolípidos.<sup>8</sup>

El primer reporte de las propiedades enzimáticas de la MTHFR fue en 1970 por Kutzbach y Stokstad. La MTHFR es una flavoproteína que consiste en dos subunidades idénticas de aproximadamente 70 kDa. La enzima contiene una región catalítica N-terminal. El gen humano de MTHFR está localizado en el cromosoma 1p36.3. La región total contiene 1,980 bp con un peso molecular de 74.6 kDa. La secuencia de aminoácidos muestra una homología en el 95% con el polipéptido de MTHFR del ratón. La organización genómica de la MTHFR consiste en 11 exones con una longitud de 102 bp a 432 bp e intrones que van de 150 bp a 1.5 kb. Se han identificado dos ARNm de 7.5 kb y 8.5 kb.<sup>9</sup>

El polimorfismo mejor caracterizado de la MTHFR consiste en una transición 677 C>T la cual resulta de una sustitución de alanina a valina en el dominio catalítico predeterminado de la MTHFR, esta sustitución vuelve a la enzima termolábil, presentado el 70% de disminución de su actividad en individuos homocigotos para la mutación y una disminución del 35% en heterocigotos in Vitro. La homocigocidad para el alelo T es asociada con niveles elevados de homocisteína en el plasma principalmente en individuos con bajos niveles de folato plasmático.<sup>13</sup> Además los niveles de homocisteína plasmáticos en individuos homocigotos para la mutación pueden ser disminuidos con la suplementación de folato.<sup>14</sup>

El segundo polimorfismo más común de la MTHFR es la transición 1298 A>C la cual resulta de la sustitución del glutamato por alanina , se ha reportado que el alelo 1298C, disminuye la actividad de la enzima MTHFR, pero no al mismo nivel que el alelo 677T .<sup>15-16</sup>

En aquellos sujetos que son heterocigotos para los alelos 677T y 1298C, lo que produce un genotipo 677CT/1298AC, se ha encontrado en algunos estudios que la actividad in Vitro de la MTHFR disminuye en un 40-50%, similar a la disminución de la actividad de la enzima presentada por los individuos homocigotos 677T , con un incremento en los niveles de homocisteína y disminución de los niveles de folatos.<sup>15</sup> Aunque recientes estudios indican que el polimorfismo 1298 A>C no contribuye significativamente a hiperhomocisteinemia, por si solo, ni en conjunción con el 677 C>T , y el efecto fenotípico del polimorfismo ha sido cuestionado desde el punto de vista bioquímico.

Los polimorfismos de la MTHFR son frecuentemente asociados con hiperhomocisteinemia, en mujeres embarazadas esta es un riesgo para defectos del tubo neural, y pérdida gestacional recurrente<sup>10-11</sup>, recientemente Gris *et al.* reportaron una asociación entre el incremento en los niveles de homocisteína y pérdida gestacional recurrente temprana primaria.<sup>12</sup>

Recientemente se ha descrito otro polimorfismo genético que influye en la concentración de homocisteína en la transición C>G de la posición 776 (776C>G) en el gen de la transcobalamina.<sup>17</sup> La transición resulta de una sustitución de arginina por prolina en el codón 259 que es el determinante principal del fenotipo de la transcobalamina en las poblaciones caucásicas. La transcobalamina transporta la vitamina B12 a los tejidos periféricos y la heterocigocidad para este polimorfismo también se ha asociado con hiperhomocisteinemia.<sup>18</sup> El tipo silvestre (sin mutación) de este gen tiene efectos positivos sobre los niveles plasmáticos de la transcobalamina, lo que puede ser importante para el transporte adecuado de vitamina B12 a las células del embrión en crecimiento.

## **PREVALENCIA DEL POLIMORFISMO 677 C>T DEL GEN DE LA MTHFR.**

Cerca de la mitad de la población general es portadora de al menos un alelo mutado del polimorfismo 677 C>T y la frecuencia del genotipo homocigoto mutado va del 1 al 20 % dependiendo de la población estudiada.<sup>19</sup>

En Europa del Norte, Frosst en 1995 encontró una prevalencia de la mutación de aproximadamente 33 al 40% en heterocigotos y 10% en homocigotos en la población caucásica.<sup>20</sup>

El genotipo TT esta presente en el 12% de la población en general, con frecuencias alélicas para T con variaciones como ejemplo 0.3 en americanos, 0.2 en asiáticos, 0.1 en afro-americanos, 0.047 en australianos, 0.066 en africanos y 0.23 en países Bálticos.<sup>9</sup>

En un estudio brasileño donde se buscó la prevalencia del estado homocigoto de la mutación encontraron una diferencia racial marcada entre brasileños, asiáticos, blancos, africanos y negros.<sup>21</sup>

## PREVALENCIA DEL POLIMORFISMO 677 C>T EN MEXICO

En México se realizó en 1999 por Mutchinick un estudio donde se buscó la frecuencia de la mutación en 250 mujeres sanas de distintas áreas geográficas del país encontrando los siguientes genotipos: CC ——— 17.6%

CT ——— 47.6%

TT ——— 34.8%.

La frecuencia de los alelos fue: C — 41.4%

T — 58.6%.<sup>22</sup>

El segundo se realizó en la ciudad de Guadalajara en el 2000 por Dávalos donde se buscó en población sana la mutación de la MTHFR, se estudiaron 102 pacientes mestizos, 50 huicholes, 38 tarahumaras, y 38 purepechas, la frecuencia genotípica fue.<sup>23</sup>

GENOTIPO	MESTIZOS	HUICHOLAS	TARAHUMARAS	PUREPECHAS
CC	31%	16%	45%	19%
CT	50%	56%	39%	48%
TT	19%	28%	16%	33%

La frecuencia de los alelos fue:

ALELO	MESTIZOS	HUICHOLAS	TARAHUMARAS	PUREPECHAS
C	56%	44%	64%	43%
T	44%	56%	36%	57%

Recientemente se realizó un estudio en el Instituto Nacional de Perinatología, donde se incluyeron pacientes mexicanas con 2 o más abortos primarios tempranos de etiología desconocida, utilizando como grupo control pacientes mexicanas sin abortos, púerperas, sin patología asociada y con recién nacido sano. Se reunieron un total de 53 pacientes con PGR temprana, en las que se excluyeron las causas conocidas de pérdida gestacional. El número total de abortos fue de 184, todos del primer trimestre, la frecuencia de genotipos de la MTHFR fue:

En las pacientes:

CC: 28.31%

CT: 33.9%

TT: 37.7%

En los controles:

CC: 24.5%

CT: 54.73%

TT: 20.75%.

La frecuencia alélica de la MTHFR en las pacientes con PGR fue:

Alelo C: 45.28%

Alelo T: 54.72%

La frecuencia alélica para las pacientes del grupo control:

Alelo C: 51.86%

Alelo T: 48.11%

(Dueñas RJ, García CR. Identificación del polimorfismo C677T de la 5-10 metil tetrahidrofolato reductasa en población mexicana con pérdida gestacional recurrente [Tesis] México, UNAM, 2004)

## **DESARROLLO EMBRIONARIO.**

El metabolismo de un-carbono durante el desarrollo embrionario ha sido estudiado, la mayoría de las veces, enfocado al desarrollo del sistema nervioso. Las mujeres embarazadas con deficiencia de folato tienen un riesgo muy aumentado de procrear niños con defectos del tubo neural, y la suplementación periconcepcional de folato, protege contra este efecto.<sup>25</sup> Los eventos moleculares que llevan a los defectos del tubo neural debido a la deficiencia de folatos no se conocen, pero pueden incluir, metilación insuficiente de los metabolitos cruciales en el desarrollo del embrión y/o anomalías en la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células neuronales, lo cual puede ser debido a la inadecuada incorporación del nucleótido de ADN que caracteriza a la deficiencia de folatos en las células proliferativas.<sup>26</sup> Además de estos eventos fundamentales, se ha observado una disminución en la viabilidad fetal.

Un estudio reciente de casos y controles mostró un incremento en el riesgo de aborto espontáneo temprano en aquellas mujeres con niveles bajos de folato plasmático. La deficiencia de vitamina B12 durante el embarazo resulta en una concentración elevada de homocisteína en el embrión e incrementa la incidencia de defectos del tubo neural, además la deficiencia hereditaria de transcobalamina da como resultado anomalías neurológicas profundas y retardo mental.

Tres estudios analizaron los efectos embriotóxicos directos de la homocisteína.

En un estudio la exposición de embriones de pollo a la homocisteína resultó en defectos del corazón y del tubo neural.

En los otros dos estudios, la exposición de embriones de ratas y ratones a la homocisteína resultó en restricción del crecimiento y anomalías del

desarrollo de las somitas, pero no en defectos neurológicos ni otros efectos teratógenos.

El mecanismo preciso de la embriotoxicidad de la homocisteína aún no se ha aclarado pero hay muchas hipótesis algunas de las cuales han sido probadas experimentalmente. Los efectos tóxicos de la homocisteína en los embriones de ratas en desarrollo pueden resultar de la formación incrementada de S-adenosilhomocisteína que puede inhibir las reacciones de metilación críticas, la concentración elevada de homocisteína puede también inhibir de novo la síntesis de deoxitimidilato (dTMP). La exposición de células Raji B-linfoides proliferativas al exceso de homocisteína o metionina incrementa la recaptura de la timidina exógena, debido a la inhibición de la reacción catalizada por la timidilato-sintetasa en la cual el deoxiuridilato (dUMP) es convertido a dTMP, es así como la 5,10 metilene tetrahidrofolato un cofactor en esta reacción es agotada en exceso de homocisteína debido al incremento en la demanda de 5 metiltetrahidrofolato para remover la homocisteína por metilación. Se cree que lo anterior induce daño al ADN por el aumento en la incorporación inadecuada de dUMP en lugar de dTMP en el ADN, seguido de reacciones de excisión-reparación, fragmentación de ADN; paro del ciclo celular y finalmente apoptosis.

En conclusión folato, vitamina B12 y homocisteína, juegan papeles muy importantes en las células en crecimiento y por lo tanto en el desarrollo embrionario. Es también posible que la homocisteína por sí misma induzca algún desorden en el desarrollo previamente atribuido a la deficiencia de ácido fólico o vitamina B12.<sup>27</sup>

## **POLIMORFISMOS DE LA MTHFR Y TC Y SU RELACION EN LA PGRT**

Ya que los defectos en el folato y la vitamina B12 dependen de metabolismo de la homocisteína, los polimorfismos de la MTHFR y TC han sido implicados como factores de riesgo de muchos desordenes del desarrollo, como defectos del tubo neural, labio y paladar hendido y síndrome de Down, aunque hay estudios que no han podido demostrar estos hallazgos.

En un estudio de Wenstrom et al. Se encontró una fuerte asociación entre los alelos FETALES 677T, concentraciones elevadas de homocisteína en el líquido amniótico y defectos del tubo neural específicamente en la espina cervical-lumbar, lumbosacra y encefalocele occipital, pero no anencefalia, exencefalia, o espina bífida confinada al sacro, estos autores concluyen que los alelos 677T de la MTHFR predisponen solo para ciertos tipos de defectos del tubo neural.<sup>27</sup>

## ALELOS 677T MATERNOS Y FETALES EN EL ABORTO ESPONTANEO

Como se mencionó anteriormente la hiperhomocisteinemia materna es un factor de riesgo para pérdida gestacional recurrente y también para pérdida gestacional temprana primaria, algunos estudios la han asociado con pérdida gestacional recurrente temprana, aunque este efecto no se replica en otros estudios. En un meta.analisis del 2004 se analizaron los estudios encontrados de pérdida gestacional, y los hallazgos de los genotipos maternos y fetales, para determinar si ser portadores de la mutación 677 C>T aumenta el riesgo de pérdidas encontrándose.<sup>27</sup>

REFERENCIA	CASOS/CONTROLES	RESULTADOS
<u>Aborto recurrente</u>		
<i>Genotipos maternos</i>		
Foka et al.	80/100	Sin riesgo
Holmes et al.	173/67	Sin riesgo.
Kumar et al.	24/24	Riesgo incrementado.
Kutteh et al.	50/50	Sin riesgo
Lissak et al.	41/18	Riesgo incrementado
Murphy et al.	40/540	Sin riesgo
Nelen et al.	185/113	Riesgo incrementado
Pihusch et al.	102/128	Sin riesgo
Wramsby et al.	84/69	Sin riesgo
<u>Aborto no recurrente</u>		
<i>Genótipos maternos.</i>		
Alfirevic et al	18/44	Sin riesgo.
Gris et al.	232/464	Sin riesgo.
Kupferminc et al.	12/110	Sin riesgo.
Many et al.	40/80	Sin riesgo.
Martinelly et al.	67/232	Sin riesgo.
Murphy et al.	24/540	Sin riesgo.

---

Aborto espontáneo

*Genotipos fetales.*

Isolato et al.	161/119	Riesgo incrementado
Zetterberg et al.	80/125	Riesgo incrementado
Zetterberg et al	76/114	Riesgo incrementado

Así tenemos que 6 estudios no encontraron asociación entre los alelos maternos 677T y pérdida fetal no recurrente, pero 5 de estos solo examinaron pérdida fetal tardía (muerte fetal después de las 19 semanas de gestación o mas), esta discrepancia en los resultados puede ser debida a que el número de muestra es relativamente pequeña.

Los efectos comunes de los alelos mutados de las enzimas MTHFR y TC, son la disminución de la viabilidad del folato y la vitamina B12 y el incremento en la concentración de homocisteína. Ya que los procesos vitales como proliferación y diferenciación celular son dependientes del folato y de la vitamina B12, mediadores en el metabolismo de la homocisteína, cualquier alteración en este pueden ser especialmente grave tempranamente en la embriogénesis cuando las células se encuentran bajo proliferación y diferenciación rápidas, por lo que hay un especial interés por analizar los embriones abortados espontáneamente para determinarles los polimorfismos de la MTHFR y de la TC y no solo a la madres de dichos embriones.

Recientemente se realizaron 4 estudios para analizar los genotipos fetales: El primero de Isotalo et al. reporta una alta prevalencia de los alelos mutados de la MTHFR en embriones abortados, este grupo consistió en tomar muestras de tejido fetal de los abortos sucedidos espontáneamente y aquellos terapéuticos, lo cual disminuye la validez del estudio.

Se realizó pues un nuevo estudio por Zetterberg et al. donde solo se incluían embriones abortados espontáneamente (muerte fetal entre 6 y 13 semanas después de la concepción), encontrándose un OR significativo para aborto espontáneo de 14.2 (95% IC 1.78-113;  $p = 0.001$ ), cuando se comparó la prevalencia de uno o mas alelos 677T y 1298C contra el genotipo silvestre combinado CC/AA, en casos y controles, se encontró que el polimorfismo de la MTHFR tiene un mayor impacto en la supervivencia fetal.

La prevalencia de la mutación del TC 776G, está significativamente incrementada en embriones abortados en los cuales la prevalencia del genotipo silvestre fue mucho menor que en los controles (9.1% y 32.2% respectivamente con  $p < 0.001$ ).

Se ha establecido la posibilidad de la interacción gen-gen de los polimorfismos de la MTHFR y TC en abortos espontáneos, ya que los embriones que presentan los genotipos combinados MTHFR 677TT y TC 776CG o 776GG, presentan el metabolismo de homocisteína mas alterado que aquellos en los que solo se encuentra un gen con polimorfismo.

Por ultimo otro posible mecanismo hasta ahora inexplorado, es el del tipo de interacción genética materno-fetal en los abortos espontáneos. El polimorfismo 677 C>T confiere un riesgo aumentado para defectos del tubo neural si la madre y su hijo son homocigotos para el alelo 677T, comparado con el riesgo que presentaría si solo la madre o el hijo fuesen homocigotos, coincidiendo en que los niveles de homocisteína en el embrión son mayores si el feto y la madre presenta hiperhomocisteinemia asociada a los polimorfismos en el gen de la MTHFR y TC, y si la hipótesis de la embriotoxicidad de la homocisteína fuese comprobada, esto incrementaría aún mas el riesgo de presentar aborto espontáneo.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **OBJETIVOS E HIPOTESIS:**

Objetivo general:

Determinar la mutación 677 C>T del gen de la MTHFR en parejas mexicanas con pérdida gestacional recurrente temprana.

Objetivos Específicos:

- 1.- Localizar la mutación 677 C>T del gen de la MTHFR por medio de la técnica PCR en pacientes mexicanas con PGR temprana y sus parejas.
- 2.- Describir la prevalencia de la mutación 677 C>T del gen de la MTHFR en pacientes con pérdida gestacional recurrente temprana y sus parejas.

### **HIPOTESIS:**

La presencia del polimorfismo 677 C>T en estado homocigoto en la madre o el feto es un factor de riesgo que incrementa los niveles de homocisteína y genera embriotoxicidad y disminución de la viabilidad embrio-fetal.

### **DISEÑO DEL ESTUDIO:**

Tipo de investigación: Clínica

Tipo de Diseño: Transversal.

Características del estudio: Observacional descriptivo.

#### METODOLOGIA:

Lugar y duración: INPer de Enero de 2003 a Enero de 2005.

#### UNIVERSO:

Pacientes con pérdida gestacional recurrente temprana (2 o mas abortos ) y sus parejas.

Unidades de observación: Pacientes con pérdida gestacional recurrente temprana.

Método de muestreo: No probabilística de casos consecutivos.

#### CRITERIOS DE INCLUSION:

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

Parejas de estas pacientes.

#### CRITERIOS DE EXCLUSION:

Pacientes con pérdida gestacional recurrente con etiología conocida.

Pacientes que no acepten el estudio.

#### VARIABLES DEL ESTUDIO:

Variable dependiente: Pacientes con pérdida gestacional recurrente temprana.

Variable independiente: Mutación 677 C>T del gen de la MTHFR.

Variable cualitativa: Dicotómica.

Nivel de medición: Ausente o presente.

## RECOLECCION DE LAS MUESTRAS:

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

- 1.- Se tomó una muestra de sangre (5 ml) y se colocó en un tubo Vacutainer con EDTA.
2. Se extrajo su ácido desoxirribonucleico (ADN) y se realizó PCR-RFLP para determinar la presencia de las mutaciones 677 C>T mediante la digestión con enzimas de restricción *Hinf* I del producto de PCR de 228 bp. Los individuos silvestres solo muestran una banda en el gel de agarosa de 234bp, mientras que los heterocigotos (CT) muestran dos fragmentos (234 y 181 pb) y los homocigotos para la mutación solo muestran el fragmento de 181 bp.

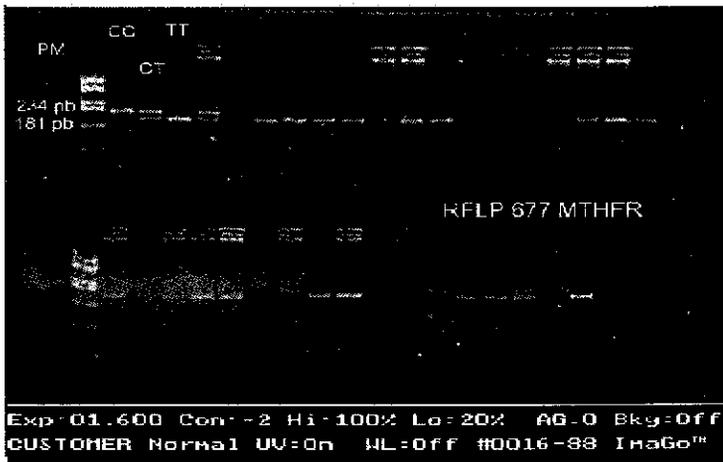
Iniciadores de PCR para la mutación 677 C>T



Las condiciones de la reacción para PCR fueron 50 ng de cada iniciador, 02 mM de los desoxinucleótidos, 1mc de amortiguador de reacción, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5% (v/v) de DMSO, 0.5 U de Taq DNA Pol, 1 de agua desionizada c.b.p. 50 uL.

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

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



## RESULTADOS

Se estudian un total de 118 pacientes, 59 parejas del Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" que presentan dos o más pérdidas gestacionales tempranas, a quienes se les realizó el protocolo de estudio de la Clínica de Riesgo Pregestacional que constó de cariotipo, anticuerpos anticardiolipina, anticoagulante lúpico, ultrasonido ginecológico, prueba de dilatadores, glucemia sérica, pruebas de funcionamiento tiroideo, perfil de TORCH, chlamydia, mycoplasma ureaplasma, siendo todos estos resultados negativos, por lo que la pérdida gestacional recurrente temprana en estas parejas se clasificó como de etiología desconocida.

El resultado de la presencia del polimorfismo, se muestra en la tabla 1, donde se puede observar si cada uno de los miembros de la pareja es genotipo silvestre es decir sin polimorfismo en cuyo caso se expresa con CC, si solo presenta un alelo mutado lo que se expresaría con CT o si presenta la mutación en ambos alelos, es decir homocigoto pero para el polimorfismo expresándose TT, así los dos miembros de la pareja son estudiados para poder evaluar un efecto sobre el feto.

No. CASO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
MUJER	C	C	T	T	T	C	C	C	T	T	C	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
HOMBRE	C	C	C	C	T	C	T	T	T	T	C	T	C	C	C	C	C	C	T	C	C

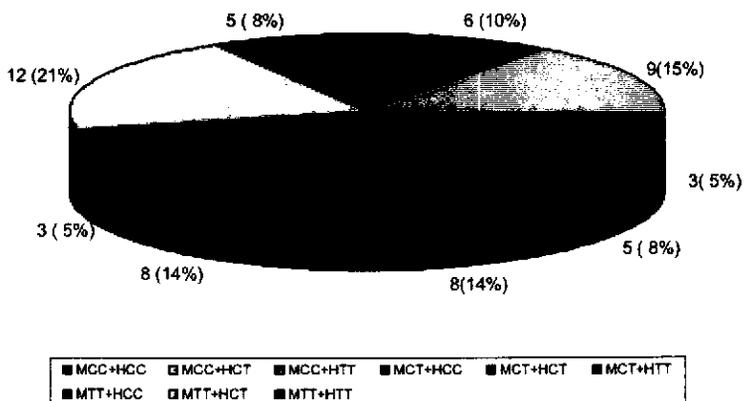
No. CASO	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
MUJER	C	C	T	T	C	T	C	T	T	T	C	T	C	C	C	C	C	T	C	T	C
HOMBRE	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	C	T	T	C	T	C	T	C	T	T	T

No. CASO	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	
MUJER	C	T	T	T	T	C	T	T	T	C	C	T	C	T	C	T	C	T	T	C
HOMBRE	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T

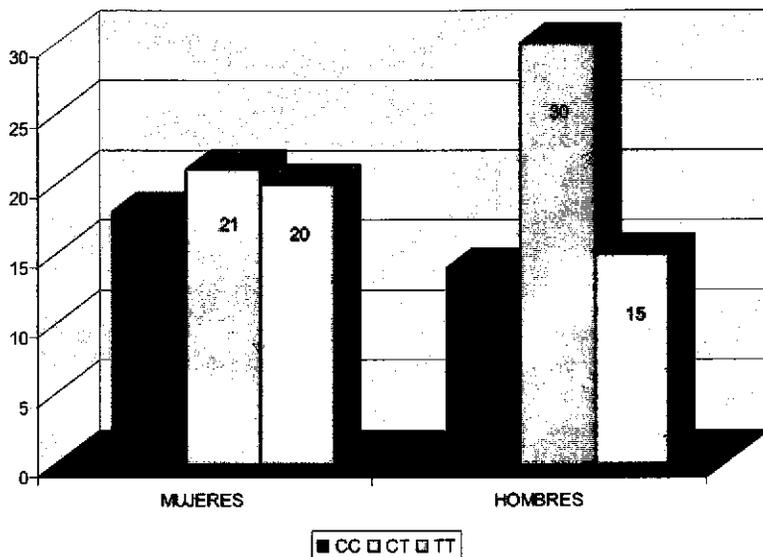
Tabla 1.

Registro del genotipo de las cincuenta y nueve parejas estudiadas, donde CC corresponde a homocigoto sin mutación, CT heterocigoto, y TT homocigoto con la mutación.

### COMBINACION DE GENOTIPOS POR PAREJAS



### GENOTIPO DEL POLIMORFISMO 677 C>T DISTRIBUIDO POR SEXO



GENOTIPO	MUJERES	HOMBRES	TOTAL
CC	18	14	32
CT	21	30	51
TT	20	15	35

Tabla 2:

Genotipo del polimorfismo 677 C>T reportado en mujeres y hombres.

MUJERES	HOMBRES	TOTAL
CC	CC	6
CC	CT	9
CC	TT	3
CT	CC	5
CT	CT	8
CT	TT	8
TT	CC	3
TT	CT	12
TT	TT	5

Tabla 3:

Distribución de genotipos CC, CT y TT por pareja.

Se identifica en la mujer el genotipo **TT** en 20/59 casos (33.8%), **CT** en 21/59 (35.5%) y **CC** en 18/59 (30.5%) con una prevalencia del alelo mutado de 51.6%, en los varones el genotipo **TT** en 15/59 (25.4%) casos **CT** en 30/59 (50.8%) casos y **CC** en 14/59 (23.7%) casos lo que determina una frecuencia alélica de **T** de 50.8%. El riesgo materno al presentar genotipo **TT** es de 33.8% y el riesgo fetal por la combinación M/P de **T** es de 57.6%.

## DISCUSION:

Numerosos estudios han reportado la posible relación del polimorfismo 677C>T del gen de la MTHFR y las pérdidas gestacionales recurrentes. Sin embargo, otros estudios no han encontrado asociación con la pérdida no recurrente o con la pérdida fetal después de las 19 semanas de gestación. Existen variantes importantes que pudiesen generar confusión en la relación de la pérdida gestacional y la mutación, y estas pueden ser: la edad materna avanzada, la pérdida tardía, la nutrición y las diferencias étnicas entre las poblaciones estudiadas, lo que genera resultados discrepantes o bien que la muestra estudiada haya sido pequeña y por lo tanto de poco poder estadístico, lo que mostraría una baja probabilidad de detectar diferencias.

Uno de los puntos importantes del estudio es el cálculo de riesgo en el genotipo fetal donde el efecto del polimorfismo CT y TT podría aumentar la concentración de homocisteína, que durante la proliferación y diferenciación celular, fundamentales en la embriogénesis, pueden ser alterados y generar la pérdida gestacional, no ocurre lo mismo en el caso del genotipo materno CT, donde el riesgo solamente se incrementa para pérdida gestacional cuando el genotipo es TT.

Los datos obtenidos en este estudio nos permiten generar un cálculo de riesgo para pérdida gestacional relacionada con el genotipo materno del polimorfismo en estado homocigoto, donde se registra en un 33.8% considerando que el estatus de homocisteína en estas pacientes se encuentra elevado y determine el riesgo de pérdida fetal.

La contribución paterna del alelo mutado 677T en el caso de heterocigotos CT corresponde al 50.8% y homocigotos TT el 25.4%, lo cual incrementa la posibilidad de que el feto se integre de un genotipo de alto riesgo como es TT homocigoto para la mutación, de tal manera que las parejas donde ambos presentan homocigosis para el polimorfismo son 5/59 con riesgo del 100%. En 8/59 parejas el genotipo de la pareja es CT/CT que genera un riesgo del 25% de que el feto presente TT. 20 parejas con genotipo CT/TT o TT/CT tendrían un riesgo del 50%. Como resultado en 23/59 parejas su pérdida gestacional no se asocia a genotipo materno ni fetal, por lo que podrían considerarse por el momento como pérdidas gestacionales de etiología idiopática que podría relacionarse con otros polimorfismos génicos.

Es interesante hacer notar que 36 parejas presentan genotipo de riesgo materno y/o fetal lo que corresponde a un poco más del 61.01% de las parejas estudiadas, lo cual sustenta indicar el estudio del polimorfismo 677C>T de la MTHFR en las parejas con pérdida gestacional recurrente.

El polimorfismo 677 C>T de la MTHFR en la población mexicana se comporta con patrón hereditario de transmisión autonómico recesivo.

La importancia de estos estudios radica en la posibilidad de reducir el efecto del polimorfismo al disminuir la concentración de homocisteína indicando terapia periconcepcional con ácido fólico, la dosis indicada en estos casos donde el genotipo es un factor de riesgo tanto en forma heterocigoto como homocigoto por línea materna es de 4 a 5 mg diariamente 3 meses previos a la concepción y durante las primeras 12 semanas de gestación, combinado con una dieta balanceada rica en vegetales, como mínimo 100g diarios.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. Speroff L. Recurrent Early Pregnancy Losses. En: Speeroff L. Glass R. Kase N. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 6ta ed Atlanta: Lippincott Williams and Wilkins, 1999.p 1043-1056.
2. Hill JA. Diagnóstico y tratamiento de la pérdida recurrente del embarazo En: Remohí J, Pellicer A, Simón C, Navarro J, Reproducción humana 2 ed Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2002. p 607-12.
3. Hatasaka H. Recurrent Miscarriage: Epidemiologic factors, definitions and incidence. Clin Obstet Gynecol 1994; 37(3):625-634.
4. Regan L. Rai R. Epidemiology and the medical causes of miscarriage. Clin Obstet Gynecol 2000; 14(5): 839-854.
5. Goddijn M. Leschot N. Genetic Aspects of Miscarriage. Baillieres Clin Obstet Gynecol 2000; 14(5):855-865.
6. Wounters M. et al. Hyperhomocysteinemia: A Risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. Fertil Steril 1993;60:820-5
7. Cunningham F. et al. Disease and injuries of the fetus and newborn En: Cunningham F, Williams Obstetrics 21va ed McGraw Hill; 2001. p 1073-8.
8. Mattson MP, Shea TB: Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. Trends Neurosci 2003, 26:137-146.
9. Fodinger M. Walter H. Sunder G. Molecular Biology of 5,10 – Methylene tetrahydrofolate Reductasa. J Nephrol 2000, 13:20-33.
10. Steeger-Theunissen RP et al. Hyperhomocysteinemia and recurrent spontaneous abortion or abruption placentae. Lancet 1992,339:1122-1123.
11. Nelen WL: Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. Fertil Steril 2000, 74:1196-1199.
12. Gris JC et al. Antiphospholipid/antiprotein antibodies, hemostasis-related autoantibodies, and plasma homocysteine as risk factors for a first early pregnancy loss: a matched case-control study. Blood 2003, 102:3504-3513.

13. Jacques PF et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996, 93:7-9.
14. Malinow MR, et al. The effects of folic acid supplementation on plasma total homocysteine are modulated by multivitamin use and methylenetetrahydrofolate reductase genotypes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997, 17:1157-1162.
15. Weisberg I et al. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998, 64:169-172.
16. Chango A et al. The effect of 677C>T and 1298A>C mutation on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. *Br J Nutr* 2000, 83:593-596.
17. Zetterber H. et al. The transcobalamin codon 259 polymorphism should be designated 776C>G, not 775G>C. *Blood* 2003, 101:3749-51.
18. Namour F et al. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood* 2001,97:1092-1098.
19. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: HuGe review. *Am J Epidemiol* 2000, 151:862-877.
20. Holmes Z, Regan L, Chilcott I, Cohen H. The C677T MTHFR gene mutation is not predictive of risk for recurrent fetal loss. *Br J Haematol* 1999, 105:98-101.
21. Franco F. et al. Analisis of the 677 C>T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in diferente ethnic group. *Thromb Haemost* 1998, 79:119-21.
22. Mutchinick O, Lopez M, Luna L, Waxman J, Babinsky V. High prevalence of neural tube defects. *Mol Genet Metab* 1999,68:461-7.
23. Dávalos I. et al. The 677 C>T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Ann Genet* 2000, 43:89-92.

24. Hayden MR, Tyagi SC. Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy : The pleiotropic effects of folate supplementation. *Nutrition Journal* 2004,3:4.
25. Van der Put NM, van Straaten HW, Trijbels FJ, Blom HJ. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp Biol Med* 2001,226:243-270.
26. Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2003, 26:137-146.
27. Zetterberg H. Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphism in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. *Reproduc biol endocrinol* 2004,2-7.

## **ANEXOS:**

### **CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO**

**ASPECTOS ETICOS:** Carta de consentimiento para la toma de muestra sanguínea.

#### **TEXTO INFORMATIVO:**

Estimados pacientes:

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

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

El estudio consiste:

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

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

Yo

---

(Nombre de la Paciente)

Declaro libremente que he leído la información correspondiente, que me han aclarado todas mis dudas y que voluntariamente estoy de acudo en participar en la investigación "ESTUDIO DEL POLIMORFISMO 677 C>T DE LA 5,10 METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA EN PAREJAS CON PERDIDA GESTACIONAL RECURRENTE TEMPRANA", cuyo objetivo, procedimiento, beneficios y riesgo se me han explicado previamente.

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

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

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

México D.F. a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 200\_\_

Paciente \_\_\_\_\_

Investigador \_\_\_\_\_

Testigo \_\_\_\_\_

Testigo \_\_\_\_\_