



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Instituto Nacional de Perinatología  
Isidro Espinosa de los Reyes**

**Estudio del Polimorfismo A2756G del Gen  
MTR, en Pacientes con Defectos del Tubo  
Neural, Sitio 2, Anencefalia.**

**Tesis**

**Que para obtener el titulo de:**

**Especialista en Ginecología Y Obstetricia**

**PRESENTA**

**JEAN PAUL SULAIMAN KARAM  
PROFESOR TITULAR: Dr. Valentín Ibarra Chavarría**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. Ricardo García Cavazos**



**MEXICO, D.F.**

**2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Autorización de tesis**

**Estudio del Polimorfismo A2756G del Gen MTR, en Pacientes con Defectos del Tubo Neural, Sitio 2, Anencefalia**

---

**Dr. Ricardo García Cavazos.**  
**Director de Enseñanza Instituto Nacional de Perinatología**  
**Isidro Espinosa de los Reyes y Director de Tesis**

---

**Dr. Valentín Ibarra Chavarría.**  
**Profesor Titular del Curso Instituto Nacional de Perinatología**  
**Isidro Espinosa de los Reyes**

## **DEDICATORIA**

**A MIS PADRES** *Por su incondicional apoyo desde el momento en el que nací y por todo lo que me han brindado para poder llegar aquí. Este éxito es de ustedes y para ustedes, gracias por todo.*

**A MIS HERMANOS RAFAEL Y KARLA** *Gracias por estar ahí siempre en las buenas y en las malas y enseñarme que existen mil cosas allá afuera además de la medicina.*

**A MI ABUELA NOUR** *Porque a pesar de que nos dejó hace tiempo siempre ha estado conmigo en todo momento, y hasta el último minuto de su existencia me mostró el verdadero ejemplo de superación, valor, amor, humildad y unión en la vida.*

## **AGRADECIMIENTOS**

**DR. JOSE ROBERTO AHUED AHUED** *Mi queridísimo tío, gracias por brindarme tu ayuda, tus consejos, pero sobretodo, ese enorme ejemplo de humildad tenacidad, liderazgo, bondad y superación en este nuestro medio y en la vida.*

**DR. RICARDO GARCIA CAVAZOS** *Por su enorme ayuda para realizar éste y otros proyectos, así como su enseñanza y paciencia por más de diez años.*

**A MI FAMILIA ENTERA.... TIOS, TIAS, PRIMOS, PRIMAS** *Gracias por su incondicional apoyo en todo momento y a toda hora de mi vida.*

**A MI PRIMO Y HERMANO MAU** *Gracias por ser como eres y apoyarme en todo momento y a toda hora..... Esto también va por **TANIA** que pronto estará con nosotros*

**A TODOS MIS AMIGOS y COMPAÑEROS** *Por su apoyo y comprensión a toda hora.*

**AL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA Y A LAS PACIENTES**  
*Gracias por permitirme poder aprender de ustedes y para ustedes.*

**A DIOS** *Por darme la vida y permitirme llegar hasta aquí.*

*Nuestro más profundo agradecimiento y reconocimiento a los **LABORATORIOS VALDECASAS**, los cuales proporcionaron gran parte del material y equipo para que esto fuera posible*

## **INDICE**

AUTORIZACION DE TESIS.....	I
INDICE.....	II
DEDICATORIAS.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN.....	V
SUMMARY.....	VI

### **CAPITULO 1**

INTRODUCCION.....	1
OBJETIVO.....	14
HIPOTESIS.....	15
JUSTIFICACION.....	15

### **CAPITULO 2**

METODOLOGIA.....	16
DEFINICION OPERATIVA DE VARIABLES.....	16
ANALISIS ESTADISTICO.....	21

### **CAPITULO 3**

RESULTADOS.....	23
-----------------	----

### **CAPITULO 4**

DISCUSION.....	31
----------------	----

### **CAPITULO 5**

CONCLUSIONES.....	32
-------------------	----

### **CAPITULO 6**

<i>BIBLIOGRAFIA</i> .....	35
---------------------------	----

## RESUMEN

Los defectos del tubo neural (DTN) se presentan en México con una prevalencia de 4 a 8 por 1000 nacimientos. Estos defectos en el desarrollo se deben a una falla en el cierre y/o por reapertura del tubo neural, que se produce entre la segunda y quinta semana de la vida intrauterina. Los DTN son un grupo de malformaciones conocido como espina bífida abierta que incluyen mielomeningocele, encefalocele y **anencefalia**. La hiperhomocisteinemia se ha propuesto como factor de riesgo para su aparición así como la disminución de la vitamina B12 en las madres. Hoy la relación de los DTN y polimorfismos génicos son el motivo más importante de estudio dado que permite generar estrategias predictivas y preventivas para reducir la incidencia de este problema en el mundo.

Por tal motivo el objetivo del éste trabajo se basa en conocer la frecuencia de la mutación A2756G en el gen de la Metionina Sintasa (MTR) en la población mexicana y su asociación con la presencia de **anencefalia**.

Se realizó el análisis molecular de 236 individuos para el polimorfismo A2756G del gen MTR divididos en 116 casos y 120 controles de población abierta por PCR-RFLP

El polimorfismo A2756G del gen MTR se identificó en forma de homocigoto silvestre (AA) en el 80% de los casos y en el 67% de los controles, para la forma heterocigoto (AG) se observó en el 20% y 27% respectivamente, cabe señalar que la forma homocigoto (GG) que se presume implica riesgo para el manejo de la homocisteína no se identificó en ningún individuo de los casos, sin embargo, en los controles fue detectado en un 6%. Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico con SPSS para Windows aplicándoles razón de momios con lo que se concluyó que éste polimorfismo en la población mexicana no implica un mayor riesgo para el origen de los defectos del tubo neural, sitio 2, **anencefalia**

## **ABSTRACT**

Neural tube defects (NTD) have a prevalence in Mexico oscillating from 4 to 8 live births with a very high difference between the center and the rest of the country. These developmental disorders are originated from failure in the closure or reopening of neural tube in the second to fifth week of intrauterine development.

NTD are a group of disorders known as bifid spina, myelomeningocele, encephalocele and anencephaly.

Today the relationship between NTD and certain genetic polymorphism is the most important reason of study because it generates predictive and preventive strategies to reduce the incidence of this worldwide problem.

The aim of this study is based to know the frequency of the polymorphism A2756G on the MTR gene in Mexican population and its relationship with anencephaly.

Molecular analysis of 236 individuals was performed for A2756G polymorphism. Study groups were splitted in 116 cases and 120 controls PCR and RFLP techniques were performed.

Wild homozygous individual for this polymorphism were identified in 80% of the cases and 67% of controls. Heterozygous were observed in 20% of cases and 27% of control population. Mutated homozygous genotype, was not observed in any case but 6% of controls. Results were subjected to statistical analysis with SPSS for Windows applying OR, concluding that this polymorphism in Mexican population is not implicated in the origin of NTD, position 2, anencephaly.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

Los DTN, representan un problema de salud pública en México, por lo que es imprescindible contar con marcadores predictivos para caracterizar poblaciones en riesgo. La elevación de homocisteína es un factor de riesgo para defectos del tubo neural y en ocasiones la vía metabólica afectada no es la de la Metilentetrahidrofolato reductasa por lo que el estudio busca vías alteradas para explicar la hiperhomocisteinemia como factor de riesgo. El estudio se orienta a conocer la frecuencia del polimorfismo A2756G en el gen MTR y su asociación con este defecto para establecer estrategias de identificación de riesgo y prevención de esta patología.

Es fundamental conocer la distribución de dicho polimorfismo y su contribución como marcador de susceptibilidad en los DTN en nuestra población.

## I. INTRODUCCION

Las malformaciones congénitas son defectos estructurales del desarrollo, resultado de alteraciones durante el proceso de embriogénesis muy tempranamente en el proceso de diferenciación. La mayor parte de las mismas son de etiología multifactorial, resultado de la interacción de un factor genético con factores ambientales aditivos muy diversos. En general se ignora cuáles y qué tantos genes son responsables de la mencionada predisposición y qué tipo de factores ambientales pudieran estar involucrados <sup>(1)</sup>.

En México las malformaciones congénitas tienen una incidencia de 19.4 por 10,000 nacimientos registrados, como resultado estas alteraciones ocupan el cuarto lugar entre las causas de mortalidad en el primer año de vida <sup>(2)</sup>. Por cada niño que fallece a causa de algún defecto congénito el primer año de vida, 5 viven, estos últimos, presentan incapacidad permanente <sup>(3)</sup>. Las malformaciones o defectos congénitos estructurales más frecuentes son: los defectos del tubo neural (DTN) que son responsables del 10.9% del total de las malformaciones congénitas <sup>(4)</sup>.

La prevalencia de los DTN es diferente según el área geográfica, el grupo étnico, predisposición genética y factores ambientales de riesgo <sup>(5)</sup>. Los países de la Europa mediterránea presentan una tasa de prevalencia al nacimiento de DTN cercana al 1 por 1.000 nacimientos <sup>(1)</sup>, similar, a la de California <sup>(6)</sup> e inferior a la de China <sup>(7)</sup>, Canadá, México e Islas Británicas, y superior a la de Finlandia <sup>(1)</sup>. La prevalencia en México es de 4 a 8 por 1000 nacimientos dependiendo del estado de la Republica Mexicana al que hagamos referencia; comparada con una tasa de 0.6 por 1000 en Norteamérica en raza blanca. <sup>(3)</sup>

El riesgo de recurrencia de DTN en una mujer que ha sido afectada previamente, es 10 veces mayor que el riesgo para la población general. Los DTN de deben a una falla en el cierre del tubo neural; aunque también se admite la posibilidad de la reapertura de un tubo neural previamente cerrado como causa de un pequeño número de DTN; que espontáneamente se produce entre la segunda y quinta semana de la vida intrauterina <sup>(8)</sup>. Frente al cierre único o de cremallera, la teoría del cierre múltiple del tubo neural explica mejor la heterogeneidad clínica y etiológica de estos defectos. Por un lado, explica los distintos tipos clínicos de DTN (anencefalia, encefalocele, espina bífida alta y baja, craneorraquisquisis) según el punto de cierre afectado, incluidos los DTN discontinuos en el mismo paciente. Por otro, justifica su etiología heterogénea al suponer que puede existir un control génico diferente para los distintos sitios de cierre.

Se han propuesto 5 puntos de cierre en el humano.

El cierre 1 comienza en los somitas 1 a 3 y procede bidireccionalmente; caudalmente progresa hacia el neuroporo posterior y forma la medula espinal. En sentido anterior, el cierre llega más allá de las placodas óticas en el extremo posterior del romboencéfalo. El cierre 2 se inicia en la porción cefálica en la unión del prosencéfalo y mesencéfalo y progresa de forma bidireccional. En sentido caudal, el cierre prosigue hasta el fin del extremo anterior del romboencéfalo, mientras que rostralmente progresa sobre la porción anterior del prosencéfalo, donde se encuentra con la parte caudal del cierre 3. Este cierre 3 es unidireccional, adyacente al estomodeo y progresa de forma caudal hasta encontrarse con el cierre 2. El cierre 4 se sitúa sobre el romboencéfalo, pero ocurre de forma diferente: los pliegues se aproximan pero no se fusionan como en los otros puntos, completándose el cierre por una membrana epitelial sobre esta área. El cierre 5 es el más caudal en la zona lumbosacra (entre L2S2) y su falla produce espina bífida. (fig 1)

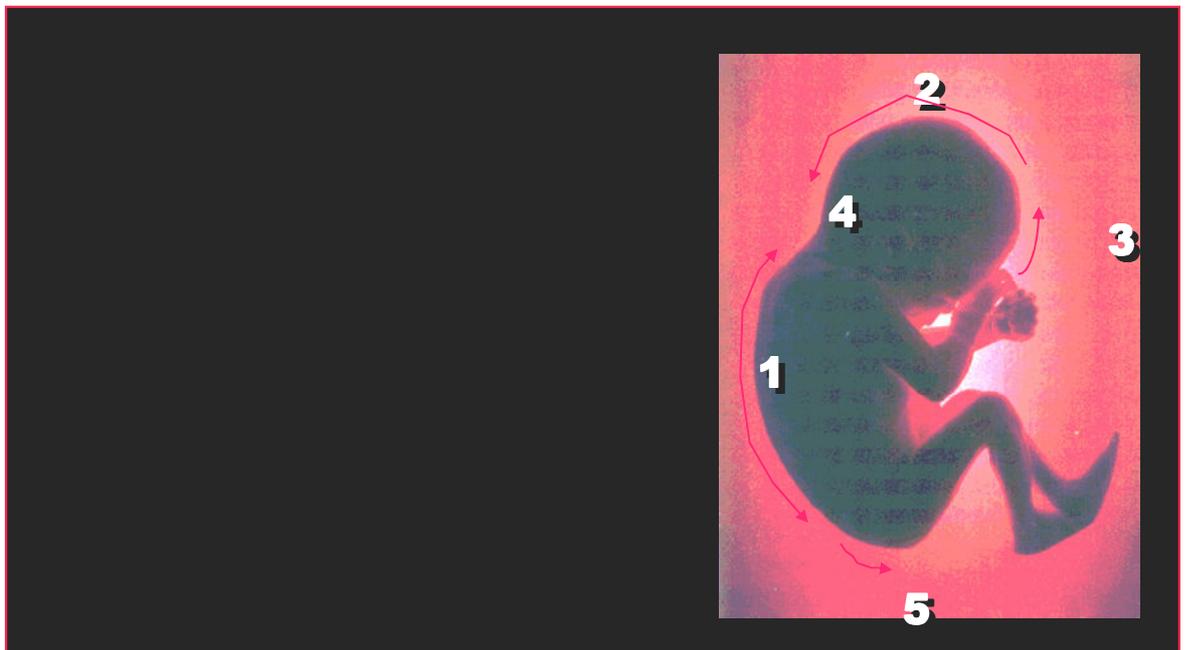


Fig 1 Puntos de cierre del tubo neural

La anencefalia resulta del fallo del cierre 2 en la meroacrania . La craneorraquisquis del fallo de los cierres 1, 2 y 4. . La espina bífida es un déficit en la fusión rostral o caudal del cierre 1 y del cierre (Fig II) El fallo del cierre 3, muy infrecuente, se caracteriza clínicamente por una hendidura mediofacial que se extiende desde el labio superior a través del hueso frontal (faciosquisis) o bien por una protrusión frontalu ocular. los neuroporos prosencefálico y mesencefálico, mientras que los occipitales resultan de una fusión incompleta de la membrana del cierre 4 Los cefalocelos frontales y parietales se producen en las áreas de unión de los cierres 3-2 y 2-4 respectivamente (fig.III), en cambio el encefalocelo frontal involucra el sitio 3 y el occipital el sitio 4 (fig.III A y B).

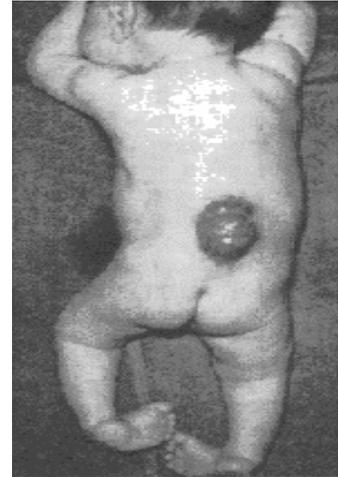


Fig II Espina bífida por fallo en el cierre del puntos 1+5



Figura III) Encefalocelo por fallo del punto 4.

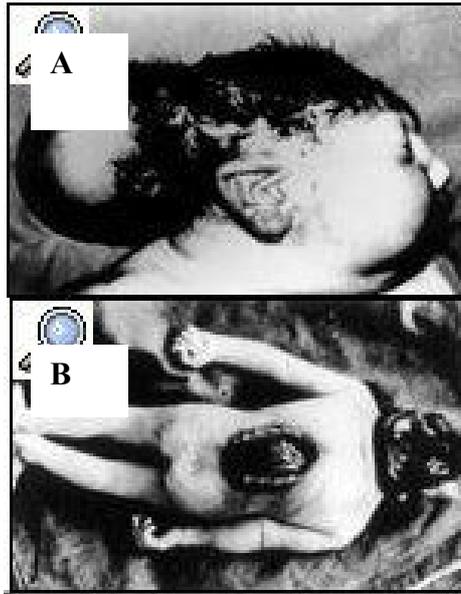


Figura III)a. Encefalocele por fallo del punto 4 b Defecto del tubo neural discontinuo, fallo del punto 4 y fallo del punto1

Se ha puesto de relieve la heterogeneidad clínica para los DTN (distintos tipos clínicos, presentación aislada o asociada a otras malformaciones) <sup>(9)</sup> que se ha utilizado para intentar explicar su heterogeneidad etiológica <sup>(10)</sup>.

Exceptuando el pequeño grupo de los DTN de etiología conocida génica, cromosómica y ambiental, la mayoría se presentan clínicamente aislados y se admite para ellos una causa multifactorial resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales <sup>(11)</sup>.

Uno de los factores del ambiente de mayor importancia en el desarrollo de DTN es la disminución en la concentración de ácido fólico, debida a un inadecuado estado nutricional de la madre, el cual puede aumentar la probabilidad de desarrollar una malformación congénita del sistema nervioso central, principalmente en la etapa periconcepcional. Se ha comprobado por estudios observacionales que en mujeres fértiles que aumentan el consumo de alimentos ricos en folato y/o toman suplementos de ácido fólico antes del embarazo disminuye la ocurrencia y recurrencia de DTN. <sup>(12,13)</sup>

Los factores genéticos implicados en el desarrollo de DTN se empezaron a sospechar alrededor de los 80's por Toriello, Higgins y Jensson, observando mayor incidencia de estos defectos en diferentes individuos de la misma familia. <sup>(14,15)</sup>

La disminución de la concentración sérica de folatos y de cobalamina, ambos cofactores de las enzimas involucradas en el metabolismo de la homocisteína y la elevación de la concentración sérica de ésta, indican un metabolismo deficiente de estos micronutrientes, que ha sido observado en madres de hijos con DTN. Por lo que la relación entre ácido fólico y prevención de DTN ha enfocado la atención a los genes que envuelven el metabolismo del folato.<sup>(16)</sup>

El mecanismo exacto por el cual el folato afecta el desarrollo normal del sistema nervioso central aún se desconoce. Lo cierto es que el folato juega un papel esencial en el desarrollo del embrión a través del transporte de carbonos en la síntesis de DNA, división celular, crecimiento celular y tiene importancia fundamental en la metilación del DNA. Asimismo es un cofactor en la regulación de la expresión génica y protege la estructura de los cromosomas y su comportamiento normal.<sup>(17)</sup> La deficiencia de ácido fólico está asociada con mecanismos de metilación anormal de DNA, rompimiento de hebras de DNA, alteración en la recombinación y segregación anormal de los cromosomas.<sup>(18)</sup>

El ácido fólico es una molécula compleja formada por 2-amino-4-hidroxi-pteridina unido a ácido p-aminobenzoico constituyendo al ácido pterico, el cual combinado con un variable número (de 1 a 9) residuos de ácido glutámico. La mitad de este glutamato es la estructura del ácido pterico y los otros unen amidas envolviendo el grupo -carboxil del glutamato (Fig. IV).

En la dieta el folato existe como 5-metil- y 10-formiltetrahidrofolato en forma de poliglutamato que no puede atravesar la membrana celular. Y debe ser hidrolizado enzimáticamente por una enzima folipoliglutamato conjugasa a la forma monoglutamato que se absorbe en el intestino.<sup>(19)</sup>

Una vez que el fólato ha entrado al eritrocito por transporte de membrana específico, ocurre síntesis intracelular de poliglutamatos dependiendo de las necesidades celulares, también mantiene un gradiente de concentración a favor de la entrada de folato monoglutamato dentro de la célula.

La reconversión de poliglutamatos a monoglutamatos permite el transporte a través de la membrana basolateral dentro de la circulación porta, principalmente como 5metiltetrahidrofolato<sup>(20)</sup>. La mayoría de este folato es tomado por el hígado, el cual juega un papel importante en la homeostasis del fólato, la célula lo toma por receptores específicos para folatos.

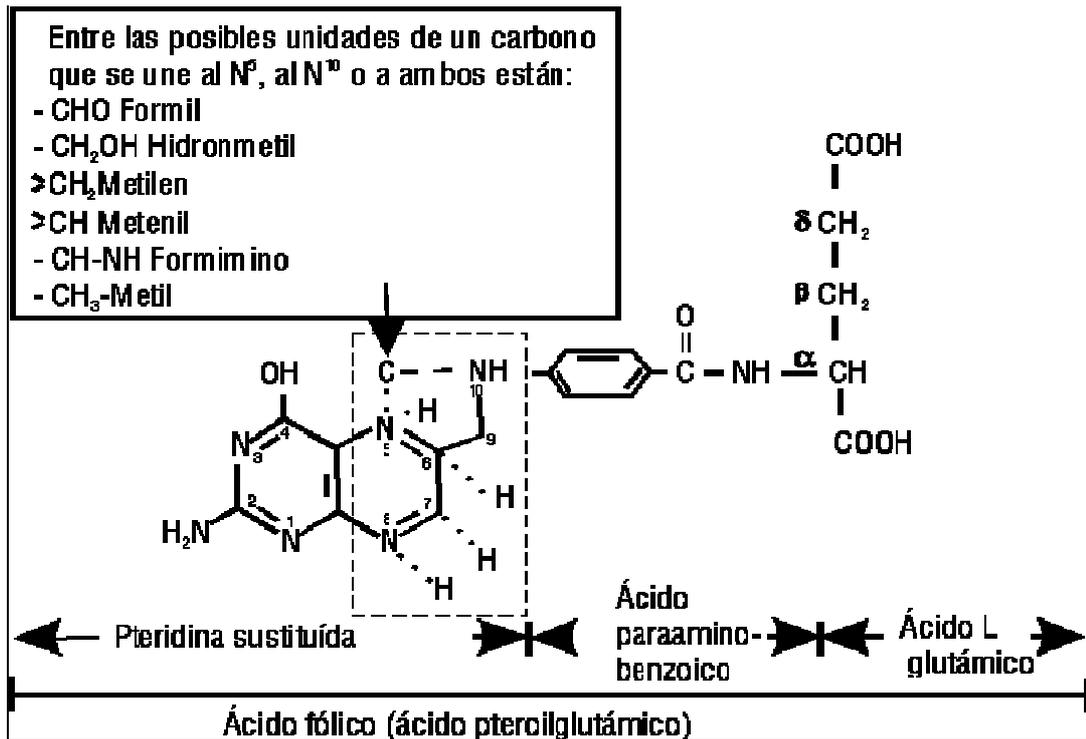


Fig. IV. Estructura química del ácido fólico.

Tres vitaminas del complejo B están involucradas en el metabolismo de la homocisteína: la forma activa de la vitamina B<sub>6</sub> es el cofactor de la enzima cistationina β-sintasa, la vitamina B<sub>12</sub> es el cofactor de la metionina sintasa y sustrato de la enzima 5-metiltetrahidrofolato, y la formación del metiltetrahidrofolato es catalizada por la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), una enzima dependiente de vitamina B<sub>2</sub>.<sup>(8,15,19,23,24)</sup>

El metabolismo de la homocisteína (y por lo tanto también de folatos) juega un importante papel en lo que también es llamado “metabolismo de 1-carbono” abasteciendo grupos metilos a toda clase de sustancias, incluyendo síntesis y regulación de DNA y mRNA, los cuales también son esenciales para las células embrionarias.<sup>(8, 18,19, 23, 24,)</sup>

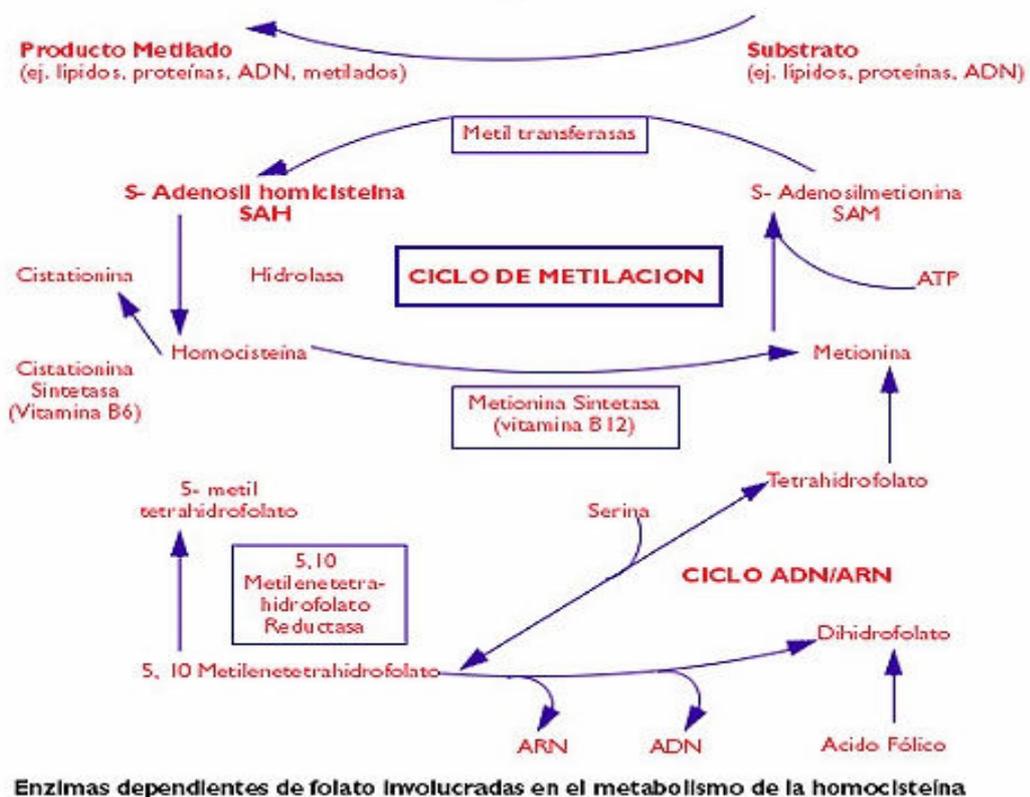


Fig V. Esquema del metabolismo de la homocisteína

Las concentraciones plasmáticas de homocisteína, se pueden ver afectadas (aumento o disminución) por algunas variables, tales como la edad del individuo, género, raza, insuficiencia renal, concentraciones plasmáticas de folato, vitamina B6, vitamina B12, mutaciones genéticas y tratamiento antifolato.<sup>(22)</sup>

Para los niveles plasmáticos de homocisteína aún no existe un rango de normalidad uniformemente aceptado. Sin embargo, existe acuerdo en que por encima de 15  $\mu\text{mol/L}$  están elevados y se ha propuesto la siguiente clasificación de hiperhomocisteinemia en función de los valores citados:

<b>Clasificación de hiperhomocisteinemia</b>	<b>Concentraciones Plasmáticas</b>
<b>Normal</b>	<b>12-14 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>
<b>Hiperhomocisteinemia leve</b>	<b>15-30 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>
<b>Hiperhomocisteinemia Moderada</b>	<b>30-100 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>
<b>Hiperhomocisteinemia Severa</b>	<b>&gt;100 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>

Tabla 1. Tomado de Pablo Stiefel García-Junco <sup>(1)</sup>

## **METIONINA SINTASA (MS)**

Kirke et al. demostraron que la concentración sérica de folato y de vitamina B12 son independientes como factores de riesgo para DTN, señalando a la enzima metionina sintasa (MS) como un potencial factor de susceptibilidad para DTN. El gen de la metionina sintasa (MTR) fue clonado en 1996, con esto, las investigaciones para determinar alguna asociación genética con los DTN han centrado su atención en este gen.

### **. A) EL GEN DE LA ENZIMA METIONINA SINTASA (MTR)**

El gen humano de la metionina sintasa (MTR) está localizado en el cromosoma 1q43 cerca del telomero del cromosoma 1. El tamaño del DNA es de 105.25 Kb, el tamaño del RNAm es de 7101 bp y cuenta con 33 exones. El cDNA aislado de este gen contiene un marco de lectura abierto de 3798 nucleótidos que codifican para una proteína de 1265 amino ácidos con una masa molecular de 140 kDa.<sup>(27,28)</sup>

La secuencia de amino ácidos de la MS humana tiene un 55% y 64% de homología con *Escherichia coli* y *Caenorhabditis elegans*, respectivamente. El RNAm de la MS humana parece expresarse en todos los tejidos: corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, esqueleto, músculo, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículos, ovarios, intestino delgado, colón y linfocitos de sangre periférica.

En la mayor parte de los tejidos, están presentes dos clases de RNAm, predominantemente. En el Northern blot se observa una banda prominente de ~7 kb y una delgada banda de ~10 kb. El cDNA es más consistente con la banda de 7kb. Probablemente la banda de 10 kb es una forma preprocesada de la de 7 kb, o representa un procesamiento alternativo o una versión de poliadenilación alterada del gen, aún no se sabe.<sup>(41)</sup>

## **B) LA PARTICIPACIÓN DE LA MS EN EL METABOLISMO DE LA Hcy**

El producto del gen MTR consiste de 1, 265 residuos de aminoácidos y es llamado metionina sintasa (MS, EC 2.1.1.13, nombres alternativos: 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína S-metiltransferasa, tetrahidro-pteroilglutamato metiltransferasa). La metionina sintasa es una enzima citoplasmática que requiere metil-cobalamina para catalizar la remetilación de homocisteína a metionina; en una reacción en la cual la metilcobalamina sirve como un intermediario para “acarrear” grupos metilos. El grupo prostético de la cobalamina acepta el grupo metilo del metiltetrahidrofolato para formar metilcobalamina y tetrahidrofolato, y entonces donan este a la homocisteína para producir metionina y cobalamina monovalente (cob(I)alamina).

Transferir el grupo metilo de metilcobalamina a homocisteína es el primer acto de la formación de metionina. El 5-metiltetrahidrofolato entonces provee el subsecuente grupo metilo para la metilación de la metionina sintasa ligada a la cobalamina monovalente. Aparentemente, la cobalamina monovalente sufre oxidación espontánea a cobalamina divalente (cob(II)alamina) y debe entonces requerir S-adenosilmetionina para la reformación de metilcobalamina.<sup>(28,42,43,44,45,)</sup>

La deficiente actividad de la enzima MS se traduce bioquímicamente por hiperhomocisteinemia, homocistinuria, hipometioninemia y anemia megaloblástica.<sup>(31,32)</sup> Para entender la fisiopatología de la deficiencia de la metionina sintasa Deborah A Swanson et al. utilizaron la tecnología gen-blanco (“gene-targeting”) para inactivar el gen de la metionina sintasa en el ratón.

Sus resultados revelaron que los ratones knockout heterocigotos tienen concentraciones plasmáticas de homocisteína ligeramente elevadas y de metionina casi indistinguibles comparados con los ratones silvestres. Los embriones knockout homocigotos sobrevivieron a la implantación pero murieron en seguida. La suplementación nutricional con ácido fólico durante el embarazo fue incapaz de rescatar a los embriones que fueron completamente deficientes en metionina sintasa. Estos resultados demuestran la importancia de esta enzima para el desarrollo temprano del ratón y sugieren que los pacientes deficientes de metionina sintasa tienen la actividad residual de esta enzima o que los humanos tienen un mecanismo compensatorio que se encuentra ausente en el ratón.<sup>(46)</sup>

Actualmente es poco el conocimiento acerca del efecto de la metionina sintasa en las concentraciones plasmáticas de la homocisteína, y su relación con el desarrollo de los DTN; probablemente la razón sea que el gen de esta enzima fue clonado recientemente. Un defecto en la función de la metionina sintasa daría como resultado la acumulación plasmática de la homocisteína. James L Mills et al. demostró que hay anomalías en el metabolismo de la homocisteína en mujeres que tienen hijos con DTN y que también presentan elevación de las concentraciones plasmáticas de homocisteína.<sup>(15,47)</sup>

La metionina sintasa es la llave en las reacciones de metilación, esas incluyen producción de mielina; uno de los mecanismos propuestos para desarrollar DTN. Un estudio en ratones demuestra que el folato no previene DTN, mientras que la metionina si lo hace. Para que en las ratas el tubo neural se cierre requiere metionina. Esta es una de las evidencias que sostiene la importancia de la metionina sintasa en la prevención de los DTN.<sup>(15)</sup>

### **C) EL POLIMORFISMO DEL GEN MTR**

Varias mutaciones para el gen de la metionina sintasa (MTR) han sido identificadas, solamente el cambio de A2756G (D919G) es un polimorfismo con una frecuencia alélica de ~15%.<sup>(48)</sup> Leclerc y Van Der Put et al. reportaron este polimorfismo, con una frecuencia de 0.15 y 0.16 para cada población estudiada por estos autores,<sup>(17, 18, 19,)</sup> este polimorfismo ha sido reportado como un factor de riesgo para DTN; también asociado a aumento en la concentración de homocisteína y enfermedad vascular.<sup>(30)</sup>

En la célula, el 5 metil-tetrahidrofolato sirve como donador de metilos para el tetrahidrofolato. El tetrahidrofolato actúa como aceptor de una unidad de carbono, para producir otros folatos, los cuales son coenzimas específicas en reacciones intracelulares. Una de estas reacciones está catalizada por la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa que convierte N<sup>5</sup>N<sup>10</sup>-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato el cual transporta el grupo metilo requerido para la conversión de homocisteína a metionina. (llamado también el camino de la remetilación de la homocisteína). Este grupo metilo es inicialmente transferido a cobalamina dando como resultado metilcobalamina ésta es demetilada por la homocisteína para formar metionina por la enzima dependiente de cob(I)almin: metionina sintasa.

Ocasionalmente la cob(I)alamin puede ser oxidada a cob(II)alamin, de esta manera se inhibe la enzima metionina sintasa. Para mantener la actividad de la enzima se requiere una metilación reductiva por parte de otra enzima llamada metionina sintasa reductasa (MSR).<sup>(21,22,23)</sup>

Debido a que la cobalamina funciona como aceptor de grupos metilo de la 5 metiltetrahydrofolato, la deficiencia de cobalamina puede ser asociada con el atrapamiento de folato (conocido en inglés como "folate trapping") donde los folatos son metabólicamente inactivos a causa de no poder ser reciclados a tetrahydrofolato de vuelta a las reservas de folato. El fallo en la regeneración de metionina causa depleción de esta misma y produce un estado de homocisteinemia (Fig. VI).

El primer factor de riesgo genético identificado para DTN fue la enzima 5,10-metilentetrahydrofolato reductasa (MTHFR).<sup>(24)</sup> El polimorfismo identificado molecularmente fue el C677T que provoca un cambio de alanina por valina en la proteína. Este polimorfismo está asociado a una variable enzimática termolábil que predispone a elevación de homocisteína y por tanto disminución de folatos relacionados con un aumento de la incidencia de DTN.<sup>(25,26)</sup>

La siguiente enzima identificada fue la metionina sintasa (5-metil-tetrahydrofolato-homocisteína-metiltransferasa, MS),<sup>(27)</sup> enzima dependiente de vitamina B12 que utiliza el 5-metil-tetrahydrofolato para convertirla homocisteína en metionina.

Existen dos grupos de complementación en la MS en los que se observan una deficiente funcionalidad de la enzima:

-cbIG: caracterizado por mutaciones en el dominio catalítico, que generan una tasa transcripcional reducida y/o la generación de mensajero o proteína inestable.<sup>(34)</sup>

-cbIE: el fenotipo ligeramente no funcional de este grupo de complementación se pone de manifiesto sólo cuando en las condiciones de ensayo se utilizan concentraciones bajas de agentes reductores.<sup>(35)</sup>

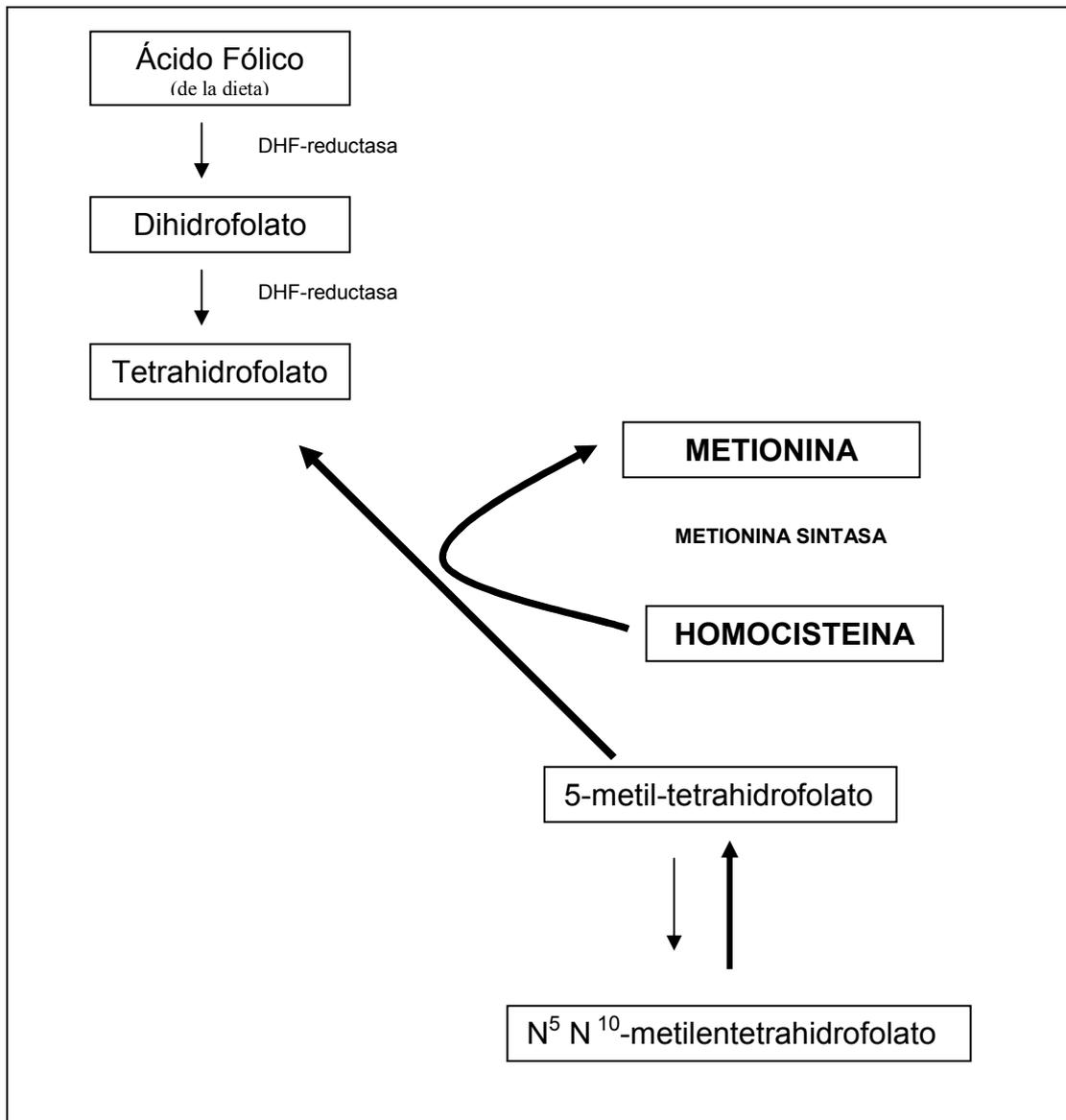


Fig. VI. Enzimas dependientes de folato involucradas en el metabolismo de la Homocisteína.  
Modificado de Brian Fowler. The folate cycle and disease in humans

Leclere et al, reportaron que el polimorfismo A2756G es traducido en la proteína como un cambio de un ácido aspártico (el cual hace una hélice); por un residuo de glicina (el cual hace una hélice defectuosa). Localizado en la región de la unión a la adenosilmetionina (AdoMet). Esta substitución, podría afectar la estructura secundaria de la proteína y por lo tanto su función. Sin embargo el efecto preciso de la mutación sobre la actividad de la enzima no es claro.<sup>(36)</sup>

La asociación de este polimorfismo (MTR, A2756G) con los DTN aún no es clara. Morrison K et al, mencionan que el riesgo de defectos de tubo neural a causa de anomalías en el metabolismo del folato puede estar influenciado por el genotipo materno o por la combinación del genotipo materno y fetal; ellos sugieren que este alelo (MTR, A2756G), no siempre se asocia con susceptibilidad para desarrollar DTN <sup>(12)</sup>. Sin embargo, últimos reportes han demostrado una asociación de ciertos genotipos del polimorfismo en cuestión y la asociación con DTN; tal es el caso de Doolin MT et al quienes refieren que el riesgo de tener un niño con espina bífida parece incrementarse en el caso de homocigosidad para la mutación en el genotipo materno (MTR, 2756G) <sup>(37)</sup>. Zhu H une dos polimorfismos en su análisis, por un lado el polimorfismo del gen MTR (MTR, A2756G) y por otro el gen MTRR (MTRR, A66G) y sus resultados sugieren que los infantes que presentan ambos alelos mutados tienen un riesgo elevado para DTN (OR=5.1) <sup>(38)</sup>. Uno de los autores más recientes es Gueant-Rodríguez et al., 2003 quien sugiere que el genotipo MTR 2756 GG incrementa el riesgo de espina bífida (OR=2.6) <sup>39</sup>.

La influencia de factores ambientales sobre la expresión génica para el desarrollo de patologías con una alta incidencia en México como los DTN, hacen indispensable evaluar genes relacionados con esta enfermedad y cuya contribución al fenotipo pueda verse modificada por factores ambientales, dietéticos y educativos.

---

## **OBJETIVO GENERAL:**

Conocer la frecuencia de la mutación A2756G en el gen de la Metionina Sintasa (MTR) en la población mexicana y su asociación con la presencia de anencefalia.

## **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- 1) Conocer la distribución alélica de la mutación A2756G del gen MTR en madres y padres de recién nacidos mexicanos con DTN tipo anencefalia.
- 2) Conocer la distribución alélica de la mutación A2756G del gen MTR en madres y padres de niños sanos mexicanos.
- 3) Conocer la distribución genotípica de la mutación A2756G del gen MTR. en madres y padres de pacientes mexicanos con DTN.
- 4) Conocer la distribución genotípica de la mutación A2756G del gen MTR. en madres y padres de niños sanos mexicanos.
- 5) Calcular la razón de momios (OR) y la fracción etiológica (EF) en caso de encontrar un alelo significativamente aumentado en los pacientes respecto a los controles.
- 6) Comparar resultados con los de otras poblaciones estudiadas.

## **HIPÓTESIS:**

La frecuencia de la mutación en el gen MTR es más alta en los padres de pacientes con DTN en comparación con aquella que presentan los padres de individuos sanos de la población mexicana.

La distribución de los diferentes alelos y genotipos del gen MTR es diferente en los mestizos mexicanos en comparación con otras poblaciones.

## **JUSTIFICACIÓN:**

En la actualidad no existe en México ningún estudio de la distribución del polimorfismo molecular del gen MTR en individuos sanos, ni en pacientes con DTN. La mayoría de los estudios han sido realizados en poblaciones caucásicas y orientales.

Los resultados de este estudio permitirán conocer la distribución de los alelos y genotipos del gen MTR determinar si existen diferencias significativas en la distribución de dichos alelos entre pacientes con DTN e individuos sanos.

## II METODOLOGIA

### **Diseño del Estudio:**

Tipo de investigación: Observacional.

Tipo de diseño: Casos y controles.

### **Características del estudio:**

En relación al método de observación: Longitudinal.

En relación al tipo de análisis: Descriptivo.

En relación a la temporalidad: Retrospectivo.

### **Lugar y Duración:**

- Laboratorio de Biología Molecular.  
Subdirección de Investigación Biomédica del INPerIER.  
Enero del 2003 – 2006.

## **Definición Operativa de Variables:**

### **1. Poblaciones incluidas en el estudio:**

#### **A Casos:**

- **Criterios de Inclusión:** Se seleccionaron 150 casos de madres mexicanas originarias que tengan por lo menos un hijo con DTN, quienes hayan sido diagnosticados al nacimiento y clasificados de acuerdo a la teoría de multisitios. Se elaboró historia clínica.

- **Criterios de Exclusión:** Madres de hijos que presenten malformaciones múltiples, síndromes genéticos y cromosómicos con DTN o sin él. Casos con exposición a fármacos teratógenos.

- **Criterios de Eliminación:** Deserción del estudio por parte de los pacientes; fallas técnicas.

## **B        Controles:**

- **Criterios de Inclusión:** Se seleccionaron 150 controles al azar de población abierta y sin ninguna relación familiar, aparentemente sanos con dos o más hijos sanos, y sin antecedentes familiares ni personales de DTN, ni de ningún otro padecimiento congénito. Todos ellos mexicanos, cuyos padres, abuelos y bisabuelos eran mexicanos nacidos en la República Mexicana. Se elaboro historia clínica.
- **Criterios de Exclusión:** Madres de hijos que presenten alguna malformación congénita, síndromes genéticos y cromosómicos. Casos con exposición a fármacos teratógenos.
- **Criterios de Eliminación:** Deserción del estudio por parte de los pacientes; fallas técnicas.

## **2.        Variables del estudio**

INDEPENDIENTE: Polimorfismo del gen MTR que codifican para la enzima metionina sintasa (Mutación A2756G) .

DEPENDIENTE: Defectos del Tubo Neural y su categorización en multisitios sitio 2 anencefalia.

## **Materiales y Métodos:**

La población de estudio se capturo en tres estados de la republica Puebla, Tlaxcala y Edo. De México donde se registró el nacimiento de un producto con anencefalia . Se tomo la muestra a los padres y se envió al laboratorio etiquetado Un aspecto fundamental de este trabajo es la obtención de DNA en cantidades razonables y de alta pureza. En este caso se obtuvo DNA de todos los sujetos incluidos en el estudio a partir de leucocitos obtenidos de sangre periférica. El método consiste en la eliminación de eritrocitos mediante choque hipotónico para dejar limpios a los leucocitos. Se hace lisis de leucocitos y membranas nucleares para liberar el DNA, el cual es precipitado por medio de isopropanol, lavado con etanol y resuspendido en agua o Tris-EDTA (TE).

### **A. *Obtención de la muestra:***

1. Extraer en tubo Vacutainer 3 ml de sangre periférica.
2. Homogenizar suavemente la muestra.
3. Almacenar a temperatura ambiente y procesar lo más rápido posible.

### **B. *Lisis celular***

1. A un tubo estéril con capacidad de 15 ml adicionar 9 ml de solución de lisis RBC.
2. Transferir los 3ml de sangre al tubo anterior. Invertir para mezclar e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Invertir al menos una vez durante la incubación.
3. Centrifugar por 10 minutos a 2000 x g. Retirar el sobrenadante cuidando de no tocar el botón blanco para lo cual se deja alrededor de 100 a 200 ul de líquido residual.
4. Mezclar vigorosamente (Vórtex) para resuspender los leucocitos en el sobrenadante residual. Esto facilita la lisis celular.
5. Adicionar 3 ml de la solución de lisis celular al tubo que contiene las células resuspendidas y pipetear varias veces para lisar las células. Usualmente, ninguna incubación es requerida; sin embargo, si grumos celulares son visibles después de mezclar, incubar a 37° C o temperatura ambiente hasta que la solución sea homogénea. Las muestras son estables en esta solución (lisis celular) por al menos 18 meses a temperatura ambiente.

### **C. Tratamiento con RNAsa (Opcional)**

1. Adicionar al lisado celular 15 ul de solución de RNasa.
2. Mezclar la muestra invirtiendo el tubo 25 veces e incubar a 37° C por 15 minutos.

### **D. Precipitación de proteínas:**

1. Adicionar 1 ml de la solución de precipitación de proteínas al lisado celular.
2. Mezclar vigorosamente a alta velocidad (Vórtex) por 20 segundos para homogenizar con el lisado celular.
3. Centrifugar a 2000 g x g por 10 minutos. Las proteínas precipitadas deberán formar un botón color café oscuro.

### **E. Precipitación del ADN:**

1. Retirar el sobrenadante que contiene al ADN "cuidando de no tocar el botón de proteínas" y depositar en un tubo limpio (ésteril) que contenga 3 ml de isopropanol.
2. Mezclar la muestra por inversión suave 50 veces hasta que las fibras de ADN formen un conglomerado.
3. Centrifugar a 2000 g por 3 minutos; el ADN deberá visualizarse como un botón blanco.
4. Retirar el sobrenadante y secar el tubo en un papel absorbente. Adicionar 3 ml de etanol al 70%. Invertir el tubo suavemente para lavar el botón de ADN.
5. Centrifugar a 2000 x g por 1 minuto. Retirar cuidadosamente el etanol. El botón puede perderse si el tubo se agita al retirar el etanol.
6. Secar el tubo en papel absorbente y dejar secar la muestra a temperatura ambiente por 15 minutos o preferentemente a 65° C hasta ver el botón transparente.

### **F. Hidratación del ADN:**

1. Adicionar 250 ul de la solución de hidratación (250 ul dan una concentración de 400 ug/ml si el campo total es de 100 ug de ADN).
2. Dejar rehidratando el ADN toda la noche a temperatura ambiente. Alternativamente, calentar a 65° C por 1 hora. Mover periódicamente el tubo para dispersar el ADN.
3. Almacenar de 2 a 8°C.

### G. Amplificación del gen MTR:

La amplificación del ADN se ha llevado a cabo realizando la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). Utilizando este método, se generan miles de copias del gen MTR. Se usan oligonucleótidos específicos cuyas secuencias y localización son las siguientes:

Nombre	Secuencia	Localización
305 <sup>a</sup>	5' GAACTAGAAGACAGAAATTCTCTA 3'	intrónico
1796	5' CATGGAAGAATATGAAGATATTAGAC 3'	2727-2752

### H Tipificación del Gen MTR:

1. Para la tipificación del polimorfismo en el gen MTR utilizamos la técnica de fragmentos de Restricción de longitud polimórfica (RFLP por sus siglas En inglés).

A. Este método puede ser usado si los dos alelos difieren por la presencia de un sitio de restricción (enzima de restricción). Luego de la amplificación por la PCR, el ADN amplificado es cortado con una enzima de restricción y los alelos son identificados por el patrón de corte por medio de una electroforesis en gel.

B. Dos problemas han sido descritos con esta técnica: a) La imposibilidad de lograr un corte completo por parte de la enzima lo que haría que un homocigoto apareciera como un heterocigoto y b) La dificultad para encontrar sitios de restricción apropiados para todos los alelos de un locus.

Para efectuar la reacción de PCR:

1. Calcular el volumen correspondiente a 500 ng de DNA genómico.
2. Adicionar en un tubo de 2 mL:
  - a. 2.5 unidades de Taq polimerasa
  - b. 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>
  - c. Adicionar el volumen equivalente a 500 ng de DNA genómico.
  - d. Aforar con agua bidestilada hasta 50 µL
  - e. dNTP's
  - f. Buffer
  - g. Dimetil-sulfoxido (DMSO)

3. Se coloca en el termociclador en el siguiente programa:

Desnaturalización 95°C 45 s

Alineación 55°C 35 s

Extensión 72°C 75s

38 ciclos.

Una vez concluido el programa los productos de amplificación son sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con objeto de confirmar la presencia de los fragmentos a digerir. Una vez confirmado, se procede a la digestión de estos con la enzima de restricción *HaeIII* y el producto de la reacción se corre en un gel de agarosa al 1.8% que contiene Bromuro de Etidio. El producto de la amplificación se visualiza empleando luz ultravioleta y se retrata el gel para la posterior interpretación de los resultados.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cálculo de frecuencias alélicas en la población y frecuencias génicas

La frecuencia en la población (FP) representa el porcentaje de individuos portadores de un alelo en el total de individuos estudiados y la frecuencia génica (FG) es la frecuencia del gen en la población. Para calcular a partir de población familiarmente no relacionada se aplica la fórmula de Haldane. Los datos que se obtienen son exactos siempre y cuando el sistema genético que se está probando se encuentre en equilibrio de Hardy Weinberg en la población en cuestión (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>). La fórmula que se aplicó para calcular la FG es:

$$FP_i = \frac{n_i}{N} \quad FG_i = 1 - \sqrt{1 - FP_i}$$

En donde ni= número de individuos portadores del alelo i, N= tamaño de la población, FPi= Frecuencia de i en la población, FGi= Frecuencia génica de i.

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se utilizó el programa SPSS para Windows, éste programa aplicó a los resultados la medida de riesgo denominada Razón de Momios (Odds Ratio,OR)

La razón de Momios (OR) se estima en los estudios de casos y controles. La hipótesis de este tipo de estudios es si existe asociación entre los factores de riesgo y la enfermedad en estudio.

Expuestos	Enfermos	
	SI (casos)	NO (controles)
SI	a	b
NO	c	d
Total	a + c	b + d

Al comienzo del estudio conocemos el total de casos ( $a + c$ ) y el total de controles ( $b + d$ ). Al final del estudio conocemos la proporción de expuestos entre los casos ( $a / a + c$ ) y la proporción de expuestos entre los controles ( $b / b+d$ )

Como no se calculan incidencias no se puede calcular RR, aunque se puede estimar a partir de la razón de momios u Odds Ratio (OR)

Por lo tanto, la razón de momios (OR) es la medida de asociación en los estudios de casos y controles.

### III. Resultados

La genotipificación se realizó usando la técnica de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) de 238 muestras incluyendo casos y controles.

Se determinó la distribución del polimorfismo A2756G del gen MTR, los genotipos obtenidos así como la frecuencia de cada una de las muestras se indica en las siguientes tablas.

<b>Alelos MTR, A2756G</b>	<b>Número</b>	<b>Frecuencia</b>
<b>A</b>	<b>210</b>	<b>89.7435897</b>
<b>G</b>	<b>24</b>	<b>10.2564102</b>

Tabla 2. Frecuencia alelica del polimorfismo A2756G del gen MTR para los casos.

<b>Alelos MTR, A2756G</b>	<b>Número</b>	<b>Frecuencia</b>
<b>A</b>	<b>195</b>	<b>80.5785124</b>
<b>G</b>	<b>47</b>	<b>19.4214876</b>

Tabla 3. Frecuencia alelica del polimorfismo A2756G del gen MTR para los controles.

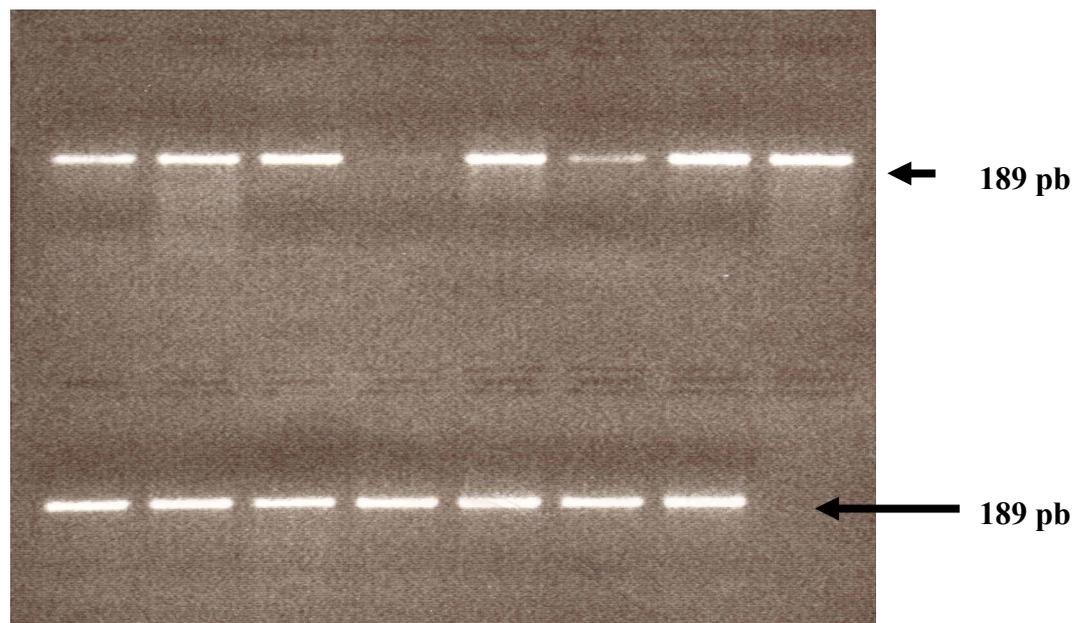
<b>Genotipo MTR, A2756G</b>	<b>Número</b>	<b>Frecuencia</b>
<b>AA</b>	<b>93</b>	<b>79.4871794</b>
<b>AG</b>	<b>24</b>	<b>20.5128205</b>
<b>GG</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Tabla 4. Frecuencia genotípica del polimorfismo A2756G del gen MTR para los casos.

<b>Genotipo MTR, A2756G</b>	<b>Número</b>	<b>Frecuencia</b>
<b>AA</b>	<b>81</b>	<b>66.9421487</b>
<b>AG</b>	<b>33</b>	<b>27.2727272</b>
<b>GG</b>	<b>7</b>	<b>5.78512396</b>

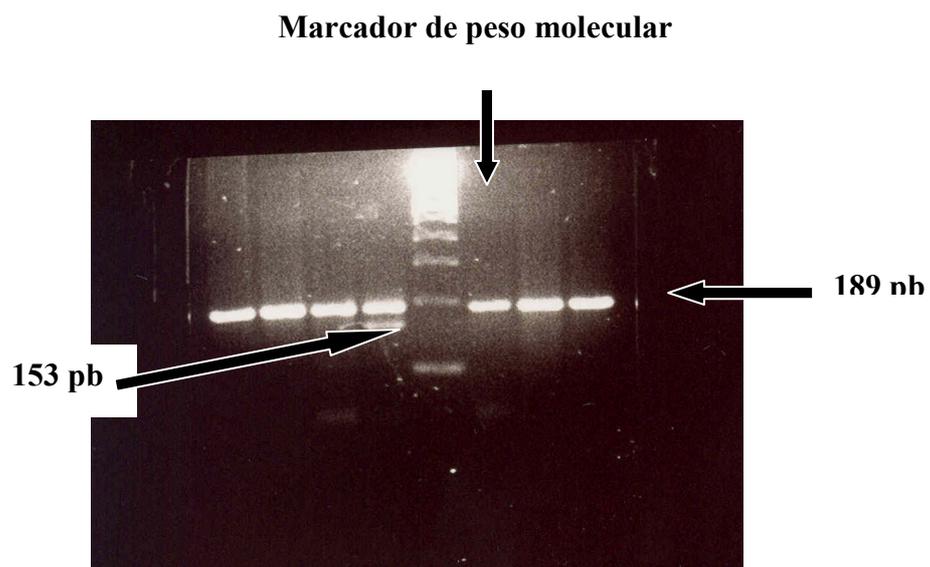
Tabla 5. Frecuencia genotípica del polimorfismo A2756G del gen MTR para los controles.

Las figuras siguientes son electroforesis en geles de agarosa para ejemplificar el proceso en cada una de las muestras. Primero se realiza una PCR, terminando la reacción se lleva a cabo una electroforesis con las muestras y así se corrobora que el DNA haya amplificado; para proseguir con el siguiente paso.

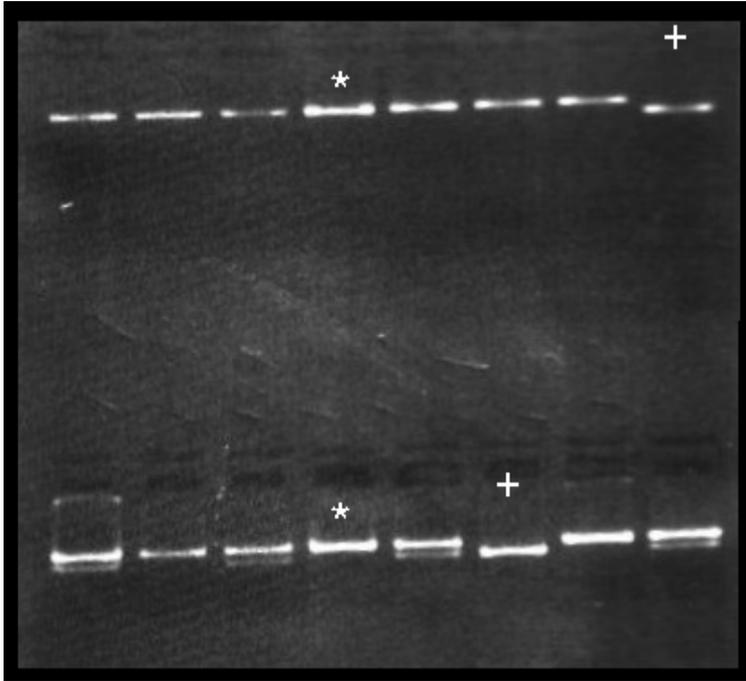


**FIGURA VII** Electroforesis de la amplificación (PCR) de 15 muestras, para confirmar la presencia de los fragmentos a digerir. En el primer pozo un fragmento de 189bp, que sirve de referencia para corroborar el tamaño de la banda que se espera en las muestras problema

Segundo, después de que se corroboró la amplificación del fragmento de DNA de interés, se prosiguió a realizar la RFLP y de esta manera se obtiene la tipificación de cada una de las muestras.



**FIGURA VIII** Se ilustra una reacción de restricción (RFLP) de siete muestras. En las muestras 1,2,3,6,7,8 de izquierda a derecha no se observa sitio de corte, lo que nos traduce homocigosidad sin polimorfismo. En la muestra 4 se ha generado un fragmento, observándose dos bandas de diferente peso molecular lo que nos revela que el polimorfismo esta presente,y que el individuo al que corresponde esa muestra es heterocigoto para el polimorfismo, finalmente en el pozo 5 se observa el marcador de peso molecular.



**FIGURA IX** Se ilustra una reacción de restricción (RFLP) de catorce muestras. (\*) Fragmento de referencia con un peso de 189 bp; (+) Muestras homocigóticas para el sitio de corte (homocigotos con el polimorfismo); las muestras que presentan doble banda son heterocigotos para el polimorfismo y, el resto de las muestras son homocigotos sin sitio de corte (homocigotos sin polimorfismo) .

Se tipificaron un total de 236 muestras de las cuales 116 correspondieron a casos y 120 a controles. Las frecuencias genotípicas y alelicas del gen MTR para cada grupo se resumen en las siguientes tablas.

**Tabla A.** Frecuencias alelicas A2756G

GEN DE LA METIONINA SINTASA (MTR)		
ALELOS (No)		
	<b>A</b>	<b>G</b>
CASOS	0.90	0.10
CONTROLES	0.81	0.19

En la tabla A se muestran las frecuencias alelicas tanto de los casos como de los controles. Dado que la muestra mínima para establecer la frecuencia alelica en cualquier población es de 100 individuos sanos, con los datos obtenidos de los controles se logro establecer la frecuencia alelica para el polimorfismo A2756G del gen MTR para la población mestiza mexicana, la cual como se puede observar en la tabla es de 0.19.

**Tabla B** Porcentajes del genotipo A2756G

GEN DE LA METIONINA SINTASA (MTR)			
GENOTIPOS (No)			
	AA	AG	GG
CASOS	92/116 (80%)	24/116 (20%)	0/116(0%)
CONTROLES	81/120 (67%)	32/120 (27%)	7/120(6%)

La tabla B muestra los resultados de los genotipos de los casos y de los controles. Dividiendo estos resultados y analizándolos con el programa SPSS para Windows se observó que el 100% de los casos de anencefalia tienen presente el alelo A y, en los controles, se reporta en 94.1% ( $p = 0.008$ , según Test Exacto de Fisher). El alelo G se manifiesta en 20.6% de los casos contra un 32.5% de los controles ( $p = 0.04$ ) con una OR estimada de 0.54 (IC del 95% 0.30-0.97).

Con respecto al análisis por genotipo de los casos y de los controles se encontró que AA, AG y GG se presenta en 80%, 20% y 0% respectivamente; mientras que para los controles se encuentra 67%, 27% y 6% respectivamente.

De igual manera los resultados se sometieron a análisis estadístico con SPSS para Windows, lo que demostró que AA es positivo en 79.3% de los casos contra 67.5% de los controles ( $p = 0.04$ ) con una OR = 1.84 (IC del 95% 1.02 - 3.32). En tanto, GG es negativo en todos los casos y positivo en 5.8% de los controles ( $p = 0.008$ ).

En la tabla C se puede observar la magnitud del riesgo para G en relación a la presencia de AA tomado como referente. En cualquiera de las situaciones, al estar presente G la OR es menor que 1.0.

**Tabla C.** Riesgo estimado de anencefalia ante exposición al alelo G.

<b>Genotipo</b>	<b>Casos (n = 116)</b>	<b>Controles (n = 120)</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
AG	24	32	0.66	0.36 – 1.21
GG	0	7	No estimable	No estimable
AG/GG	24	39	0.54	0.36 – 0.97

**El genotipo AA como Referente.** Potencia estadística observada 78.0%

## IV DISCUSION

La frecuencia obtenida para el polimorfismo A2756G del gen MTR en población mestiza mexicana (0.19) es muy similar que el observado en otras poblaciones: canadienses y franceses 0.15, holandeses 0.19, ingleses 0.17<sup>(17, 49,50)</sup>. Nuestros controles para calcular la frecuencia del gen en la población general fueron madres y padres de población abierta y sin ninguna relación familiar, aparentemente sanos con dos o mas hijos sanos. Todos ellos mexicanos, cuyos padres, abuelos y bisabuelos eran mexicanos nacidos en la Republica Mexicana.

Al comparar casos y controles por alelos (Tabla B) se observan que el 100% de los casos presentan el alelo silvestre mientras que para el alelo con el polimorfismo se observo el 0%, por lo que la Razón de Momios (OR) no puede ser estimada con exactitud, pero el resultado indica que la presencia del alelo A es un factor de riesgo fuertemente asociado con anencefalia con una  $p= 0.008$  según Test Exacto de Fisher. Para el alelo G el análisis revela una OR de 0.54 con una  $p = 0.04$  lo cual sugiere que el alelo G es un factor que reduce el riesgo con anencefalia.

Cuando se hace el análisis para los distintos genotipos (Tabla B) se demostró que AA es positivo en 79.3% de los casos contra 67.5% de los controles ( $p = 0.04$ ) con una OR = 1.84, lo que sugiere que AA es mas riesgoso para la presencia de la enfermedad; no así GG, quien es negativo en todos los casos y positivo en 5.8% de los controles ( $p = 0.008$ ) y al estar presente GG en los controles sugiere que es un factor protector contra la enfermedad.

Lo que se pretende con la Tabla C es demostrar que G en efecto es un factor que reduce el riesgo de la enfermedad (tomando a AA, como referencia).

Cuando esta presente G la OR es menor que 1 (OR = 0.66), y cuando se presenta GG la OR disminuye (OR = 0.54); por lo que en mayor presencia de G menor riesgo de anencefalia.

La mayoría de los estudios no encuentran una asociación entre el polimorfismo A2756G y la enfermedad. Sin embargo, Shaw et al<sup>(26)</sup> a través de un estudio de casos y controles para espina bifida reportan resultados muy similares a los aquí obtenidos y Christensen et al<sup>(13)</sup> es uno de los primeros autores que menciona que el genotipo GG reduce el riesgo para DTN.

Dada la gran controversia en los estudios reportados nos atrevemos a sugerir que las diferencias observadas están dadas por condiciones particulares de cada grupo étnico (como área geográfica o estado nutricional ) <sup>(5)</sup> o que algunos sucesos no se hayan seleccionado adecuadamente las 2 poblaciones (casos y controles); o que los portadores del polimorfismo (GG) en realidad se encuentran mas frecuentemente pero que quizá puedan tener una tasa de mortalidad diferente a los que no tienen el polimorfismo <sup>(51)</sup> y por ello observarse en menor frecuencia.

Ahora bien la significancia funcional del polimorfismo A2756G en la enzima (MS) aun no se sabe, tendría que ser examinado en experimentos de expresión para confirmar el impacto sobre la proteína y de esta manera conocer la asociación del polimorfismo con la presencia de DTN.

## V. CONCLUSIONES

1.- La frecuencia para el polimorfismo A2756G del gen MTR en la población mexicana es de 0.19

2.- Se encontró que tanto la presencia del alelo A como el genotipo AA es un factor de riesgo fuertemente asociado a anencefalia.

3.- La presencia del alelo G así como el genotipo GG se sugiere que sean un factor que reduce el riesgo de anencefalia.

4.- Se deben considerar experimentos de expresión para confirmar el impacto del polimorfismo (A2756G) sobre la proteína (MS)

## VI BIBLIOGRAFIA

- <sup>1</sup> Guízar Vázquez, Jesús , Zafra de la Rosa, G. Atlas, Diagnóstico de Síndromes Genéticos. Manual Moderno 1999, 372 pp.
- <sup>2</sup> Manual para la Vigilancia Epidemiológica de los Defectos del Tubo Neural <http://www.imss.gob.mx/nr/imss/dpm/dties/normatividad/vigilanciaepi/Man16-DefectoTN/Man16.htm#Top>
- <sup>3</sup> Dunia Carolina Rodríguez, Ramón Alvarenga. Frecuencia de las malformaciones congénitas Externas en la Unidad Materno Infantil del IHSS de Tegucigalpa. <http://www.google.com/search?q=cache:icSheLBzGn4J:200.62.42.101/fulltext/ostgrado/malformaciones.pdf+Dunia+Carolina+Rodr%C3%ADguez,+Ram%C3%B3n+Alvarenga.+Frecuencia+de+las+malformaciones+cong%C3%A9nitas+Externas+&hl=es>
- <sup>4</sup> José A Ramírez-Espitia, Fernando G Benavides, Marina Lacasaña-Navarro, José M Martínez, Ana M García, Joan Benach. Mortalidad por defectos del tubo neural en México, 1980-1997. Sal Púb Méx 2003; 45(5):356-364
- <sup>5</sup> A. Sanchis Calvo, M.L. Martínez frías. Estudio clínico epidemiológico de los defectos del tubo neural clasificados por los cinco puntos de cierre del mismo. Anales Españoles de Pediatría 2001; 54:165-173.
- <sup>6</sup> Shaw GM, Jens old NG, Wasserman CR, Lamer EJ Epidemiologic characteristics of phenotypical distinct neural tube defects among 0.7million California births, 1983-1987. Teratology 1994; 49: 143-149.
- <sup>7</sup> Moore CA, Song Li, Zhu Li, Shixin Hong, Haiqin Gu, Berry RJ et al Elevated rates of severe neural tube defects in a high prevalence area in Northern China. Am J Med Genet 1997; 73: 113-118.
- <sup>8</sup> Adrew J Copp. Prevention of neural tube defects: vitamins, enzymes and genes. Curr Opin Neurol 1998; 11:97-102.
- <sup>9</sup> Behrman, Kliegman, Harbin. Tratado de Pediatría. McGraw-Hill. Interamericana. 1997.
- <sup>10</sup> . Holmes LB, Driscoll SG, Atkins L Etiologic heterogeneity of neural tube defects. N Engl J Med 1976; 294: 365- 369.
- <sup>11</sup> Hall JG, Friedman JM, Kenna BA, Popkin J, Jawanda M, Arnold W, Clinical genetic and epidemiological factors in neural tube defects. Am J Hum Genet

1988; 43: 827-837.

<sup>12</sup> Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD Neural tube defects. *N Engl J Med* 1999; 341: 1509 - 1519.

<sup>13</sup> Benedicto Christensen, Laura Arbour, Pamela Tran, Daniel Leclerc, Nelly Sabbaghian, Robert Platt; et al. Genetic Polymorphisms in Methylenetetrahydrofolate Reductase y Methionine Synthase, Folate Levels in Red Blood Cells, and Risk of Neural Tube Defects. *Am J Med Genet* 1999; 84:151-157.

<sup>14</sup> John M Scout. Ácido Fólico y la Prevención de los Defectos del Tubo Neural. *Dieta y Salud* 1996; 5.

<sup>15</sup> K Morrison, C. Dapapetrou, F:A: Hol, E:C: M: Maquiam, S:A: Lynch, J Burn, Y.H. Edwards. Susceptibility to spina bifida; an association study of five candidate genes. *Ann Hum Genet* 1998;62: 379-396.

<sup>16</sup> James L Mills, Joseph M McPartlin, Peadar N Kirke, Young J Lee, Mary R Conley, Donald G Weir; et al. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *The Lancet* 1995; 345:149-151.

<sup>17</sup> K Morrison, Y H Edwards, S A Lynch, J Burn, F Hob, E Mariman. Methionine synthase and neural tube defects. *J Med Genet.* 1997 Nov;34:958.

<sup>18</sup> Brian Fowler. The folate cycle and disease in humans. *Kidney International* 2001; 59: S-221-S-229.

<sup>19</sup> Charlotte A Hobbs , Stephanie L Sherman,, Ping Yi, Jarah E Hopkins, Claudina P Toros, R Jean Hine; et al. Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism maternal Risk Factors for Down Syndrome. *Am J Hum Genet* 2000; 63:623-630.

<sup>20</sup> Manuela Födinger, Heidi Buchmayer, Gere Sunder-Plassmann. Molecular Genetics of Homocysteine Metabolism. *Miner Electrolyte Metab* 1999; 25:269-278.

<sup>21</sup> L I Al-Gazali, R Padmanabhan, S Melnyk, P Yi, I P Pogribny, M Pogribna, et al. Abnormal Folate Metabolism and Genetic Polymorphism of the Folate Pathway in a Child with Down Syndrome and Neural Tube Defect. *Am J Med Genet* 2001; 103:128-132.

<sup>22</sup> Edward J Massaro and John M Rogers. Folate and Human Development. Edit. Humana Press 2002; 91-109.

<sup>23</sup> Haratiu Olteanu, Ruma Banerjee. Human Methionine Synthase Reductase, a soluble P-450 Reductase-like Dual Flavoprotein, Is Sufficient for NADPH-

dependent Methionine Synthase Activation. *J Biol Chem* 2001; 276:35558-35563.

<sup>24</sup> Helga Refsum. Folate, vitamin B12 and homocysteine in relation to birth defects and pregnancy outcome. *Br J Nutr.* 2001; 85 Suppl 2:S109-13

<sup>24</sup> Gary L Johannang, T Famura, Kelley E Johnston, Katharine D Wenstrom. Co morbidity of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase gene polymorphisms and risk for neural tube defects. *J Med Genet* 2000; 37:949-951.

<sup>25</sup> Michael Y Tsai, Michelle Bignell, FENA Yang, Barry G, Welge, Kevin J Graham; et al. Polygenic influence on plasma homocysteine: association of two prevalent mutations, the 844ins68 of cystathionine  $\beta$ -synthase and A2756G of methionine synthase, which lowered plasma homocysteine levels. *Atherosclerosis* 2000; 149:131-137.

<sup>26</sup> Gary M Shaw, Karen Todoroff, Richard H Finnell, Edward J Cammer, Daniel Leclerc, Roy A Gravel; et al. Infant methionine synthase variants and risk for spina bifida. *J Med Genet* 1999;36:86-87.

<sup>27</sup> Alexandra Feix, Robert Fritsche-Polanz, Josef Kletzmayer, Andreas Vychytil, Walter H Hörl, Gere Sunder-Plassmann; et al. Increased Prevalence of Combined MTR and MTHFR Genotypes Among Individuals with Severe Elevated Total Homocysteine Plasma Levels. *Am J Kid Dis* 2001; 38:956-964.

<sup>27</sup> D Leclerc, E Campeau, P Goyette, CE Adjalla, B Christensen, M Ross, et al. H methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutation in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet* 1996; 5:1867-1874.

<sup>28</sup> Linda H Chen, Mei-Lan Liu, Hye-Yeon Hwang, Li-Sheng Chen, Julie Korenberg, Barry Shane. Human Methionine Synthase. *J Biol Chem* 1997; 272:3628-3634.

<sup>29</sup> Xing L Wang, Natalia Duarte, Hua Cai, Tetsuo Adachi, Ah siew Sim, Greg Cranney, et al. Relationship between total plasma homocysteine, polymorphisms of homocysteine metabolism related enzymes, risk factors and coronary artery disease in the Australian hospital-based population. *Atherosclerosis* 1999; 146:133-140.

<sup>30</sup> Hau Cai, Xingli Wang, Stephen Colagiuri, David E L Wilcken. Methionine Synthase D919G Mutation in Type 2 Diabetes and Its Relation to Vascular Events. *Diab Care* 1998; 21:1774-1775.

<sup>31</sup> Gulati S, Baker P, Li YN, Fowler B, Kruger W, Brody LC, Banerjee R. Defects in human methionine synthase in cblG patients. *Hum Mol Genet* 1996;5:1859-65.

<sup>32</sup> A Wilson, D Leclerc, F Saberi, E Campeau, H Y Hwang, B Shane, et al. Functionally Null Mutations in Patients with the cblG-Variant Form of Methionine Synthase Deficiency. *Am J Hum Genet* 1998; 63:409-413.

<sup>33</sup> Hiroyuki Morita, Hiroki Kurihara, Takao sugiyama, Chikuma Hamada, Yukiko Kurihara, Takayuki Shindo. Polymorphism of the Methionine Synthase Gene.

<sup>34</sup> D Leclerc, A Wilson; R Dumas, C Gafuik, D Song, D Watkins, et al. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:3059-3064.

<sup>35</sup> Harmon DL, Woodside JV, Yarnell JWG, McMaster D, Young IS, McCrum EE, Gey KF, Whitehead AS, Evans AE. The common "thermolabile" variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild Hyperhomocysteinaemia. *Q. J. Med* 1996; 89: 571-577.

<sup>36</sup> Doolin MT, Barbaux S, McDonnell M, Hoess K, Whitehead AS, Mitchell LE. Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida. *Am J Hum Genet* 2002; 71:1222-6

<sup>37</sup> Zhu H, Wicker NJ, Shaw GM, Iamer EJ, Hendricks K, Suarez L, Canfield M, Finnell RH. Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risks for neural tube defects. *Mol Genet Metab* 2003; 78:216-21.

<sup>38</sup> Gueant-Rodriguez RM, Rendeli C, Namour B, Venuti L, Romano A, Anello G, et al. Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans. *Neurosci Lett* 2003; 344:189-92.

<sup>39</sup> Zachary AA. Statistical Analysis of Genetic Data. *ASHI Quarterly*, Winter 1995: 4-7.

<sup>40</sup> Haldane JBS. The estimation and significance of the logarithm of a ration of frequencies. *Ann Hum Genet* 1956, 20: 309-311.

<sup>41</sup> Yan N Li, Sumedha Gulati, Priscilla J Baker, Lawrence C Brody, Ruma Banerjee, Warren D Kruger. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum Mol Genet* 1996; 5(12):1851-8.

<sup>42</sup> MI Shevell, David S Rosenblantt. The Neurology of Cobalamin. *Cana Jour Neurol Scien* 1992; 19(4):472-486.

<sup>43</sup> N. J. Wald, A. K Hackshaw, Nefertiti A. Sourial. Blood folic acid and vitamin B12 in relation to neural tube defects. *Brit Jou Obst Gyn* 1996; 103: 319-324.

<sup>44</sup> Ira S Mellman, Pin-Fang Lin, Frank H Ruddle, Leon E Rosenberg. Genetic control of cobalamin binding in normal and mutant cells: Assignment of the

gene for 5-methyltetrahydrofolate: L-homocysteine S-methyltransferase to human chromosome 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76(1):405-409.

<sup>45</sup> Martha L Ludwing, Rowena G Matthews. Structure-Based Perspectives on B12-Dependent Enzymes. *Annu Rev Biochem* 1997; 66:269-313.

<sup>46</sup> Deborah A Swanson, Mei-Lan Liu, Priscilla J Baker, Lisa Garrett, Michael Stitzel, Jianmin Wu, et al. Targeted Disruption of the Methionine Synthase Gene in Mice. *Mol Cell Biol* 2001; 21(4):1058-1065. <sup>1</sup> Deborah A Swanson, Mei-Lan Liu, Priscilla J Baker, Lisa Garrett, Michael Stitzel, Jianmin Wu, et al. Targeted Disruption of the Methionine Synthase Gene in Mice. *Mol Cell Biol* 2001; 21(4):1058-1065.

<sup>47</sup> Sumedha Gulati, Lawrence C Brody, Ruma Banerjee. Posttranscriptional Regulation of Mammalian Methionine Synthase by B12. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259:436-442.

<sup>48</sup> Nathalie M J Van der Put, Henk J Blom. Neural tube defects and a disturbed folate dependent homocysteine metabolism. *Obstet Gynecol* 2000; 92:57-61.

<sup>49</sup> Gregory J Locksmith, Patrick Duff. Preventing neural tube defects: The importance of periconceptional folic acid supplements. *Obstet Gynecol* 1998; 91:1027-1033.

<sup>50</sup> M Rene Malinow, Aleksander Rajkovic, P Barton Duell, David L Hess, Barbara M Upson. The relationship between maternal and neonatal umbilical cord plasma homocyst(e)ine suggests a potential role for maternal homocyst(e)ine in fetal metabolism. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178:228-233.

<sup>51</sup> Amankwah KS, Kaufmann R, Roller RW, Dawson-Saunders B, Prentice RL. Related Articles, Links. Incidence of congenital abnormalities in infants of gestational diabetic mothers. *J Perinat Med* 1981;9:223-7.

## GLOSARIO

*Ácido Fólico:* es una vitamina con una estrecha interrelación metabólica en la síntesis de nucleótidos purínicos y pirimidínicos y en la metilación de la homocisteína.

*Alelos:* cada uno de los dos genes presentes en el mismo lugar (locus) del par de cromosomas homólogos. En general, uno de los diferentes estados alternativos del mismo gen.

*Cromosoma:* Elemento que existe en el núcleo de las células en el momento de su división o mitosis, que contiene el material genético.

*cDNA (ADN complementario):* molécula de ADN producida por una enzima (transcriptasa reversa) usando el ARN como templado. El cDNA es usado en ingeniería genética para identificar y clonar los genes que codifican el ARN.

*DTN:* Defectos del tubo neural, se desarrollan durante la tercera o cuarta semana del embarazo durante la neurulación, su etiología parece ser multifactorial.

*Enzima:* catalizador biológico, normalmente una proteína, que mediatiza y promueve un proceso químico sin ser ella misma alterada o destruida. Son catalizadores extremadamente eficientes y muy específicamente vinculados a reacciones particulares.

*Enzimas de restricción:* enzimas bacterianas sintetizadas como reacción defensiva frente a la invasión de ADN extraño, como, por ejemplo, bacteriófagos ADN, a los que degrada mientras que el propio está protegido por metilaciones específicas. Cada una de estas enzimas escinden el ADN siempre en el mismo sitio, en loci específicos o secuencias objetivo. Son las tijeras de la ingeniería genética que abrieron las puertas a la manipulación genética.

*Fenotipo:* Lo que parece existir en ciertos locus, es decir lo que se expresa. II Expresión bioquímica o clínica del genotipo.

*Frecuencia Génica:* Define las proporciones alélicas en un locus.

*Gen:* Unidad de transmisión hereditaria; ocupa un sitio determinado en los cromosomas llamado locus.

*Genotipo:* La contribución genética a la descendencia. II La constitución génica de un locus particular.

*Heterocigoto:* Un individuo que ha recibido información genética diferente de cada uno de los padres, para la unidad en cuestión. II Tener dos alelos diferentes de un gen específico.

*Homocigoto*: Un individuo que ha recibido la misma información genética de cada uno de los padres, para la unidad en cuestión. II Tener dos alelos idénticos de un gen específico.

*Kilobase (Kb)*: unidad empleada para medir la longitud de los fragmentos de ADN constituidos por una serie de bases. 1 Kb = 1.000 bases.

*Loci*: en latín, plural de locus.

*Locus*: en genética, punto de un cromosoma ocupado por un gen.

*Malformación Congénita*: Es la existencia de una alteración intrínseca del tejido afectado; que esta presente al momento del nacimiento, puede o no ser heredado.

*MTR*: Gen que codifica para la enzima metionina sintasa.

*Multifactorial*: Causado por la interacción de múltiples genes y factores del medio ambiente.

*Mutación*: Cambio en la secuencia de bases nitrogenadas en la molécula de DNA. Variación espontánea o inducida del genoma.

*PCR*: Amplificación enzimática de fragmentos de DNA localizado entre un par de iniciadores. II Reacción de la polimerasa en cadena, en la que la ADN polimerasa copia un segmento de ADN, resultando en una enorme amplificación de una muy pequeña muestra. La técnica es ampliamente utilizada en investigación, diagnóstico médico y medicina forense.

*Péptido*: polímero o cadena de aminoácidos

*Polimorfismo genético*: Presencia en iuna población de dos o más alelos de cualquier sistema, en la que la frecuencia del más raro de ellos no puede explicarse por mutación recurrente.

*Secuenciación*: secuenciación de DNA. Determinación del orden en el que se disponen las bases que forman una molécula de DNA

*Taq polimerasa*: una DNA polimerasa termoestable aislada de una bacteria, utilizada en PCR.

## APENDICE

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

#### Stock\*

1 M MgCl<sub>2</sub>

0.5 M EDTA, pH 8.0

1 M Tris, pH 7.5

SDS al 10%

Isopropanol

Etanol al 70%

**Solución de lisis RCB:** 5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA

Almacenar a temperatura ambiente (TA).

**Solución de lisis celular:** 10mM de Tris, pH 7.5

1 mM EDTA

1% SDS

Almacenar a temperatura ambiente.

**Solución de RNasa:** 10 mg/ml de RNasa (Sigma) en agua

Bidestilada.

Almacenar a -20° C.

**Solución de precipitación de proteínas:** 10mM de Tris, pH 7.5

1 mM EDTA, pH 8.0

Almacenar a TA.