



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

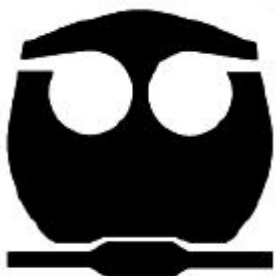
FACULTAD DE QUÍMICA

**PREVALENCIA DE LA VARIANTE C677T DEL GEN *MTHFR* EN
PACIENTES MEXICANOS CON LABIO/PALADAR HENDIDO NO
SINDRÓMICO Y SUS MADRES.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:
EDGAR RICARDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ**



MÉXICO, D.F.

2010



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

VOCAL: Profesor: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

SECRETARIO: Profesor: ADRIANA SÁNCHEZ BOISO

1er. SUPLENTE: Profesor: MARÍA ELENA BRAVO GÓMEZ

2° SUPLENTE: Profesor: LEÓN PATRICIO MARTÍNEZ CASTILLA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ. DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, ÁREA DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

ASESOR DEL TEMA: BIÓLOGA ADRIANA SÁNCHEZ BOISO

SUSTENTANTE (S): EDGAR RICARDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ

I. Índice

I. ÍNDICE	2
II. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	5
2.2. OBJETIVOS.....	6
2.3. HIPÓTESIS.	6
III. MARCO TEÓRICO	7
3.1. ANTECEDENTES.....	7
3.2. FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO C677T.....	14
3.3. HOMOCISTEÍNA, FOLATOS Y EL POLIMORFISMO C677T.....	21
3.3.1. HOMOCISTEÍNA.....	22
INCORPORACIÓN DE HOMOCISTEÍNA EN PROTEÍNAS.	25
ESTRÉS OXIDANTE.....	26
OTRAS ASOCIACIONES.	30
EPIGENÉTICA Y HOMOCISTEÍNA.	33
3.3.2. FOLATOS Y SU METABOLISMO.....	36
ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.	36
TRANSPORTE Y ABSORCIÓN.	39
POLIGLUTAMATOS Y POLIGLUTAMATIZACIÓN.	41
ADAPTACIÓN A LA DEFICIENCIA DE FOLATOS.	42
NUTRICIÓN.	42
FOLATOS Y SU RELACIÓN CON LA VARIANTE C677T DEL GEN MTHFR. ...	45
MECANISMO MOLECULAR DE LA MTHFR Y LA PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO FÓLICO.	46
3.3.3. PADECIMIENTOS ASOCIADOS AL POLIMORFISMO C677T, NIVELES PLASMÁTICOS DE HOMOCISTEÍNA Y FOLATOS.	60
3.3.3.1 POLIMORFISMO C677T Y CÁNCER.....	61
3.3.3.2. PÉRDIDA GESTACIONAL RECURRENTE Y PADECIMIENTOS RELACIONADOS.	62
3.3.3.3. FALLO RENAL.....	67
3.3.3.4. PADECIMIENTOS NEUROLÓGICOS.	67
3.3.3.5. ATROSCLEROSIS Y PADECIMIENTOS RELACIONADOS.....	73

3.3.3.6. MALFORMACIONES CONGÉNITAS Y DEFECTOS DE TUBO NEURAL.....	79
3.4. LABIO/PALADAR HENDIDO NO SINDRÓMICO.	86
3.4.1. DESARROLLO DEL LABIO SUPERIOR Y PALADAR.....	86
3.4.2. CONDICIONES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DEL L/PH.....	93
3.4.3. GENES IMPLICADOS DIRECTAMENTE EN LA ETIOLOGÍA DE L/PH.....	95
3.4.4. INTERACCIONES ENTRE LOS GENES Y EL AMBIENTE.	101
3.4.5. SITUACIÓN EN MÉXICO DEL L/PH.....	103
IV. METODOLOGÍA.....	105
4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.	105
4.1.1. CRITERIOS DE SELECCIÓN.	105
4.1.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA.	105
4.2. TOMA DE MUESTRA.	106
4.3. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO.....	106
4.4. CUANTIFICACIÓN E INTEGRIDAD DEL DNA.	108
<u> </u> CUANTIFICACIÓN.	108
<u> </u> INTEGRIDAD.	109
4.5. IDENTIFICACIÓN DE LA VARIANTE C677T.....	111
4.5.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.	112
4.5.2. LONGITUD POLIMÓRFICA DEL FRAGMENTO DE RESTRICCIÓN.....	115
4.6. PRUEBAS ESTADÍSTICAS.....	117
V. RESULTADOS.....	118
5.1. POBLACIÓN ESTUDIADA.	118
5.2. CUANTIFICACIÓN E INTEGRIDAD DEL DNA GENÓMICO.....	119
5.3. GENOTIPIFICACIÓN Y ANÁLISIS MOLECULAR.	120
VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	133
VII. CONCLUSIONES.....	144
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	145
IX. ANEXOS.....	164
9.1. REACTIVOS.	164
9.2. EQUIPOS Y OTROS MATERIALES.....	164
9.3. TABLAS ANEXAS.....	164

II. Introducción

La Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) tiene un papel fundamental en el metabolismo de los folatos, así como en el de la homocisteína. Cataliza la reducción del 5, 10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, siendo esta última, la forma activa de los folatos que es requerida para la metilación de la homocisteína. De esta manera, se obtiene metionina a partir de homocisteína, que es sustrato para las reacciones de metilación del DNA. La deficiencia de esta enzima, está asociada al aumento de los niveles plasmáticos de homocisteína, que a su vez, se ha asociado a múltiples padecimientos como cáncer, aterosclerosis, malformaciones congénitas. El gen *MTHFR* codifica para esta enzima, en éste se ha descrito la variante *C677T*, y se asocia a la disminución en la actividad enzimática (de hasta un 70%) en homocigotos para la variante mutada. Esta variante ha sido ampliamente estudiada en muchos padecimientos, en los cuales se ha buscado su asociación basándose en el efecto teratogénico de la homocisteína y aquellos efectos relacionados con su metabolismo (oxidación), la alteración en la metilación del DNA, y a un nivel disminuido de folatos reducidos. Dentro de las malformaciones congénitas a las que se ha asociado este polimorfismo, se encuentra el labio hendido con o sin paladar hendido no sindrómico (L/PH), ya que puede tener una considerable contribución a la etiología de la enfermedad por lo mencionado anteriormente, teniendo en cuenta que se trata de una enfermedad multifactorial. Por otra parte, se ha establecido la asociación de múltiples genes en la etiología del L/PH no sindrómico como *SHH*, *MSX1*, *BMP2* y *TGFβ3*, los cuales participan directamente en la formación del labio y el paladar, y que a su vez, pueden ser afectados directamente o en su producto proteico por los efectos relacionados sobretodo con el genotipo *677TT* cuando existe una deficiencia de folatos.

En el presente trabajo, como base de la parte experimental, se llevó a cabo una revisión sobre los efectos relacionados con la variante *C677T*, sus antecedentes históricos, su frecuencia en distintas poblaciones, el metabolismo y la contribución de los folatos, así como el mecanismo molecular de la enzima; además, se incluyó una revisión especial sobre el L/PH. En la parte experimental, se determinó la frecuencia de la variante *C677T* del gen *MTHFR*

en 27 pacientes mexicanos con Labio/Paladar hendido no sindrómico y sus madres del HIMFG mediante la técnica de RFLP (con su respectivo análisis molecular).

2.1. Planteamiento del problema.

La determinación de polimorfismos y mutaciones asociados a ciertas enfermedades, puede contribuir a la elucidación en la etiología de las mismas, y ser una herramienta útil de diagnóstico en aquellos padecimientos que presentan una alta prevalencia, y finalmente, pueden ser de gran ayuda en el asesoramiento genético. Se ha descrito que la prevalencia del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en la población mexicana es mayor que en otras poblaciones, y considerando que en México el estado nutricional deficiente de la mayoría de los individuos que acuden a consulta en los Hospitales que pertenecen al Sector Salud, existe un alto riesgo de que éstos presenten los efectos asociados a este polimorfismo. Este polimorfismo se ha asociado a un aumento en el riesgo de presentar diversas malformaciones congénitas, como es el caso del L/PH. Por su parte, el L/PH es una de las malformaciones congénitas más frecuentes en el país, ya que se presenta en 1 por cada 1000 recién nacidos vivos, además de ser la anomalía congénita facial más frecuente y tener un gran impacto en la calidad de vida del paciente y la económica de los padres. Este padecimiento se caracteriza por ser multifactorial, ya que están involucrados una gran cantidad de genes que participan principalmente durante el desarrollo embrionario del labio y el paladar, así como también los factores ambientales proporcionados por la madre y/o el producto. Estos últimos, en presencia del polimorfismo C677T, pueden ser los altos niveles de homocisteína, la disminución de folatos reducidos y la disminución en la metilación del DNA, que se ha comprobado en estudios anteriores en la población mexicana.

2.2. Objetivos.

- Determinar la prevalencia del polimorfismo *C677T* del gen *MTHFR* en 27 pacientes diagnosticados con L/PH y sus madres mediante la técnica RFLP.
- Realizar el análisis de las frecuencias obtenidas y establecer si existe una relación estadísticamente significativa entre el genotipo y el fenotipo.
- Establecer si existe una posible asociación entre los distintos genotipos determinados y el riesgo de tener un hijo con la patología, basándose en la prevalencia de este polimorfismo en la población general.

2.3. Hipótesis.

Considerando que el polimorfismo *C677T* del gen *MTHFR* está asociado a un aumento en el riesgo de presentar distintas malformaciones congénitas, que existe una alta frecuencia de éste en la población mexicana y el estado de desnutrición en la misma, se sugiere que la presencia del genotipo *677TT*, sobre todo en las madres, esté asociado a que los hijos presenten L/PH, teniendo un impacto mayor en el fenotipo más severo.

Marco teórico

3.1. Antecedentes

La enzima dependiente del dinucleótido de flavina-adenina (FAD), 5, 10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), cataliza una reacción irreversible dependiente de NADPH que consiste en la reducción del 5, 10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, el cual posteriormente sirve como donador de su grupo metilo en la metilación de la homocisteína para dar como producto a la metionina (Fig. 1); lo anterior, es dirigido por esta enzima a expensa de la biosíntesis de DNA y RNA [Bailey L.B, et al, 1999]. Esta enzima es un homodímero, y cada subunidad de aproximadamente 70 kDa contiene una región catalítica en el extremo amino y una región reguladora en el extremo carboxilo. La actividad de la MTHFR es inhibida de manera alostérica por la S-adenosilmetionina cuando se une al dominio del extremo carboxilo, sin embargo, se ha demostrado que la S-adenosilhomocisteína bloquea dicho efecto inhibitorio (sin alterar la actividad de la enzima), estableciendo que dicha inhibición depende de la relación S-adenosilmetionina / S-adenosilhomocisteína (tal vez como un mecanismo compensatorio en caso de su deficiencia) [Yamada K, et al, 2005].

El gen que codifica para dicha enzima recibe el nombre de *MTHFR*, y su locus está en 1p36.3; su cDNA correspondiente tiene una longitud de 2.2 kb y está conformado por 11 exones. La importancia de esta enzima, así como del respectivo gen que la codifica, han tenido una trascendencia histórica, la cual se presenta a continuación.

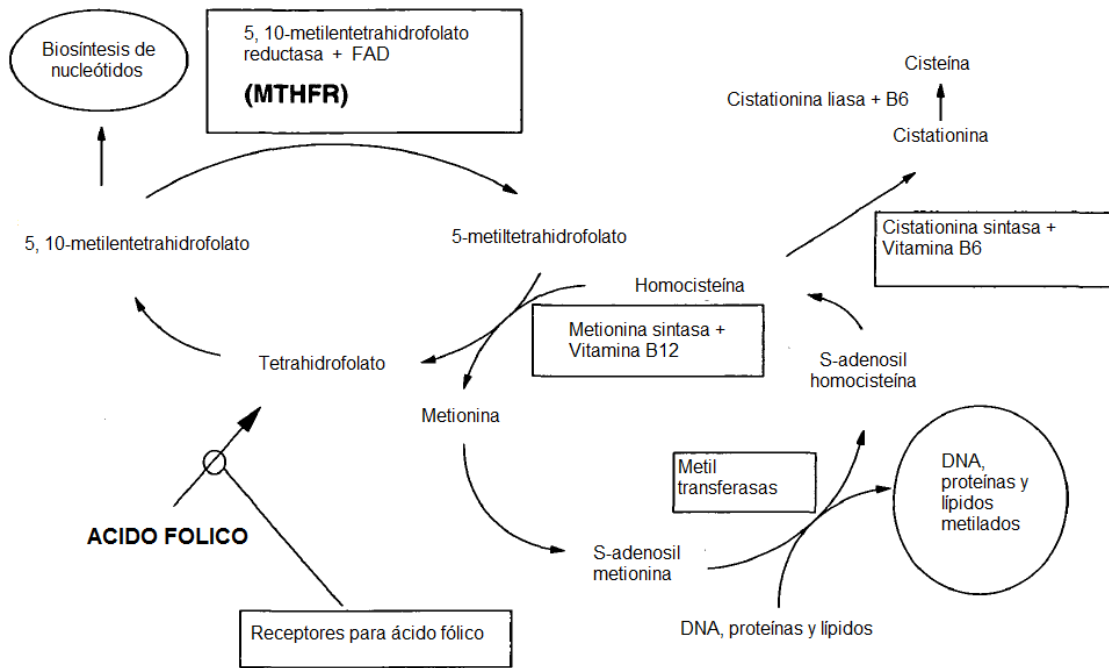


Fig. 1. Vías metabólicas en las que está implicada la actividad de la MTHFR. Traducido de [Botto L.D, et al, 2000].

En 1972, Mudd y colaboradores describen un nuevo tipo de homocistinuria, caracterizada principalmente por manifestaciones neurológicas [Mudd S.H, 1972]. Cabe mencionar, que hasta ese año, la mayoría de los pacientes estudiados con homocistinuria ligada a deficiencias metabólicas se debía a una deficiencia en la actividad de la cistionina β -sintetasa (que cataliza la condensación de la homocisteína con la serina para dar como producto a la cistionina que posteriormente da cisteína), así como a padecimientos genéticos que conllevan a una deficiencia de vitamina B12, siendo ésta un cofactor de la metionina sintetasa [Mudd S.H, 1971]. Mediante ensayos enzimáticos y metabólicos *in vitro* realizados en fibroblastos, determinaron en 3 pacientes que la homocistinuria no se debía a ninguna de las deficiencias mencionadas, ya que la actividad en las enzimas no estaba disminuida comparada con individuos no afectados. Dentro de estos ensayos, teniendo en cuenta que el 5-metiltetrahidrofolato es el donador de grupos metilo para formar la metionina en una reacción irreversible, decidieron determinar la actividad de la MTHFR [Donaldson K.O, et al, 1962]; la actividad enzimática fue determinada por la medición de la radioactividad del complejo formaldehído-dimedona, formado por la oxidación del N⁵-metiltetrahidrofolato (con el grupo metilo marcado con C¹⁴) a formaldehído y tetrahidrofolato en presencia de

menadiona (como aceptor de electrones) mediante dicha enzima. Finalmente, obtuvieron como resultado una disminución en la actividad de la MTHFR, manifestándola como causa de la homocistinuria en esos pacientes.

A partir de los resultados del trabajo anterior en el que se consideraron los diferentes tipos de severidad neurológica en los tres pacientes estudiados (B.M, L.M. y C.P), siendo C.P. el que tenía un mayor deterioro y era proporcional a una menor actividad de la MTHFR en ausencia de FAD. Rosenblatt realizó otros experimentos con fibroblastos de los mismos pacientes estudiados por Mudd [Rosenblatt D.S, et al, 1977]. Los resultados obtenidos en cuanto a la actividad de la MTHFR, fueron similares a los obtenidos por Mudd, sin embargo, también determinó la actividad de esta enzima en los padres de los pacientes, obteniendo en ellos una actividad intermedia entre los pacientes y los controles, reportando que se trataba de un error innato del metabolismo de los folatos con un patrón de herencia autosómico recesivo. Rosenblatt, tras estandarizar un ensayo en cuyas condiciones encontró una actividad óptima de la MTHFR, estableció que dicha actividad es mucho menos estable a elevadas temperaturas en la ausencia de FAD, lo cual demostró la estabilidad proporcionada por este cofactor debido a la formación de un complejo con la enzima, lo cual también fue sugerido por otros autores [Donaldson K.O, et al, 1962]. Tras incubar a 55°C en la presencia de una concentración adecuada de FAD, observó una inactivación parcial a los 30 minutos de la enzima en los fibroblastos de los controles, mientras que en los pacientes esta inactivación fue mucho más severa, sobretodo en el paciente descrito por Mudd con menor actividad enzimática (C.P), en la cual, la actividad fue drásticamente disminuida (Fig. 2).

Rosenblatt concluyó que en los pacientes con menor actividad de la MTHFR, existían defectos estructurales debidos a mutaciones, que como consecuencia reducen la habilidad de esta enzima a unirse a FAD. Posteriormente en 1992, Rosenblatt y colaboradores encontraron pacientes deficientes en la MTHFR que también presentaban deficiencias en la metionina sintetasa, aumentando la severidad en los padecimientos como consecuencia del aumento de la

homocisteína al tener deficientes ambas enzimas indispensables para la formación de la metionina [Rosenblatt D.S, et al, 1992].

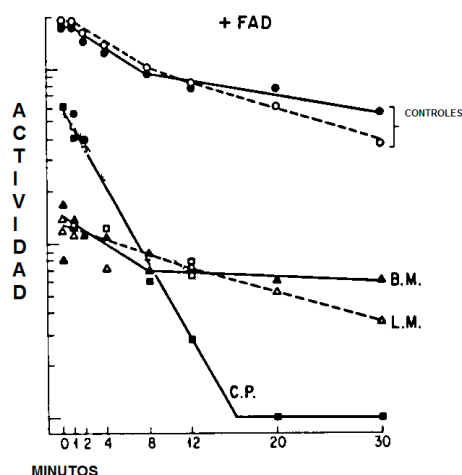


Fig. 2. Actividad de la MTHFR después de incubar los fibroblastos durante 30 minutos a 55°C de los controles y pacientes. La actividad está dada por la producción de formaldehído por minuto. Modificado de la Ref. [Rosenblatt D.S, et al, 1977].

Por su parte, Kang y colaboradores en 1991 [Kang S, et al, 1991], encontraron una nueva variante de la MTHFR diferente a la que produce la deficiencia severa, caracterizada por la ausencia de los trastornos neurológicos descritos en los pacientes por los anteriores autores, y consistían en una actividad enzimática disminuida solamente en un 50% del valor normal, además de ser termolábil *in vitro* a una temperatura de 46°C, proponiendo de esta manera, que estaba relacionada con una heterocigosis. Debido a lo anterior, establecieron que la deficiencia en la MTHFR estaba asociada a diferentes variantes de la enzima termolábil, así como también reiteraron que el patrón de herencia de la deficiencia era de tipo recesivo. En último lugar, tomando en cuenta a que la variante termolábil está ligada al desarrollo de aterosclerosis en los pacientes, establecieron una relación positiva estadísticamente significativa entre la variante termolábil descrita por su grupo en linfocitos y el desarrollo de la enfermedad arterial coronaria estudiando 212 pacientes y 202 controles.

Con el antecedente de la deficiencia de la MTHFR (con 20% de actividad residual en fibroblastos *in vitro*) como el error innato del metabolismo de los folatos mas común que conlleva a la hiperhomocisteinemia y homocistinuria, y su asociación con la enfermedad arterial coronaria descritas por Kang, Frosst y colaboradores, ellos fueron pioneros en determinar la asociación del

polimorfismo *C677T* del gen *MTHFR* como factor de riesgo para desarrollar enfermedades vasculares, utilizando el método de secuenciación [Frosst P, et al, 1995]. Lo anterior revolucionó el estudio de las enfermedades asociadas a la deficiencia de la *MTHFR*, ya que a partir de Frosst (incluso muchos de los estudios realizados actualmente utilizan su metodología) se llevó a cabo el análisis molecular en lugar del enzimático, reduciendo costos y obteniendo resultados más certeros y confiables. El aislamiento del cDNA del gen que codifica para la *MTHFR* (denominado de la misma manera) los llevó a identificar nueve variantes en pacientes con una severa deficiencia enzimática a través de PCR y secuenciación [Goyette P, et al, 1994] (Fig. 3a). Dentro de las variantes halladas, se encuentra una de particular interés, en la cual ocurre un cambio de Citosina por Timina en la posición 677 (*C677T*) que produce un cambio de alanina por valina en la posición 222 de la secuencia de aminoácidos de dicha enzima y, que en la actualidad, es objeto de muchas investigaciones. Cabe mencionar que en la secuencia de DNA donde se encuentra dicho polimorfismo, determinaron que se genera un sitio de corte para la endonucleasa de restricción *Hinfl*, lo cual permitió el análisis sencillo de este cambio (Fig. 3b); es importante aclarar que de los cambios encontrados en la secuencia del gen que codifica para esta enzima, el alelo *C677T* se obtuvo con una frecuencia del 35%, siendo el cambio más frecuente encontrado en la población estudiada.

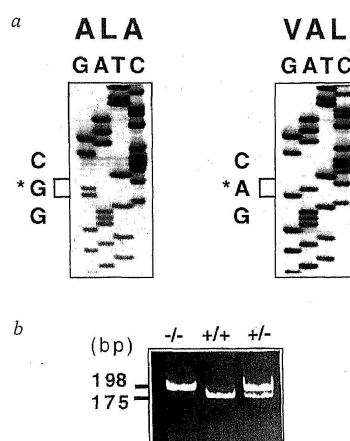


Fig. 3. Cambio en la secuencia en 677 (a) y genotipos posibles de acuerdo al corte realizado por la enzima de restricción *Hinfl* (b). Obtenido de la Ref. [Frosst P, et al, 1995].

Retomando que con el estudio relacionado a enfermedades vasculares [Frosst P, et al, 1995], se estandarizaron las metodologías y se agruparon los

pacientes en 3 grupos: pacientes con la enzima termolábil (13), controles sanos con la enzima termolábil (7) y controles sanos con la enzima con actividad normal (20) y se determinó que la actividad de la MTHFR en homocigotos C677T fue del 30 % comparando con los sujetos homocigotos para el alelo 677C, mientras que los heterocigotos tuvieron una actividad del 65%, representando un valor intermedio entre los homocigotos para el alelo mutado y silvestre; se determinó también que la actividad residual promedio de la enzima (después de inactivarse a 46°C durante 5 minutos) para los genotipos CC, CT y TT fue de 67 %, 56% y 22% respectivamente. Siendo así, correlaciona de manera formidable el genotipo con el fenotipo (actividad de la enzima), estableciendo a su vez la correlación de que el polimorfismo C677T tiene un gran impacto sobre la actividad enzimática de la MTHFR, lo cual fue confirmado cuando observaron que los niveles de homocisteína fueron estadísticamente mayores en los sujetos homocigotos para el alelo 677T en comparación con los homocigotos para 677C. Los resultados obtenidos se describen en la Tabla 1.

Tabla 1.
Correlación entre el genotipo del gen MTHFR y la actividad enzimática, actividad enzimática residual después de calentamiento y la concentración de homocisteína en plasma. Modificado de la Ref. [Frosst P, et al, 1995].

Parámetro	Genotipo		
	CC n = 19	CT n = 9	TT n = 12
Actividad específica (nmol CH ₂ O/mg Prot/h)	22.9 ± 1.7 (11.8-33.8)	15.0 ± 0.8 (10.2-18.8)	6.9 ± 0.6 (2.6-10.2)
Actividad residual después de calentar (%)	66.8 ± 1.5 (55-76)	56.2 ± 2.8 (41-67)	21.8 ± 2.8 (10-35)
Homocisteína en plasma (µM)	12.6 ± 1.1 (7-21)	13.8 ± 1.0 (9.6-20)	22.4 ± 2.9 (9.6-42)

Otra observación interesante, fue que encontraron una región de la MTHFR homóloga (que no incluye a la alanina) a una región que comprendía los aminoácidos del 130 al 149 de la dihidrofolato reductasa humana (DHFR) [Goyette P, et al, 1995], que contiene una tirosina en la posición 136, y se ha relacionado como sitio de unión del folato a la DHFR [Devles J.F, et al, 1990], establecieron que esta región también pudiera estar implicada en la unión del folato con la MTHFR y que con la unión del folato, esta enzima podría ser estabilizada, con la disminución de los niveles de homocisteína bajo la

influencia de los folatos. No obstante, los estudios realizados no encontraron una asociación estadísticamente significativa con el polimorfismo *C677T* y el riesgo de enfermedades vasculares en la población estudiada [Frosst P, et al, 1995].

A partir de Frosst se comenzaron los estudios moleculares de esta enzima, en particular con el polimorfismo *C677T* y su asociación con numerosos padecimientos, así como con los niveles altos de homocisteína, los cuales son mayores significativamente en sujetos con baja concentración de folatos en su organismo [Ueland P.M, et al, 2001]. También se ha relacionado dicha variante con la disociación de FAD, lo que conlleva a los niveles altos de homocisteína, así como la participación de los folatos en dicha alteración [Ueland P.M, et al, 2001]. Varios estudios sugieren que el estilo de vida no saludable (como el sedentarismo, tabaquismo y alcoholismo) interacciona con el genotipo TT, provocando un aumento adicional en los niveles de homocisteína [Ueland P.M, et al, 2001]. También se ha asociado el genotipo *C677TT* con una deficiente metilación del DNA en leucocitos debido a la menor cantidad disponible de 5-metiltetrahidrofolato, indispensable para la síntesis de metionina que es clave para las reacciones de metilación del DNA [Stern L.L, et al, 2000].

En cuanto a enfermedades, se estableció que la relación entre éstas y el polimorfismo *C677T* estaba determinada por aquellos padecimientos que ocasionaban un aumento en los niveles de homocisteína, donde el polimorfismo podía afectar el pronóstico; y, aquellas en las que el genotipo está asociado directamente al padecimiento, en donde el metabolismo de folatos y homocisteína esté afectado, lo cual, es de particular interés en el presente trabajo. Alguno de los padecimientos asociados son: falla renal, enfermedades cardiovasculares, cáncer, defectos congénitos, pérdida gestacional recurrente, trastornos neurológicos, entre otros [Ueland P.M, et al, 2001].

Actualmente, se establece que el gen *MTHFR* contiene 11 exones y 10 intrones (Fig. 4), se encuentra en el cromosoma 1 en el locus 1p36.3, tiene 9 transcritos diferentes de acuerdo al corte y empalme alternativo, codifica para 656 residuos que conforman los monómeros de alrededor de 76 KDa y 28

variaciones de las cuales 14 son mutaciones de sentido equivocado (en la que se incluye el polimorfismo *C677T* que se ubica en el exón 5 con #rs1801133 de identificación de SNP) de acuerdo al transcrito ENST00000376592 de Ensembl. Contiene 6 dominios, entre los cuales se encuentra un dominio de la superfamilia de las oxidorreductasas ligadas a FAD, y otro dominio que pertenece a la familia de proteínas que tienen a la actividad metilentetrahidrofolato reductasa, tanto de bacterias como de eucariontes [Ensembl – Genome Browser].

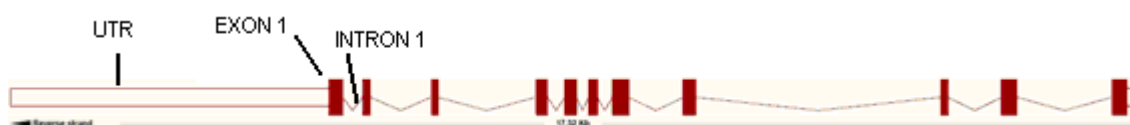


Fig. 4. Representación del gen *MTHFR* (ENSG00000177000); UTR (untranslated region), región no traducida. Obtenido de www.ensembl.org.

3.2. Frecuencia del polimorfismo *C677T*.

Previo a continuar con lo que respecta a la prevalencia en la población y a su asociación con padecimientos, es importante establecer que a este cambio de bases se le denominará polimorfismo, ya que se ha encontrado en más del 1% de la población mundial, lo cual corresponde a la definición del mismo término, pese a que es una mutación de sentido equivocado.

Debido a las múltiples asociaciones con este polimorfismo, se han realizado una gran cantidad de estudios en distintas poblaciones con el fin de conocer su frecuencia y, a su vez, establecer el riesgo que tiene cada población para los padecimientos asociados.

En una revisión del 2000 publicada en el *American Journal of Epidemiology* [Botto L.D, et al, 2000], se seleccionaron aquellos estudios que determinaron la frecuencia de la variación *C677T* en distintas poblaciones del año 1995 al año 1999 en sujetos sanos. Cabe mencionar, que se incluyeron aquellos estudios que contenían al menos 100 individuos, con algunas excepciones (en particular con algunos grupos étnicos), así como se incluyeron las distintas poblaciones

ubicadas en un solo país. Como se puede observar en las Figuras 5A y 5B, la frecuencia del alelo mutado y el genotipo homocigoto para el mismo, varía entre regiones geográficas y grupos étnicos en todo el mundo. En la población caucásica de Europa, la frecuencia de homocigotos para la variante mutada fue del 8% al 18%, en donde Alemania e Italia representaban los límites respectivamente, mientras que en los demás países iba del 10% al 14%. Para la población hispana en general (incluyendo los que residen en Estados Unidos y exceptuando a los españoles), de acuerdo a los resultados obtenidos, se estableció que la frecuencia era relativamente alta al comparar con las demás poblaciones, sin embargo, es importante mencionar que se consideraron pocos países de América sin incluir México. En cuanto a la población afroamericana, un hallazgo importante que fue objeto para estudios posteriores, fue que en los individuos de las regiones geográficas estudiadas en África no hubo ningún individuo con el polimorfismo en estado homocigoto para la variante mutada, así como que la frecuencia del alelo era la más baja, sugiriendo un efecto de ventaja selectiva que será retomado mas adelante; por su parte, en la población afroamericana de América se observó el mismo resultado, con la excepción de un estudio hasta ese año que estableció que la frecuencia de homocigotos era del 1.45% en población negra de Brasil [Arruda V.R, et al, 1998]. En asiáticos, representados en ese estudio por japoneses (debido que no se incluyeron otros países) la frecuencia fue del 11%, mientras que en población amerindia considerada en Brazil fue muy variable (desde el 1% hasta el 21% en distintas tribus). No encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la prevalencia del polimorfismo y el género de los individuos.

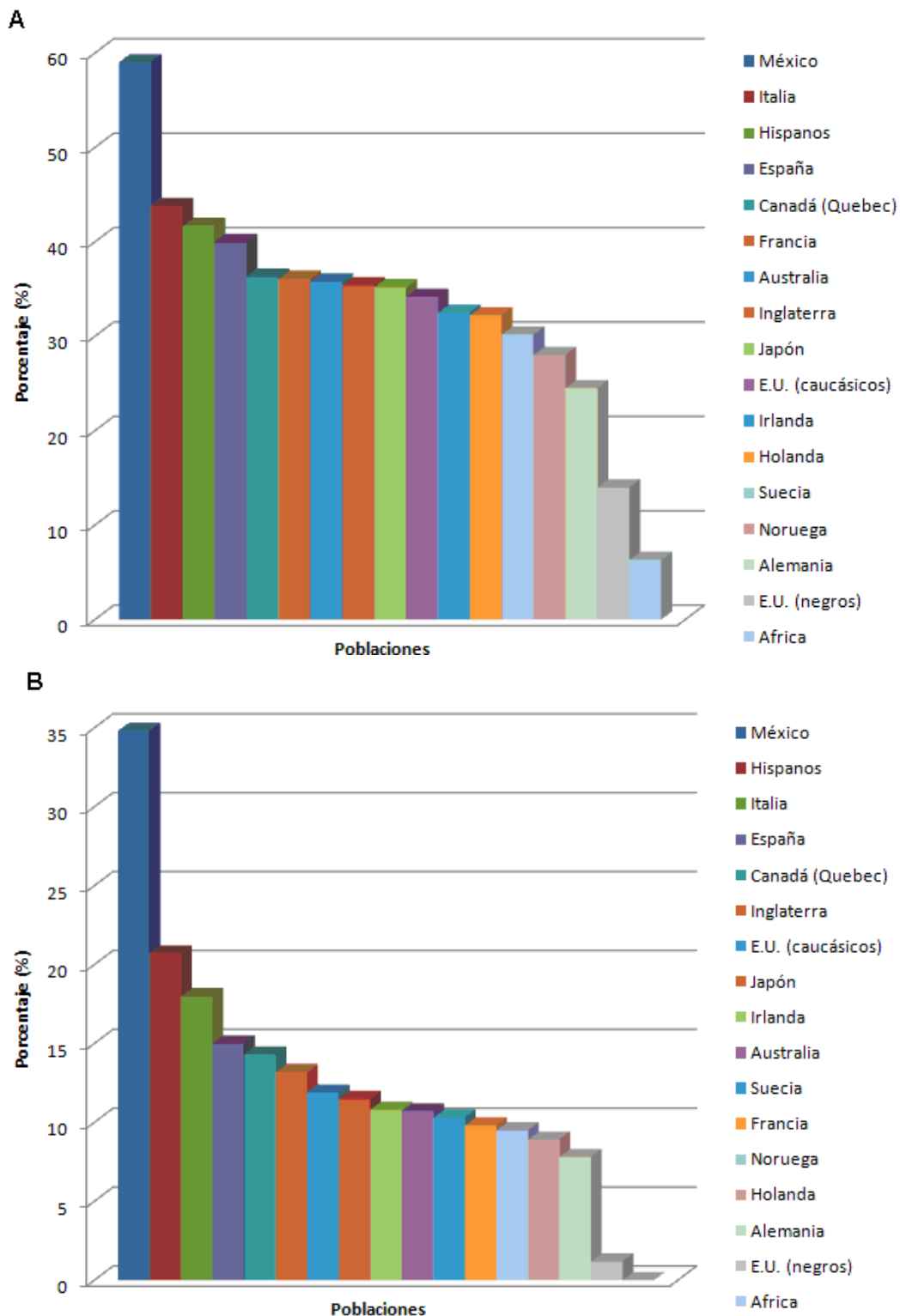


Figura 5. 5A, frecuencia del alelo C677T en distintas poblaciones. 5B, frecuencia de homocigotos para el alelo C677T en distintas poblaciones. Las frecuencias observadas fueron reportadas en estudios realizados en el periodo de 1995-1999. Los porcentajes fueron obtenidos de la Ref. [Mutchinick O.M, et al, 1999] para México, de la Ref. [Virgos C, et al, 1999] para España y de la Ref. [Botto L.D, et al, 2000] para las otras poblaciones (de las cuales se tomaron distintas regiones dentro de los mismos países). Para el caso de hispanos se tomaron en cuenta de Colombia, Estados Unidos y Brasil, para África se tomaron en cuenta Zaira, Camerún y la región del Sub-Sahara. En los demás países se tomó en cuenta la frecuencia para cada país en general.

Por otra parte, como ya se mencionó, en el anterior trabajo no se incluyó a México, y debido a las variaciones observadas en las distintas poblaciones en el mundo y su considerable asociación con defectos de tubo neural, el grupo de Mutchinick y colaboradores, estudiaron la frecuencia de este polimorfismo en la población mexicana en diferentes partes del país [Mutchinick O.M, et al, 1999]. El estudio se llevó a cabo en 250 mujeres sanas que estuvieran embarazadas y que sus cuatro abuelos fueran nacidos en México, de un total de nueve hospitales en siete estados y cuatro diferentes regiones geográficas del país (Norte con 58, Oeste con 38, Este con 110 y zona Centro con 44 mujeres). Los resultados que obtuvieron mostraron estar en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 2) y fueron anexados en las Figuras 5A y 5B. Estos resultados demostraron que existe una alta prevalencia de este polimorfismo en la población mexicana, así como de la cantidad de homocigotos para la misma, que inclusive, hasta el año de 1999 fueron la más altas reportadas de acuerdo al anterior estudio (Fig. 5A y 5B), sugiriendo que 1 de cada 3 mexicanos tiene la variante termolábil de la enzima MTHFR. Como en otras poblaciones del mundo, la distribución del genotipo TT muestra una gran heterogeneidad en la población mexicana sobretodo en las diferentes regiones del país, esto se aprecia al observar el contraste entre la zona norte y centro (Tabla 2), de las cuales, la zona norte tuvo una menor prevalencia al compararla con las demás zonas geográficas. Debido a que la población mexicana está conformada por una mezcla de distintas razas, se puede establecer que, de acuerdo a los resultados representados en las Gráficas 1 y 2 (que se muestra una menor frecuencia en otras poblaciones del mundo en comparación con la mexicana), el genotipo homocigoto para el alelo mutado podría ser un marcador genético característico de las poblaciones amerindias dentro de nuestro país, sin embargo, también hay que considerar que la frecuencias del alelo mutado y el genotipo TT para la población española fueron altas al comparar con las otras poblaciones caucásicas, sugiriendo que podría deberse a un efecto aditivo entre las poblaciones amerindia y española sobre los mestizos, puesto que en algunas poblaciones indígenas su frecuencia también es alta al comparar con caucásicos [Dávalos I.P, et al, 2000].

Tabla 2. Frecuencias del genotipo de la variante C677T del gen MTHFR y del alelo C677T en mujeres sanas de México. Modificado de la Ref. [Mutchinick O.M, et al, 1999].

Región	No.	Genotipo			Alelo T	I.C. 95%
		CC	CT	TT		
Norte	58	0.24	0.53	0.23	0.49	0.40-0.59
Este	110	0.16	0.48	0.36	0.61	0.54-0.67
Oeste	38	0.21	0.45	0.34	0.57	0.45-0.68
Centro	44	0.11	0.41	0.48	0.68	0.57-0.78
Total	250	0.18	0.48	0.34	0.59	0.54-0.63

Para establecer una explicación de la distribución de este polimorfismo en el mundo, es importante considerar lo siguiente: la heterogeneidad en la distribución de este polimorfismo, teniendo como extremos la población de Sub-Sahara de África y por el otro lado la de México con la menor y mayor frecuencias reportadas respectivamente; y, que se ha reportado un efecto de gradiente de la prevalencia del alelo 677T de norte a sur en Europa occidental, ocurriendo la mayor frecuencia en Sicilia, Italia, suponiendo que se debe principalmente a interacciones del tipo gen-ambiente [Bosco P, et al, 2003]. Es importante mencionar que el consumo de los derivados del ácido fólico es menor en la dieta de países que se ubican en el Norte de Europa que en los países Mediterráneos, lo que sugiere que la dieta rica en folatos es la responsable de la alta prevalencia del alelo 677T en estas regiones, así como de que, a pesar de que este polimorfismo está asociado a defectos congénitos, la prevalencia de estos defectos es menor en países del Mediterráneo a comparación de otros países [Bollander-Gouaille C, 2002; Zetterberg H, 2004].

Una vez considerado lo anterior, el grupo de Guéant-Rodríguez y colaboradores, estudiaron los niveles de homocisteína, folato y vitamina B12 y su relación con la variante C677T en 1277 adultos jóvenes procedentes de la ciudad de México, Benin y Togo del oeste de África, Francia y Sicilia (Tabla 3). Demostraron la interacción gen-ambiente que existe entre la variante C677T del gen MTHFR y los niveles plasmáticos de folatos, así como la ventaja selectiva que le confiere a los individuos homocigotos el alelo mutado con una dieta adecuada de folatos sobre aquellos que son homocigotos para el mismo pero con una dieta deficiente de folatos [Guéant-Rodríguez R.M, et al, 2006]. La frecuencia del alelo mutado fue mayor en México, menor en África e intermedia en Francia y Sicilia. La frecuencia mas alta del alelo mutado fue en

aquella área en la que la influencia del genotipo 677TT fue menor sobre los niveles de homocisteína, contrario a lo que ocurrió en las regiones de África, en las que se encontró una menor prevalencia de esta variante, y donde dicho genotipo repercutía de manera significativa sobre el aumento de los niveles de homocisteína (que es responsable de la mayoría de los padecimientos asociados), ya que también los niveles de folatos (que se asocian a un efecto protector) eran muy bajos a comparación de las otras poblaciones, evidenciando un efecto de presión selectiva considerando la influencia de los genes y el medio ambiente. Cabe mencionar que en todas las regiones estudiadas se observó una correlación negativa entre la frecuencia del alelo mutado y el porcentaje de personas con un nivel bajo de folatos. Cabe mencionar, que tanto en las poblaciones estudiadas de la ciudad de México como en Sicilia, que fueron las regiones con la mayor prevalencia del alelo mutado, se observó la menor deficiencia de folatos y la mayor concentración de los mismos en plasma, atribuyéndolo a la dieta rica en maíz, frijoles, lentejas, trigo, frutas frescas y vegetales que consumen, a diferencia de los países de occidente que su dieta es mucho mas rica en proteínas animales que conlleva a una disminución en el consumo de folatos, lo cual se ha comprobado en diversos estudios [Zetterberg H, 2004; de Bree A, et al, 2001; Kushi L.H, et al, 1995]. Los niveles de vitamina B12 concuerda con los niveles más altos obtenidos de folato en los individuos de México y Sicilia, reflejando la importancia de este cofactor para la obtención de metionina.

En algunas regiones donde el polimorfismo es menos frecuente y existe una dieta deficiente en folatos, se considera dicha variación como factor de riesgo en patologías como pérdida gestacional, malformaciones congénitas, enfermedades vasculares, entre otras, que se asocian principalmente a un nivel alto de homocisteína plasmática, alteración en el ciclo de los folatos y en las reacciones de metilación. Sin embargo, también es importante tomar en cuenta que en México existen muchas regiones donde la dieta es muy deficiente en los nutrimentos básicos, donde se incluye el ácido fólico, y considerando que es una población con una alta frecuencia en la variante C677T, existe un gran riesgo de ocurrencia de las patologías asociadas a esta variante. Existen muchos estudios en los que se establece que la desnutrición en México es un

problema de salud pública debido a la pobreza, dispersión de la población, escasa infraestructura sanitaria, financiamiento insuficiente para la atención en salud y otros factores.

Tabla 3.
Distribución del polimorfismo C677T del gen MTHFR y concentraciones plasmáticas de homocisteína*, folato* y vitamina B12* en diferentes poblaciones. Modificado de la Ref. [Guéant-Rodríguez R.M, et al, 2006].

Area geográfica	677 TT (%)	Alelo mutado (%)	Homocisteína (µmol/L)	Folato (nmol/L)	Sujetos def. en folatos (%)	Vitamina B12 (pmol/L)
África occidental (n=368)	0.8(0.2, 2.1) ¹	9.0(7.1, 11.2) ¹	13.5(10.0-20.1) ²	9.1(6.7-13.3) ²	26.4(22.0-31.0) ¹	463(320-662) ²
Francia (n=366)	14.2(10.1, 18.9)	36.1(31.9, 40.5)	10.0(8.6-12.0)	12.0(9.7-15.2)	6.3(4.1-9.1)	263(185-365)
Italia (n=146)	19.9(14.1, 23.0)	47.3(41.5, 53.0)	8.3(6.4-11.1)	12.4(9.3-17.4)	4.8(2.1-9.1)	329(242-432)
Ciudad de México (n=300)	35.7(29.9, 41.4)	58.0(53.8, 62.2)	9.8(7.6-12.1)	17.2(12.4-24.2)	2.0(0.8-4.0)	294(177-433)

* Medidas en 1180 individuos jóvenes adultos sanos.

La deficiencia en folatos se consideró al hallar una concentración < 7.0 nmol/L.

¹Promedio; I.C. 95%.

²Mediana; percentiles 25 y 75.

Finalmente, referente a las migraciones, se ha establecido que existen variaciones en las frecuencias alélicas de la variante mutada en cuanto a poblaciones que emigraron a otro país y las mismas que se encuentran en su lugar de origen, lo cual puede deberse a la influencia del ambiente nutricional sobre los genes, sin embargo, se atribuyó en mayor medida a que los estudios considerados incluían individuos de diferentes edades, a la mezcla de grupos étnicos y al diseño diferente de los estudios [Guéant-Rodríguez R.M, et al, 2006].

3.3. Homocisteína, folatos y el polimorfismo C677T.

La relación que existe entre la homocisteína, los folatos y la variante C677T, se rige principalmente por la alteración en las rutas bioquímicas que están implicadas en el metabolismo de estas dos sustancias (y las consecuencias de dicha alteración), que es influenciada por el polimorfismo y el estado nutricional. Debido a que ha habido algunas discrepancias entre los resultados obtenidos por diferentes estudios en la relación anterior, se creó un modelo matemático el cual utiliza los resultados publicados hasta el 2006 sobre la cinética de las enzimas involucradas en el metabolismo de los folatos y sus mecanismos regulatorios, simulando *in silico* el impacto de las variaciones genéticas y nutricionales en las rutas bioquímicas [Reed M.C, et al, 2006]. La confiabilidad de este modelo se verificó al encontrar que las predicciones obtenidas concordaban con los resultados experimentales. Los resultados obtenidos confirmaron la relación anterior, dentro de los cuales destaca lo siguiente: existe una relación inversamente proporcional entre la cantidad de folato y la cantidad de homocisteína, a niveles bajos de folato; la disminución de la actividad en la MTHFR disminuye a su vez la concentración de S-adenosilmetionina y 5-metiltetrahidrofolato, así como la metilación del DNA y, por el contrario, aumenta los niveles de homocisteína y S-adenosilhomocisteína, así como la síntesis de timidina y purinas.

Por otra parte, retomando el aspecto de que el genotipo homocigoto para el alelo T de este polimorfismo se ha encontrado en una alta proporción en la población mexicana [Mutchinick O.M, 1999] y que, junto con las variaciones de alimentación, pueden condicionar a una elevación de homocisteína en sangre (considerada por arriba de 15 $\mu\text{mol/mL}$ [Morales J.J, et al, 2003]), se realizó un estudio en el que se incluyeron sujetos con una baja ingesta de folatos y con complicaciones de aterosclerosis en edad joven, concluyendo a partir de 250 pacientes que el genotipo 677TT (aunado a una deficiencia de folatos) proporciona un mayor riesgo de presentar hiperhomocisteinemia que los otros factores aislados [Morales J.J, et al, 2003].

Debido a la relación que existe entre estos factores y a su asociación con diversos padecimientos sobretodo en población mexicana, los dos primeros se

tratarán por separado para después reunirse como parte del conjunto de patologías que están asociadas al polimorfismo *C677T*.

3.3.1. Homocisteína.

La homocisteína es un aminoácido (del grupo de aminoácidos que no forman parte de la estructura primaria de las proteínas) con un grupo sulfhidrilo, formado como producto de las reacciones de metilación a partir de la metionina utilizando como intermediario a la S-adenosilmetionina [Ramakrishnan S, et al, 2001]. Se encuentra en circulación, donde es fácilmente oxidada, dando como producto compuestos en los que el grupo tiol es reemplazado por un enlace disulfuro (Fig. 6). La homocisteína es convertida a cisteína en presencia de la enzima cistationina-β-sintetasa y cistationina liasa en una reacción irreversible dentro de la vía de transulfuración [Medina M.A, et al, 2001], donde la cisteína posteriormente puede formar parte del glutatión, el cual es la principal defensa endógena en contra de agentes oxidantes. Como ya se ha mencionado, la homocisteína puede dar lugar a la metionina por la vía de metilación o por la vía de la betaína a través de la colina, sin embargo la segunda vía solo ocurre en el hígado mientras que la primera ocurre en todo el organismo [Ramakrishnan S, et al, 2001].

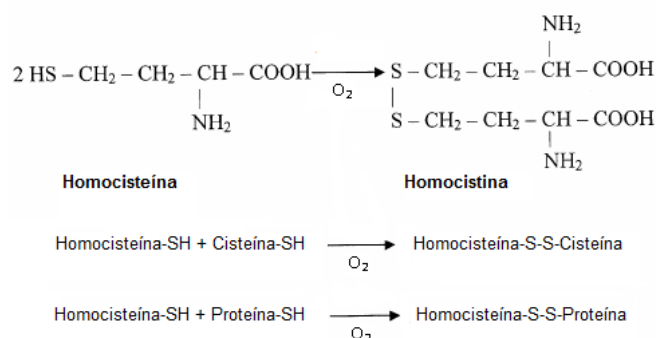


Fig. 6. Homocisteína y productos formados por su oxidación. Traducido de la Ref. [Ramakrishnan S, et al, 2006].

Al aumento de homocisteína en sangre se le denomina homocisteinemia y debido a su oxidación a homocistina, la presencia de esta última en la orina se denomina homocistinuria. Por lo tanto, para determinar que el metabolismo de la homocisteína es anormal, se pueden analizar los niveles de homocistina ya

sea en sangre u orina o analizar los niveles de homocisteína en sangre con una previa reducción de los puentes disulfuro, para determinar a su vez, el estado patológico de un paciente en cuanto a los padecimientos asociados a la homocistinuria [Ramakrishnan S, et al, 2006]. La homocistinuria en la orina puede detectarse mediante una prueba de nitroprusiato con nitrato de plata, en la cual la homocistina se reduce a homocisteína por el nitrato de plata, y la homocisteína forma un complejo con el nitroprusiato mediante los grupos sulfhidrilos, dando una coloración característica. Por otra parte, los niveles de homocisteína en plasma pueden ser medidos mediante el empleo de diversas técnicas como ensayos enzimáticos, ELISA y HPLC, siendo los dos últimos los mas utilizados debido a su mayor sensibilidad, reproducibilidad y confiabilidad que el primero [Ramakrishnan S, et al, 2006].

Las homocistinurias son un grupo de padecimientos asociados a un error en el metabolismo de la homocisteína, donde los individuos afectados excretan grandes cantidades de homocistina en orina; existen cuatro tipo de homocistinurias reportadas (I-IV) [Ramakrishnan S, et al, 2006]. La homocistinuria tipo I es aquella que es producto de la deficiencia en la cistationina- β -sintetasa que puede ser congénita, dicha enzima se requiere para la vía de transulfuración y es necesaria para obtener cisteína, utilizando como cofactor a la vitamina B6 (Fig. 1); en este tipo de homocistinuria la deficiencia enzimática conlleva a una acumulación de homocisteína y metionina, así como una disminución de cisteína, provocando efectos adversos como el retraso mental ocasionado por el aumento de metionina, el cual es un indicio importante de este tipo de homocistinuria, además de convulsiones, ectopia lentis (dislocación de los lentes oculares), alteraciones vasculares como aterotrombosis, osteoporosis y otras anormalidades óseas [Mudd S.H, et al, 1983]. Para el tratamiento de la homocistinuria tipo I, se ha considerado la administración de vitamina B6, con el fin de aumentar la eficiencia de la actividad residual. A diferencia de la homocistinuria de tipo I, las homocistinurias de tipo II a IV están relacionadas con una deficiencia en las enzimas que participan en la vía de metilación de la metionina o en la absorción de algunos componentes que tienen que ver con esta vía, y su tratamiento tiene que ver principalmente con una suplementación de folatos e

inclusive de metionina, ya que no hay retraso mental. Mientras que la homocistinuria de tipo III se debe a una deficiencia en la metionina sintetasa (que se requiere para obtener metionina a partir de homocisteína) y la homocistinuria de tipo IV se debe a una deficiente absorción de la vitamina B12 (cofactor de la metionina sintetasa, ya que ésta metila la homocisteína utilizando metil-B12), la homocistinuria tipo II corresponde a una deficiencia en la enzima MTHFR [Sulochana K.N, et al, 2000], esta última es de especial interés para este trabajo, y se caracteriza porque no hay formación del 5-metiltetrahidrofolato necesario para la metilación de la homocisteína. Para las homocistinurias II a IV se han mencionado las características de los padecimientos asociados a niveles altos de homocisteína, aunque cabe mencionar que para el caso de la tipo IV, debido al defecto del metabolismo de la vitamina B12, también se presenta retraso psicomotor, letargia anemia megaloblástica, entre otros [Ramakrishnan S, et al, 2001].

Además de las homocistinurias se han establecido diversos tipos de hiperhomocisteinemias basándose en la concentración total de homocisteína en plasma, definiendo como severa aquella en la que la concentración es mayor a 100 $\mu\text{M/L}$, intermedia en la que se encuentra entre 30 y 100 $\mu\text{M/L}$, y moderada para concentraciones entre 15 y 30 $\mu\text{M/L}$, tomando como referencia un rango de 5 a 15 $\mu\text{M/L}$ totales de Homocisteína en sujetos sanos [Kang S.S, et al, 1992].

En cuanto a los padecimientos asociados a los niveles altos de homocisteína, la mayoría de los estudios han encontrado asociación con enfermedades trombóticas, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo I como consecuencia del alto riesgo para aterosclerosis, complicaciones oculares en las cuales la homocisteína es utilizada como marcador de las mismas (catarata congénita y adquirida en niños), enfermedad oclusiva ocular de la retina, insuficiencia renal, entre otras [Ramakrishnan S, et al, 2006], algunas de las cuales se retomarán con detalle más adelante.

Las manifestaciones de la hiperhomocisteinemia se deben principalmente a la incorporación de la homocisteína en algunos aminoácidos de las proteínas

presentes en el cuerpo y al estrés oxidante [Ramakrishnan S, et al, 2006], cuyo mecanismo molecular y estudios asociados se presentan a continuación.

Incorporación de homocisteína en proteínas.

Existen dos mecanismos por los cuales se lleva a cabo este tipo de reacción. El más sencillo consiste en la reacción no enzimática de la homocisteína libre con los grupos sulfhidrilos de las proteínas para dar como producto a un aducto de ambos compuestos unidos mediante un enlace disulfuro (Fig. 7). Esta reacción depende proporcionalmente de la cantidad de homocisteína libre en plasma, y se ha demostrado que afecta la función de proteínas y enzimas conforme más grupos de homocisteína contengan [Lussier-Cacan S, et al, 1996].

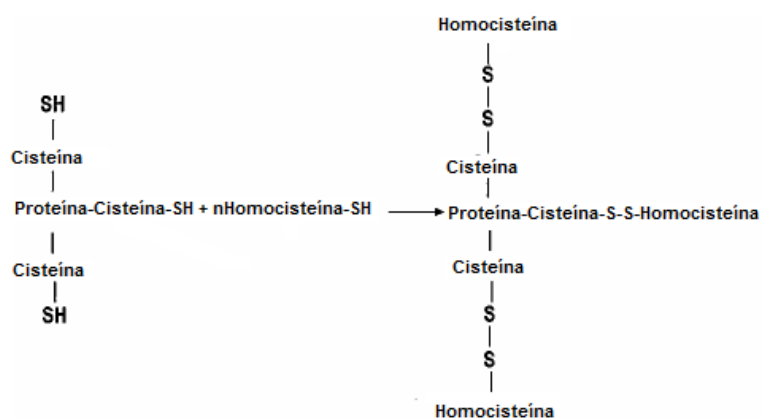


Fig. 7. Reacción de la homocisteína libre con los residuos de cisteína de una proteína. Traducido de la Ref. [Ramakrishnan S, et al, 2006].

El segundo mecanismo, considerado más complejo debido a que los efectos dañinos se deben a la previa formación de un tioéster cíclico, denominado homocisteína tiolactona, el cual es un metabolito de la homocisteína formado cuando hay una alteración en las vías de transulfuración o metilación [Jakubowski H, et al, 1999]. Dicho metabolito es un complejo formado por la unión de AMP (adenín monofosfato) y la homocisteína [Jakubowski H, et al, 1990].

La homocisteína tiolactona es altamente reactiva y puede acetilar fácilmente los grupos amino de las proteínas en condiciones fisiológicas [Jakubowski H, et al, 1999], en particular aquellas proteínas que contengan un residuo de lisina en la posición ϵ , para formar el aducto correspondiente mediante un enlace amida o

peptídico (Fig. 8a). Esta reacción es favorecida, al igual que la anterior, con el aumento de homocisteína en plasma y puede llevarse a cabo en muchos residuos de lisina que estén disponibles [Medina M.A, et al, 2001]. La formación de este aducto en el 33% y 88% de los residuos de lisina en la metionina sintetasa y la tripsina, respectivamente, resulta en la pérdida completa de su actividad enzimática [Jakubowski H, et al, 1990], además de que las proteínas que presentan estos aductos tienden a presentar cambios conformacionales que los llevan a su desnaturalización, así como también a generar proteínas plasmáticas modificadas. Las proteínas plasmáticas modificadas pueden provocar a su vez un daño vascular a través de los macrófagos o por la formación de complejos inmunes al acumularse en las paredes de los vasos sanguíneos, hasta llegar inclusive a formar una placa aterosclerótica [Jakubowski H, et al, 1999]. Cabe mencionar que la homocisteína tiolactona también puede reaccionar con los grupos sulfhidrilo libres para formar un aducto parecido descrito en el primer mecanismo, inclusive en la misma proteína (Fig. 8b) [Medina M.A, et al, 2001].

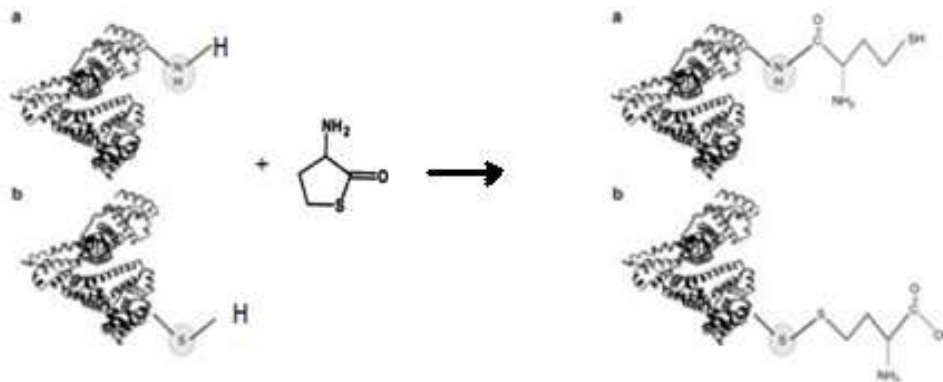


Fig. 8. Aductos formados por la reacción de la homocisteína tiolactona con a) Lisina y b) Cisteína, en proteínas. Modificado de <http://www.nature.com/ki/journal/v69/n5/full/5000070a.html>.

Estrés oxidante.

El estrés oxidante se define como una condición en la cual existe un desbalance entre la producción de especies reactivas y antioxidantes, y puede ser producto de la disminución en los niveles de antioxidantes o el incremento en la producción de las especies reactivas [Halliwell B, 2006].

La homocisteína ejerce sus efectos adversos principalmente mediante el estrés oxidante [Ramakrishnan S, et al, 2006]. Es importante mencionar que la oxidación de la homocisteína en plasma conlleva a la formación de la homocistina, compuestos azufrados unidos a homocisteína y la homocisteína tiolactona y los productos de la misma, lo cual a su vez, provoca que se generen especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y los radicales libres hidroxilo. Estas especies reactivas de oxígeno oxidan las moléculas endógenas como proteínas y lípidos de las membranas provocando un daño endotelial, principalmente [Medina M.A, et al, 2001]. Se han llevado a cabo numerosos estudios en los que se demuestra lo anterior, donde también se mencionan algunos otros aspectos relevantes.

Las proteínas y aquellos compuestos en el organismo que no pertenecen a las proteínas (como la homocisteína) que contienen un grupo tiol, tienen la capacidad de modular el potencial oxidante en el plasma. Sin embargo, se ha establecido en diversos estudios en los que por un lado, estos compuestos actúan como prooxidantes al estar elevados en plasma (principalmente la homocisteína o cisteína) [Cavalca V, et al, 2001] y que son factores de riesgo independientes para enfermedades cardiovasculares, y por el contrario que los tioles totales en plasma como el glutatión, están disminuidos en pacientes con aterosclerosis [Di Giuseppe D, et al, 2004]; lo anterior depende principalmente al compuesto con grupo sulfhidrilo del cual se trate y las dosis del mismo, ya que el glutatión es el agente antioxidante endógeno por excelencia, mientras que la homocisteína y otros compuestos de bajo peso molecular con grupos tioles, como ya se mencionó anteriormente, pueden reaccionar con compuestos azufrados y generar especies reactivas de oxígeno que causan un daño en el organismo. Dentro del contexto anterior, un estudio demostró que independientemente de su origen metabólico, la concentración elevada en plasma de los compuestos con grupos tioles está asociada a una promoción más que a una supresión del estrés oxidante, basándose en que los compuestos con grupos tioles generados en individuos expuestos a disulfuro de carbono (que como resultado de su interacción con proteínas provoca el aumento de compuestos con grupo tiol en plasma) promovieron la peroxidación de lípidos y la inhibición de la glutatión peroxidasa dependiente de NADPH

[Wronska-Nofer T, et al, 2007]. La glutatión peroxidasa dependiente de NADPH se encarga de convertir el peróxido de hidrógeno y otros peróxidos orgánicos a alcohol no tóxico, por lo que al ser inhibida, los compuestos con grupos tioles tienen un efecto prooxidante [Wronska-Nofer T, et al, 2007].

De acuerdo a algunos autores, el efecto antioxidante de la homocisteína, debido a su grupo tiol, se observa a concentraciones muy bajas en las células [Zappacosta B, et al, 2000], lo cual puede deberse al efecto dual que tienen algunos compuestos, en los que a bajas concentraciones se observa el efecto contrario al que se observa en concentraciones mayores. En un estudio que se llevó a cabo en ratas intoxicadas con Plomo, se determinó el efecto antioxidante de algunos compuestos endógenos que contienen grupos tiol, dentro de los cuales se incluyó a la homocisteína [Caylak E, et al, 2008]. El plomo es un metal pesado que representa una de las causas más comunes de intoxicación con metales pesados, el cual, se ha demostrado que tiene un efecto oxidante indirecto *in vitro* e *in vivo*, provocando daño en glóbulos rojos, peroxidación de los lípidos en sus membranas, inhibiendo la síntesis del grupo hemo y la hemoglobina, promoviendo la autooxidación de la hemoglobina, entre otros que se manifiestan como anemia [Leggett R.W, 1993]. Sin embargo, en este estudio no se observó un efecto antioxidante estadísticamente significativo como para asumir que la homocisteína tiene un papel protector en contra de las especies oxidantes, ya que no se observó un cambio en las concentraciones de hemoglobina en aquellas ratas que se les administró homocisteína y plomo a comparación de aquellos que solo fueron tratados con plomo, y por el contrario, se observó que la actividad de la Superóxido Dismutasa (que elimina superóxidos) fue disminuida, que junto con el glutatión, representan una de las principales defensas en contra de las especies oxidantes [Leggett R.W, 1993]. También es importante mencionar que determinaron que los niveles de vitamina A en las ratas tratadas con homocisteína y plomo fueron menores que en aquellas ratas que solo fueron tratadas con plomo [Leggett R.W, 1993], lo cual sugiere un efecto aditivo oxidante, puesto que la vitamina A y E son antioxidantes no enzimáticos [Attri J, et al, 2003].

Se ha establecido también que la homocisteína puede inducir la formación de micronúcleos en linfocitos humanos *in vitro*, los cuales son estructuras que contienen DNA y que son formados durante la mitosis como resultado de la ruptura en los cromosomas (o de la distribución incorrecta de los mismos en la mitosis), siendo de esta manera, marcadores de daño genotóxico generado, en este caso, por las especies oxidantes que se crean por la formación de los metabolitos de la homocisteína [Crott J, et al, 2001]; de esta manera se sugirió, en este caso, que el responsable de este daño genotóxico, observado *in vivo* cuando las concentraciones de homocisteína en plasma son elevadas, se debió al daño relacionado con la homocisteína mas que a la deficiencia en folatos que también se ha asociado con la presencia de micronúcleos. Otros estudios *in vitro* realizados en líneas celulares de linfoma de ratón y leucémicas de humano, demostraron un aumento en la presencia de micronúcleos cuando fueron tratadas con concentraciones de homocisteína de hasta 5mM a comparación de los respectivos controles [Fink K, et al, 2007].

Se ha demostrado que la homocisteína induce estrés oxidante en el cerebro de ratas a través de la disminución de las sustancias antioxidantes y el aumento en la peroxidación de lípidos [Matté C, et al, 2004], además de que la homocisteína es una neurotoxina y tiene un efecto particular en el cerebro, lo cual se retomará posteriormente. Para demostrar lo anterior, se llevó a cabo un estudio en el cual se administró homocisteína en ratas a concentraciones similares a las que tienen las personas con homocistinuria mediante una administración crónica después de 6 días de su nacimiento (asumiendo que el desarrollo en esta etapa es parecido al del humano) [Matté C, et al, 2008]. Dentro de los resultados obtenidos, observaron que la administración crónica de homocisteína redujo el potencial antioxidante de los mecanismos no enzimáticos en la corteza parietal y en el plasma, lo que fue prevenido con la administración de ácido fólico. Al evaluar la actividad de las enzimas con actividad antioxidante, se encontró que la homocisteína inhibió las enzimas catalasa (elimina el peróxido) y glutatión peroxidasa en la corteza parietal de las ratas, lo cual puede aumentar la cantidad de peróxido de hidrógeno en el organismo, que a través de la reacción de Fenton puede generar el radical hidroxilo, el cual es altamente reactivo. También encontraron que la

hiperhomocisteinemia crónica indujo daño en el DNA de la corteza parietal y en células sanguíneas determinado por el ensayo cometa (que detecta fragmentos de DNA) y que, después de administrar ácido fólico, se observó un efecto preventivo.

Otras asociaciones.

Además de su asociación con el estrés oxidante y las reacciones producidas en las proteínas anteriormente descritas, se ha asociado la homocisteína con otros factores, ya sea relacionado o no, con el estrés oxidante.

Un estudio realizado en Francia con 500 adultos mayores (de un rango entre 60 y 101 años) estableció una relación importante entre la homocisteína, la producción de anión superóxido y la inflamación [Ventura E, et al, 2008]. En primer lugar, reforzando lo anterior, demostraron que los niveles de homocisteína y anión superóxido se incrementan con la edad debido a una deficiencia de vitaminas que se observan en esta edad, en este caso en particular a la deficiencia en vitamina B12 (cofactor de la metionina sintetasa) y folatos; a su vez, confirmaron que la homocisteína promueve la expresión de la oxidasa NADPH presente en neutrófilos y monocitos hasta dos veces más de lo normal, lo que conlleva a una sobreproducción de anión superóxido. Por otra parte, tomando en cuenta que existe una relación entre el estrés oxidante y la inflamación, en la cual una activa a la otra, encontraron una asociación entre los niveles altos de homocisteína y de Proteína C Reactiva (mediador inflamatorio), lo cual concuerda con la observación *in vitro* del aumento en la síntesis de citocinas proinflamatorias en presencia de homocisteína en células endoteliales [Dalal S, et al, 2003]. Finalmente, basándose en que la oxidasa NADPH puede activarse también por mediadores inflamatorios como la proteína C reactiva [DeLeo F.R, et al, 1998], establecieron que en monocitos tratados *in vitro* tratados con homocisteína tiolactona y lipopolisacárido (polímero presente en bacterias Gram negativas que desencadenan una respuesta inflamatoria al ser reconocido por los macrófagos), se observa un efecto sinérgico en la producción del anión superóxido (Fig. 9), lo cual es de

gran importancia en el desbalance que se observa en el estrés oxidante y en las consecuencias que éste conlleva.

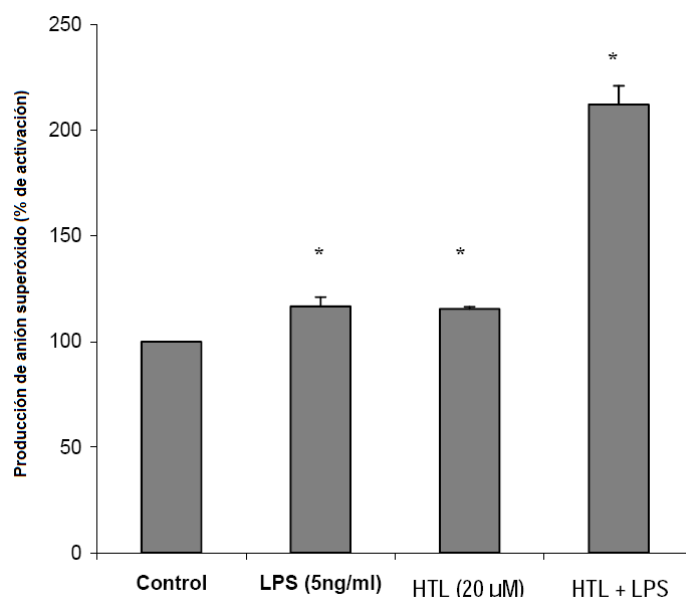


Figura 9. Sinergia entre la homocisteína tiolactona y el Lipopolisacárido en la producción de anión superóxido. Las células fueron tratadas con bajas concentraciones de acuerdo a las concentraciones establecidas en otros ensayos dentro del mismo estudio. La producción del anión superóxido fue determinada mediante luminometría, utilizando un mitógeno que induce la producción de esta especie reactiva de oxígeno al estimular la oxidasa NADPH. El 100% del efecto (control) se considero al incubar las células en vehículo. Traducido de [Ventura E, et al, 2008].

Otra asociación muy interesante descrita recientemente, relaciona los niveles de homocisteína con la longitud de los telómeros en leucocitos (LTL). Basándose en que el acortamiento de la LTL se ha observado en distintas enfermedades y condiciones que se caracterizan en un incremento en el estrés oxidante y la inflamación [Ueland P.M, et al, 2001], se estableció la hipótesis de que la homocisteína era el vínculo entre estas condiciones y el acortamiento de la LTL [Richards J.B, et al, 2008], tomando también en cuenta que la homocisteína puede inhibir la telomerasa (transcriptasa reversa que reconstituye la longitud del telómero) [Zhu J.H, et al, 2006]. Para lo anterior, se realizó un estudio en 1319 personas, ajustando las variables como edad, sexo, etc. Obtuvieron como primera instancia una relación entre la LTL y los niveles de homocisteína, en la cual al aumentar los niveles de homocisteína se encontró una menor LTL que en aquellas personas con los menores niveles de homocisteína (Fig. 10), cuya diferencia en dichos niveles se estableció que era equivalente a 6 años de pérdida acumulada de la longitud de los telómeros,

aunque también hay que considerar que existe una gran variación en la LTL entre individuos (al menos del 15% en cuanto a la edad), lo cual se compensó con el tamaño de muestra. Se planteó la idea de que esta pérdida en los telómeros se debió a que la homocisteína, como resultado del daño celular que provoca, aumenta la demanda en la proliferación de las células madre hematopoyéticas, que tiene como consecuencia el acortamiento de los telómeros por replicación, así como la posible disminución en la vida media de las células sanguíneas (en este caso) [Ito K, et al, 2006]. Otro factor asociado a lo anterior, fue el estrés oxidante provocado por la homocisteína, lo cual se comprueba con la reversión de dicho acortamiento de los telómeros al utilizar catalasa *in vitro* [Xu D, et al, 2000]. Otro aspecto importante que encontraron, fue que los niveles bajos en folatos estaban asociados a un acortamiento mayor en la LTL comparando con aquellos sujetos con niveles altos (no se mencionan las referencias para dichos niveles); esto puede revertirse con una ingesta adecuada de ácido fólico, ya que también de esa manera se disminuyen los niveles de homocisteína.

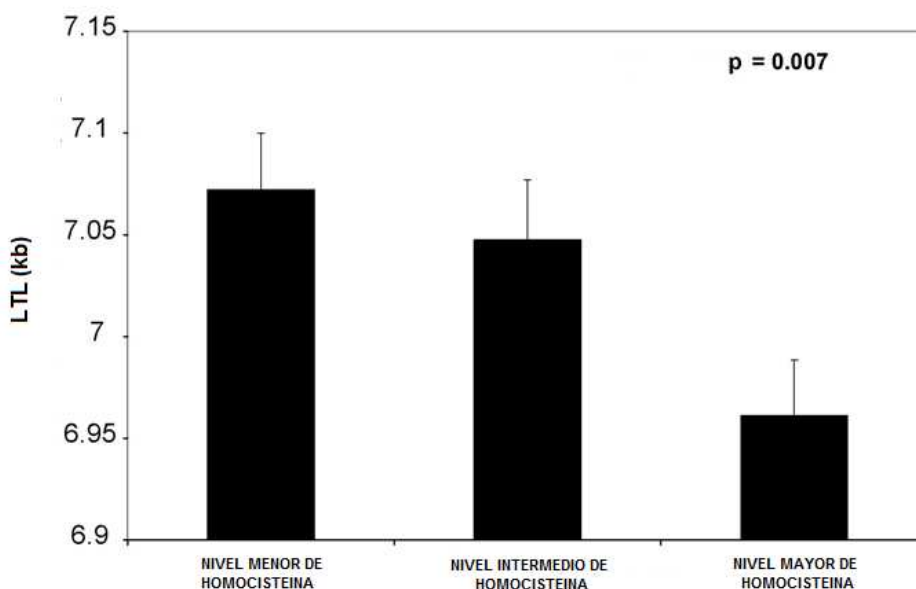


Fig. 10. Asociación entre los niveles de homocisteína y la longitud telomérica en leucocitos. Los niveles de homocisteína entran dentro de los valores considerados normales Ref. [Morales J.J, et al, 2003]. Los niveles corresponden: menor, 6.0 $\mu\text{mol/L}$; intermedio, 8.1 $\mu\text{mol/L}$; mayor, 11.8 $\mu\text{mol/L}$. Traducido de la Ref. [Richards J.B, et al, 2008].

Como se puede observar, las implicaciones que tienen los niveles altos de homocisteína son incontables, así como también la asociación que tiene con

distintos padecimientos, en particular ligada a la variante A222V de la enzima MTHFR. A pesar de que éstos se mencionarán mas adelante, es importante hacer énfasis a continuación en un mecanismo por el cual se fundamentan muchas de las asociaciones con patologías específicas, en el cual se remarca una interacción entre el ambiente y los genes, lo cual es el principio de las enfermedades complejas.

Epigenética y homocisteína.

Como ya se mencionó al principio de este capítulo, existe una relación directa entre el metabolismo de la homocisteína, del folato y las reacciones de metilación en el DNA, lo cual tiene un papel indispensable en el control epigenético en la expresión génica.

Dentro de las reacciones de metilación enzimáticas, anteriormente mencionadas, existen alrededor de algunas decenas de diferentes reacciones que utilizan la S-adenosilmetionina como donador de grupos metilo, siendo los receptores de dichos metilos distintas moléculas como los lípidos, proteínas (como las histonas) y ácidos nucleicos. Muchas de las metiltransferasas participan en las reacciones de metilación en el humano, las cuales comparten regiones estructurales que participan en la unión y reconocimiento de la S-adenosilmetionina, así como también de la S-adenosilhomocisteína, que como ya se mencionó anteriormente, participa como inhibidor competitivo para dichas enzimas; para asegurar que la relación de S-adenosilmetionina / S-adenosilhomocisteína se mantenga adecuada (y por lo tanto no se inhiban las reacciones de metilación de forma inadecuada), la homocisteína es metabolizada rápidamente para dar lugar a la cisteína (Fig. 1) [Ingrosso D, et al, 2009]. Se dice que las metiltransferasas son enzimas bifuncionales, ya que permiten la formación de productos metilados y a su vez, aseguran la formación de la homocisteína como intermediario en las reacciones involucradas [Clarke S, et al, 2001].

Las modificaciones epigenéticas en el genoma, están reguladas en gran parte por las reacciones de metilación del DNA. Es importante mencionar que en cuanto a epigenética, se entiende como el estudio de los cambios heredables

que ocurren en los productos funcionales de los genes y que no dependen de las variaciones en la secuencia de nucleótidos del DNA, por lo tanto, representa una importante conexión entre el genotipo, el fenotipo y el ambiente. Un ejemplo claro de este concepto, es que, a pesar de que todas las células comparten el mismo genotipo, durante el desarrollo se generan diferentes tipos de células y órganos con distintas funciones, que también son influenciadas por el ambiente. Otros mecanismos que forman parte de la epigenética son los RNA no codificantes, los transposones, la acetilación y metilación de histonas, los cuales junto con la metilación de histonas, se han comenzado a asociar con padecimientos diversos como el cáncer [Santos-Reboucas C.B, et al, 2007]. Por su parte, la metilación del DNA mantiene la integridad estructural y funcional del genoma, regula la represión transcripcional y la impronta, etc. Los dinucleótidos CpG (palindrómicos), sirven como sustratos para las metiltransferasas del DNA, que metilan el carbono en la posición 5 de la citosina, impidiendo la unión de la maquinaria de transcripción; sin embargo existen regiones ricas en CpG (denominadas islas CpG), las cuales no están metiladas, debido a que se asocian a las regiones promotoras de genes constitutivos [Ulrey C.L, et al, 2005].

Existen cuatro genes distintos que codifican para las diferentes isoformas de las metiltransferasas para DNA (DNMT), de las cuales, tres son activas y tienen un alto grado de homología entre ellas, son: DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. Estas enzimas tienen un grado de especialización que depende del receptor del grupo metilo, como en el caso de la DNMT1 que actúa sobre el DNA hemimetilado, y está involucrada en el mantenimiento de la metilación del DNA después de la replicación; por su parte, las DNMT3A y DNMT3B se encargan de metilar de novo el DNA desmetilado, como aquel que se observa durante la embriogénesis. Se dice que las DNMT1 y DNMT3B son dependientes del ciclo celular, mientras que la DNMT3A es independiente del ciclo celular [Ingrosso D, et al, 2009].

La inhibición en las reacciones de metilación del DNA debido a los altos niveles de homocisteína se ha observado *in vitro* e *in vivo* tanto en animales como en humanos. Además, es importante mencionar, que se ha encontrado DNA

genómico en un estado hipometilado en individuos homocigotos para el polimorfismo *C677T* del gen *MTHFR* en leucocitos de sangre periférica [Stern L.L, et al, 2000; Friso S, et al, 2002]. Por lo tanto, los niveles altos de homocisteína y esta variante, indican una desregulación en las reacciones de metilación del DNA y por lo tanto una alteración en la regulación epigenética. Lo anterior tiene como consecuencia final una aberración en la expresión de distintos genes, ya sea inhibiendo la expresión de aquellos genes indispensables (como los genes supresores de tumor) o promoviendo la sobreexpresión de aquellos que pueden tener un efecto negativo (oncogenes). Sin embargo, es importante aclarar que los niveles de homocisteína no son los únicos determinantes en la metilación del DNA, ya que se encuentran otros factores como la impronta, la etapa del desarrollo, entre otros.

3.3.2. Folatos y su metabolismo.

El descubrimiento de que la suplementación de ácido fólico periconcepcional reduce la ocurrencia y recurrencia de los defectos de tubo neural representó un gran avance en la prevención de malformaciones congénitas [Ueland P.M, et al, 2001]. Lo anterior se atribuye no sólo a que participa en el catabolismo de la homocisteína, si no que también tiene propiedades antioxidantes, además de que se ha reportado que tiene un papel importante para mantener la estabilidad del DNA a través de la prevención en la incorporación errónea de uracilo en el DNA, rupturas en las cadenas del DNA y la formación de micronúcleos [Muñoz J.B, et al, 2007]. Por lo tanto, a continuación se describen algunos aspectos importantes referentes al ácido fólico.

Estructura y función.

El ácido fólico es una vitamina hidrosoluble que está incluida en el grupo de vitaminas del complejo B y fue aislada por primera vez de las hojas de espinacas en 1941, para posteriormente ser sintetizada en 1946 [Van der Put N.M, et al, 2001]. Su nombre químico es ácido pteroil-L-glutámico, ya que está conformado por ácido glutámico, ácido p-aminobenzoico y un núcleo de pteridina [Secretaría de Salud, 2003], cuya estructura y algunos derivados de interés se muestran en la figura 11. En general, los folatos se refieren a diferentes formas de vitaminas constituidas de un anillo de pteridina además del ácido p-aminobenzoico y de uno a seis ácidos glutámicos (en general), sin embargo, el término de ácido fólico se utiliza para la forma sintética la cual está presente en suplementos como tabletas o alimentos fortificados; dicha forma sintética se encuentra en forma de monoglutamato, que es rápidamente absorbida por el intestino delgado sin ser modificada enzimáticamente [Van der Put N.M, et al, 2001]. La forma natural del ácido fólico está representada por los poliglutamatos que están unidos por enlaces de tipo amida por el carboxilo que contiene el carbono γ , los cuales también son absorbidos en el intestino delgado, pero requieren una conversión previa a monoglutamatos [Rosenberg I.H, 1986]. Dentro de los poliglutamatos encontrados en las fuentes naturales

se encuentran principalmente los derivados del 5-metiltetrahidrofolato y el 10-formiltetrahidrofolato (Fig. 11). El centro activo, lugar en el que se encuentran los grupos funcionales de un carbono que participan en las reacciones involucradas en el metabolismo de los folatos, se localiza entre los nitrógenos de la posición 5 y 10. En mamíferos, la función de los folatos como sustrato está relacionada en varias vías metabólicas que están conectadas entre sí, como la biosíntesis de timidilato y purinas (que es indispensable en la síntesis del DNA), la síntesis de la metionina a través de la metilación de la homocisteína, entre otras (Fig. 1). Como ya se mencionó anteriormente, los derivados del folato son donadores de grupos metilo en muchas de las reacciones de metilación del DNA, contribuyendo a la regulación en la expresión génica. Por lo tanto, el folato es indispensable en la división, diferenciación, viabilidad y función celular. Debido a que las células eucariontes son incapaces de sintetizar el folato, requieren de sistemas de transporte y dieta adecuada para tener un aporte adecuado de los folatos.

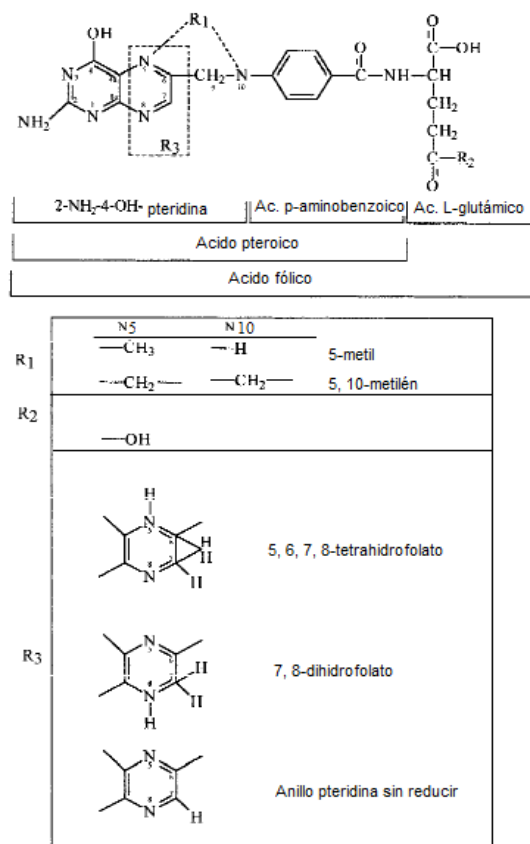


Fig. 11. Estructura del ácido fólico y algunos de sus derivados. Traducido y modificado de la Ref. [Van der Put N.M.J, et al, 2001].

Muchos de los procesos que son vitales para las células, requieren del metabolismo de transferencia de un carbono dependiente de los folatos, el cual se ilustra brevemente en la figura 1 asociado a otras vías metabólicas. Como ya se ha mencionado previamente, los folatos actúan como donadores y aceptores de grupos funcionales de un solo carbono (como el metilo) en las reacciones enzimáticas en dicho metabolismo de transferencia de grupos con un carbono; las unidades de un carbono proceden principalmente del carbono en posición β de la serina, aunque también se ha observado que a partir de la glicina, metil y dimetilglicina, histidina, entre otros [Pasternack L.B, et al, 1996]. Dentro de los procesos en los que están involucrados los folatos están los siguientes:

- Biosíntesis de timidina. La reacción para formar el desoxitimidilato (dTMP) es catalizada por la timidilato sintetasa, la cual adiciona un grupo metilo en la posición 5 del desoxiuridilato (dUMP), en donde el grupo funcional de un carbono es obtenido del 5, 10-metilentetrahidrofolato, como se muestra en la figura 12.
- Biosíntesis de purinas (adenina y guanina). El compuesto 10-formiltetrahidrofolato es el donador del grupo formilo para la síntesis de novo de las purinas, en este caso, para formar el carbono 2 y 8 de los anillos que conforman a las purinas.
- Transferencia de grupos metilo. Dentro de estas reacciones se considera que tiene un papel primordial la enzima MTHFR, ya que dirige los grupos metilo que se obtuvieron a partir de la serina, histidina y glicina a las reacciones de metilación, las cuales son catalizadas por las metiltransferasas, que como que mencionó anteriormente tienen un papel indispensable en las funciones de la célula.

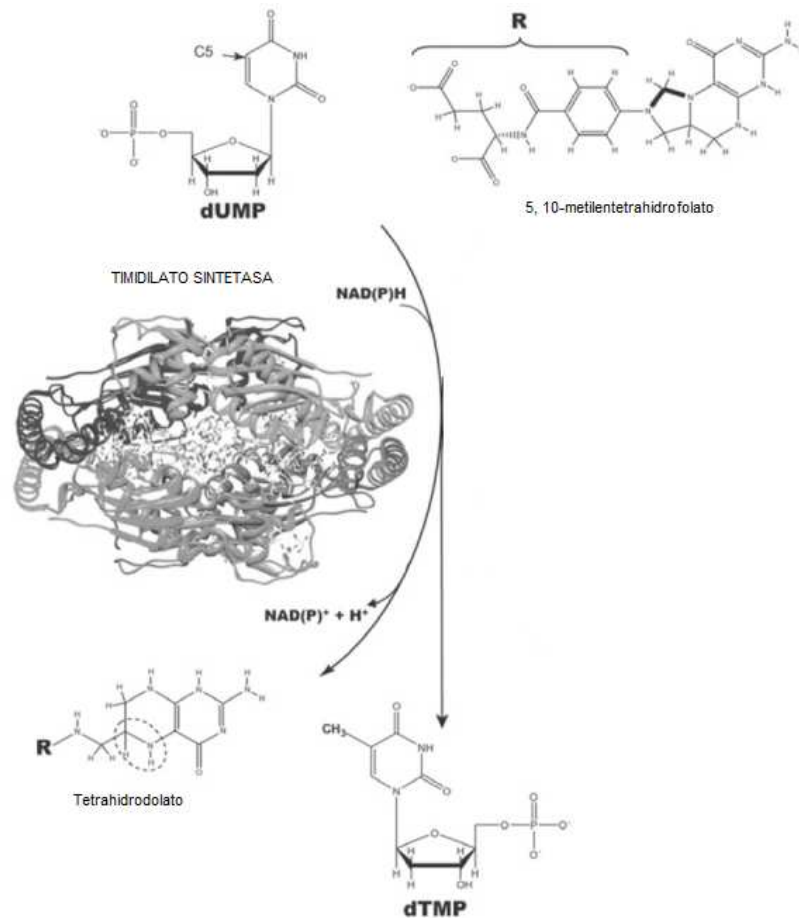


Figura 12. Síntesis del timidilato monofosfato (dTMP). Modificado de www.landesbioscience.com/curie.

Transporte y absorción.

Como se mencionó anteriormente, el consumo de poliglutamatos a partir de fuentes naturales, requiere de una conversión enzimática a monoglutamatos para poder ser absorbidos [Rosenberg I.H, 1986]. La enzima que lleva a cabo esta conversión es la conjugasa (o γ -glutamihidrolasa) y lleva a cabo dicha conversión en el yeyuno con un pH óptimo de 6.5. El 5-metiltetrahidrofolato en forma de monoglutamato, es la principal forma de los folatos que se encuentra en circulación, siendo a su vez, la forma trascendental con la que son suministradas las células del organismo puesto que es transportado a través de las membranas celulares, donde se incluye el transporte a través de la placenta, de la barrera hematoencefálica, de las células tubulares renales, etcétera [Shane B, et al, 1983].

Se han descrito principalmente tres tipos de transporte para los folatos, los cuales son específicos para algunos tipos de células, dependiendo de la eficiencia del acarreador y receptor, así como de la concentración dentro y fuera de la célula. A continuación se describen brevemente dichos mecanismos de transporte:

- Transporte activo mediante un acarreador. Este proceso se lleva a cabo por una proteína integral de membrana denominada acarreador de folatos reducidos (RFC1), el cual se descubrió debido a que es el principal responsable del paso de este nutriente en células tumorales, sin embargo también se encuentra presente en células normales de todos los tejidos[Matherly L.H, et al, 2003]. Esta proteína tiene una alta afinidad por el 5-metiltetrahydrofolato y baja por los folatos no reducidos. Se ha establecido que las hélices tipo α de la región transmembranal de este acarreador forman un canal a través del cual pasa el folato. El mecanismo de transporte es mediante un intercambio aniónico hacia el exterior. Se ha establecido que la inactivación del RFC1 conlleva a un efecto letal en el embrión [Zhao R, et al, 2001].
- Transporte endocítico mediado por un receptor. Los receptores de folato tienen una gran afinidad por los folatos no reducidos y una menor afinidad por los reducidos (como el 5-metiltetrahydrofolato). Este receptor se expresa tanto en células epiteliales (tipo α) [Kamen B.A, et al, 2004] como en células de origen hematopoyético (tipo β) [Salazar M.D, et al, 2007]. El folato se une a dichos receptores cuando se encuentra a un nivel fisiológico normal, y el receptor tiene una gran afinidad y aumento en la expresión del gen que lo codifica cuando el folato se encuentra a concentraciones bajas. Los receptores de folato son indispensables en la asimilación, distribución y retención de los folatos provenientes de la dieta [Secretaría de Salud, 2003]. La inactivación del receptor tipo α en embrión es letal, mientras que deleciones en el gen que codifica para el receptor tipo β no está asociado a cambios fenotípicos, sin embargo, ambos tipos de receptores se encuentran expresados en la placenta, donde se asegura un flujo unidireccional de folatos. Como su nombre lo

dice, el mecanismo por el cual se asimilan los folatos en este transporte es por endocitosis mediado por una vesícula (Fig. 13). Se ha establecido que existen dos formas de este receptor, de las cuales la forma soluble se ha asociado a un mecanismo para almacenar los folatos principalmente, y la forma que se encuentra en la membrana es la implicada directamente con dicho transporte a las células.

- Recientemente se ha identificado un tercer tipo de transportador, el cual se denominó transportador de folatos ligado a simporte de protones (PCFT), siendo un tipo de transporte facilitado [Zhao R, et al, 2007]. Este tipo de transportador se requiere para la absorción intestinal y el transporte de folatos a través de la barrera cerebroespinal. Este tipo de transporte se lleva a cabo a niveles de pH menores al fisiológico en muchos tejidos normales y tumores sólidos. Se ha establecido que este receptor tiene una relación con el transporte de folato llevado a cabo por el receptor de folato, en la cual el PCFT tiene una función intermediaria en la que los folatos son exportados de los endosomas acidificados al citoplasma [Wollack J.B, et al, 2008] (Fig. 13).

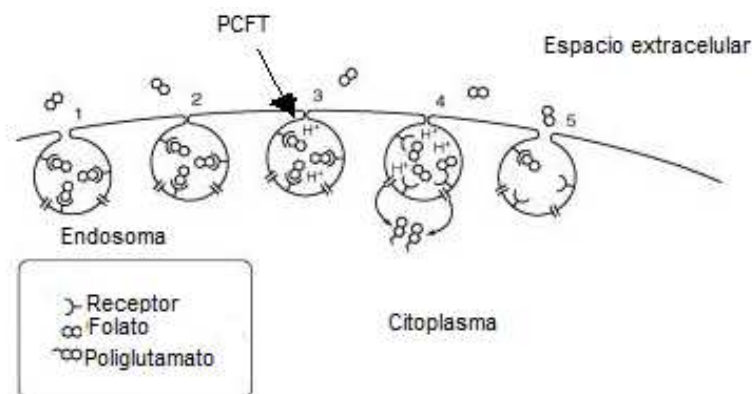


Figura 13. Transporte endocítico mediado por el Receptor de Folatos y la participación del PCFT. Modificado de Hoffman R, et al. Hematology: Basic Principles and Practice 5th ed. Churchill Livingstone (2008) de www.mdconsult.com.pbidi.unam.mx.

Poliglutamatos y poliglutamización.

A pesar de que los monoglutamatos son la única forma circulante de folatos en el plasma y la única que es transportada a través de la membrana celular, una vez que son introducidos a las células, la forma prioritaria intracelular de folatos es en forma de poliglutamatos, ya que son mejor retenidos en las células y son

mejores sustratos para las enzimas que participan en el ciclo de los folatos que los monoglutamatos [Moran R.G, 1999]. La enzima folipoliglutamil sintetasa cataliza la conversión de monoglutamatos a poliglutamatos dentro de las células, donde la cadena glutamil formada en la posición γ es resistente a la hidrólisis por enzimas proteolíticas [Shane B, 1995].

Normalmente se posee de 5 a 20 mg folatos en depósitos corporales, de los cuales, la mitad se encuentran en el hígado en forma de poliglutamato del 5-metiltetrahidrofolato, siendo su lugar principal de almacenamiento, mientras que se elimina por la orina y las heces fecales [Secretaría de Salud, 2003].

Adaptación a la deficiencia de folatos.

Cuando existe una deficiencia de folatos, hay una serie de mecanismos a través de los cuales el cuerpo intenta adaptarse, que generalmente están asociados a un aumento en la ingesta de folatos, en su retención intracelular, la modificación en el metabolismo dependiente de folatos y el flujo activo de los mismos [Ifergan I, et al, 2008]. Dentro de los mecanismos específicos, los cuales dependen de la cantidad de folatos presentes en el cuerpo, se encuentran los siguientes:

- a) La regulación positiva o negativa de algunas de las enzimas dependientes de folatos como la dihidrofolato reductasa y la timidilato sintetasa.
- b) La retención celular de los folatos a través de la poliglutamatización.
- c) La sobreexpresión de los 3 tipos de transportadores de folato mencionados anteriormente.

Nutrición.

Debido a que el organismo es incapaz de sintetizar los folatos, es indispensable consumir alimentos ricos en esta vitamina. Sin embargo, es importante considerar que algunas legumbres poseen inhibidores de la conjugasa, además que los folatos son inactivados por calor durante la cocción

y por la exposición prolongada a la luz UV durante su almacenamiento [Secretaría de Salud, 2003]. La excreción de esta vitamina se hace en promedio de 40 y 400 µg diarios por la orina y heces respectivamente. La Secretaría de Salud considera un indicativo de una deficiencia en folatos cuando los niveles intraeritrocitarios son menores a 160 ng/mL, así como los menores a 3 mg/mL en suero. Como ya se mencionó anteriormente, esta deficiencia en folatos se ve reflejada en la síntesis de DNA y las reacciones de metilación.

Dentro de las fuentes principales de folatos se encuentran los vegetales de hojas verdes, el hígado, frutas y jugos cítricos, pan de trigo integral y levadura de cerveza, sin embargo, es importante mencionar que el contenido de folatos varía de acuerdo a cada alimento. En una publicación de la Secretaría de Salud del 2003, se estableció que de los alimentos consumidos en México, las fuentes principales de ácido fólico fueron los reportados en la Tabla 4.

Tabla 4.
Alimentos consumidos en México y su cantidad de ácido fólico. Obtenido de la Ref. [Secretaría de Salud, 2003].

Alimento (100 g)	Acido fólico (µg)
Hígado de pollo	738.0
Hígado de res	248.0
Hígado de carnero	220.0
Berros	200.0
Perejil	183.0
Yema de huevo	152.0
Cacahuate	145.0
Lechuga	136.0
Espinaca	140.0
Almendras	96.0
Acelga	90.0
Quelite	85.0
Brócoli	71.0
Coliflor	67.0
Chícharo	65.0
Aguacate	62.0
Pan integral (trigo)	39.0
Plátano	22.0

En México, debido a la alta incidencia de malformaciones congénitas y a la asociación de éstas con una dieta deficiente en folatos (además de la alta frecuencia de la variable *C677T* del gen *MTHFR*), se han establecido en la Norma Oficial Mexicana “NOM-034-SSA2-2002, Para la prevención y control de los defectos al nacimiento” los siguientes puntos:

6.13.3. “A toda mujer en edad reproductiva se le recomendará una ingesta diaria de ácido fólico de 400 microgramos/día o 0.4 miligramos, especialmente durante la etapa periconcepcional (tres meses previos al embarazo y hasta la semana 12 de la gestación).”

6.13.4. “En las mujeres en las que, por antecedentes o condición social o geográfica, se identifique riesgo alto para defectos del tubo neural deberán ingerir ácido fólico (4 miligramos/día los tres meses previos al embarazo y las primeras 12 semanas del desarrollo fetal).”

Las razones para seguir las normas anteriores, además de los defectos al nacimiento, se mencionarán mas adelante en la sección de patologías asociadas, en la que se refuerza la importancia de una dieta adecuada en folatos con una aplicación más clínica.

Existen algunos factores que pueden alterar el transporte de folatos, como son el uso crónico de etanol, algunos padecimientos hereditarios, entre otros. Se ha establecido que la ingesta crónica de etanol es el factor que mayor contribuye a la deficiencia de folatos, lo cual puede ser provocado por una mala absorción intestinal, la alteración del metabolismo hepatobiliar, una excreción renal aumentada y un metabolismo del colon incrementado [Hamid A, et al, 2009]. El mecanismo mediante el cual el etanol reduce la absorción intestinal y renal de los folatos, es principalmente por la alteración de la unión y la eficiencia de los sistemas de transporte; además, se ha establecido que el etanol reduce la expresión de los transportadores de folato. Esto tiene una gran importancia debido a que el etanol es una toxina que se consume regularmente sobretodo por individuos en edad reproductiva y a los efectos severos que puede conllevar una deficiencia en folatos, donde se incluye un aumento en el riesgo de cáncer y defectos al nacimiento. Además es importante señalar que se ha demostrado en algunos estudios que el consumo de etanol aumenta los niveles de homocisteína en sangre, debido a una disminución de los folatos disponibles [Sachdev P.M, 2005].

Folatos y su relación con la variante C677T del gen MTHFR.

Se ha determinado que la concentración de folatos en eritrocitos varía también de acuerdo al genotipo respecto a la variante C677T del gen MTHFR, mencionando que los homocigotos para la variante T hay una acumulación de tetrahydrofolatos no reducidos, mientras que en los homocigotos para la variante CC es predominante la especie 5-metiltetrahydrofolato [Bagley P.J, et al, 1998]; por lo que se ha establecido que la variante termolábil de la MTHFR está ligada a la disminución de folatos disponibles para las reacciones de metilación, que a su vez, favorece la síntesis purinas y pirimidinas, entre otros acontecimientos tal como ya se ha mencionado [Ueland P.M, et al, 2001] (Fig. 14).

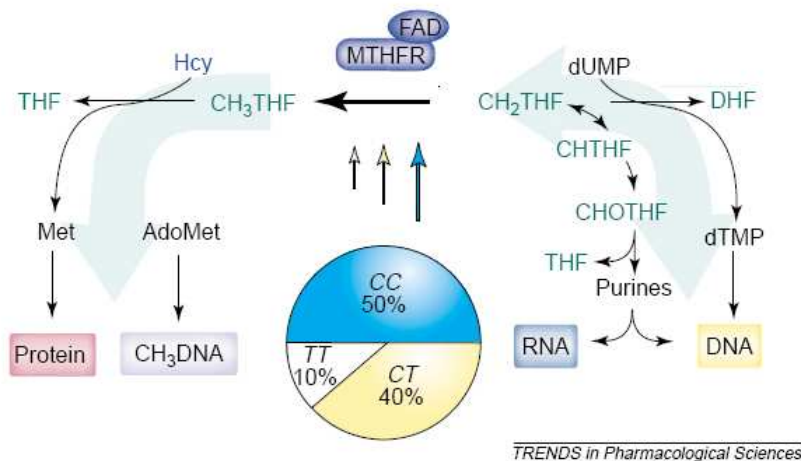


Fig. 14. Efecto del genotipo de MTHFR en la distribución de las especies de folato. El gráfico de pastel indica la prevalencia en caucásicos y las flechas el efecto sobre las reacciones de metilación para cada genotipo. AdoMet, S-adenosilmetionina; CHOTHF, formiltetrahydrofolato; CHTHF, meteniltetrahydrofolato; CH2THF, 5, 10-metilentetrahydrofolato; CH3DNA, DNA metilado; CH3THF, 5-metiltetrahydrofolato; DHF, dihydrofolato; dTMP, desoxitimidina 5'-monofosfato; dUMP, desoxiuridina 5'-monofosfato; FAD, dinucleótido de Flavina y adenina; Hcy, homocisteína; Met, metionina; THF, tetrahydrofolato; Protein, proteína; Purines, purinas. Modificado de la Ref. [Ueland P.M, et al, 2000].

Mecanismo molecular de la MTHFR y la participación del ácido fólico.

Tal como se estableció previamente, la enzima MTHFR cataliza la reducción del 5, 10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, como se observa en la figura 11B. También se señaló que el cofactor FAD se une de manera no covalente con dicha enzima para aceptar los equivalentes provenientes del NADPH y se los transfiere al sustrato. Cabe destacar, que esta reacción es la única ruta para sintetizar el 5-metiltetrahidrofolato, el cual, como ya se ha mencionado, es utilizado por la metionina sintetasa para convertir la homocisteína en metionina [Guenther B.D, et al, 1999] (Fig. 15). La fuente principal del grupo metileno del 5, 10-metilentetrahidrofolato es el carbono que se encuentra en la posición β de la serina, el cual es transferido al tetrahidrofolato por la enzima hidroximetiltransferasa (Fig. 15A).

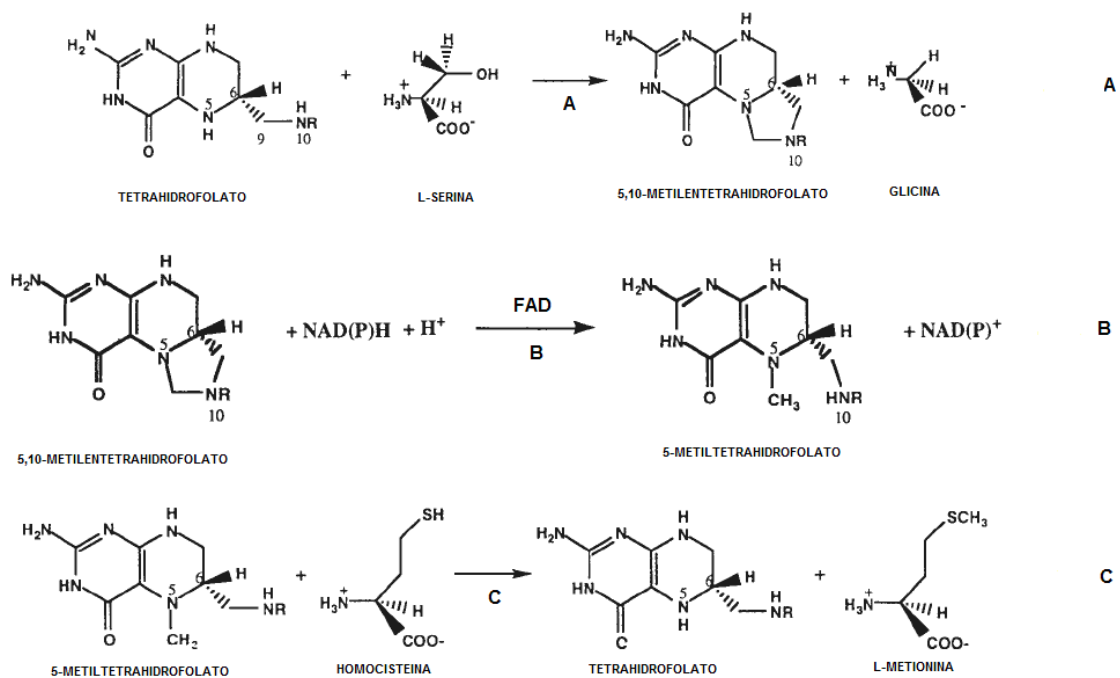


Fig. 15. Reacciones involucradas en el metabolismo de los folatos y la homocisteína: 15A- Formación del 5, 10-metilentetrahidrofolato. 15B- formación del 5-metiltetrahidrofolato. 15C- formación de la metionina a partir de la homocisteína. A: hidroximetiltransferasa, B: MTHFR, C: Metionina sintetasa. Modificado de la Ref. [Matthews R.G, 2002].

Se han establecido diversos mecanismos a través de los cuales ocurre la reducción del 5, 10-metilentetrahidrofolato, sin embargo para este trabajo se considerará el mecanismo de reacción considerado en mamíferos, en el cual el cofactor FAD alternativamente es reducido por el NADPH para posteriormente

ser oxidado por el 5, 10-metilentetrahidrofolato [Matthews R.G, 2002; Summer, J.S, et al, 1992](Fig. 16). Una vez que se llevó a cabo la reducción del cofactor, ocurre una protonación (catalizada por un ácido) del Nitrógeno en la posición 10, que a su vez conlleva a la apertura del anillo de imidazolidina para formar el catión 5-iminio; posteriormente este catión es reducido por la transferencia de un hidrógeno proveniente del Nitrógeno en la posición 5 del cofactor FAD reducido para formar finalmente el 5-metiltetrahidrofolato (Fig. 16B).

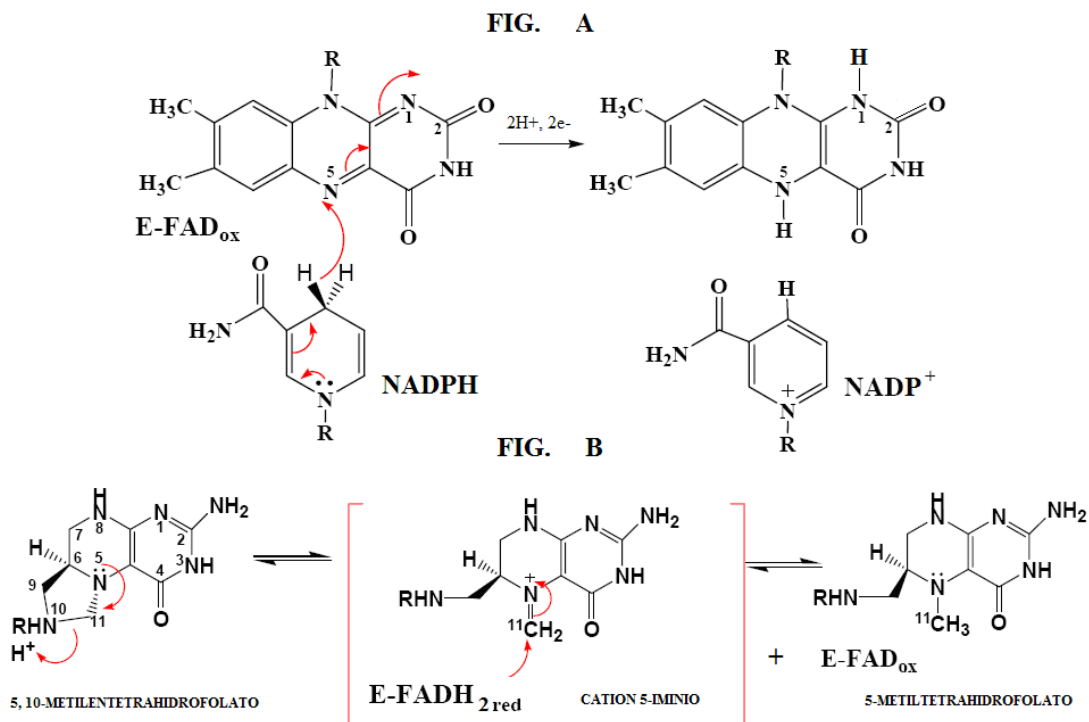


Fig. 16. Mecanismo de reacción planteado para la reducción del 5,10-metilentetrahidrofolato catalizada por la MTHFR. 16A- reducción de FAD. 16B- obtención de 5-metiltetrahidrofolato por la oxidación de FAD. Modificado de la Ref. [Summer J.S, et al, 1992].

La MTHFR humana y de otros eucariontes son homodímeros compuestos de subunidades de 70 a 77 kDa, la cual ha sido estudiada principalmente a partir de hígado de cerdo [Matthews R.G, et al]. Las determinantes para la unión a FAD, NADPH y 5,10-metilentetrahidrofolato están localizadas en el extremo amino, mientras que el dominio localizado en el extremo carboxilo se encarga de regular la actividad de esta enzima dependiendo de la demanda de S-adenosil-metionina, además de contener un sitio de unión para este inhibidor alostérico (que se une de manera reversible y no covalente para modificar la estructura tridimensional del sitio activo), el cual ha sido destacado por estar presente únicamente en eucariontes [Guenther B.D, et al, 1999]. Estos estudios

indicaron que cada sustrato reacciona en el lado *si* del FAD (respecto a la nomenclatura de diastereoisómeros) y que sigue una cinética denominada “Bi-Bi ping-pong”, en la cual una vez que se lleva a cabo la primera reacción y se libera el primer sustrato se une el segundo sustrato (uno precede a la unión del otro), lo cual también concuerda con el modelo en *Escherichia coli*, en el que el lado *re* del FAD está completamente obstruido y el lado *si* está expuesto [Matthews R.G, et al]. A pesar de lo anterior, la caracterización de la MTHFR en mamíferos (incluyendo la humana), ha sido muy difícil debido a los niveles muy bajos de expresión en sus tejidos, además, algunos estudios que utilizaron la enzima humana recombinante en bacterias también observaron una baja expresión y que por lo tanto no se obtenía la suficiente cantidad de enzima para su caracterización bioquímica. Sin embargo, basándose en que los dominios catalíticos de esta enzima, en humanos, del extremo amino tienen un 30% de identidad con las secuencias de *Escherichia coli*, se estableció que los dominios catalíticos poseen estructuras similares, con la diferencia que éstas como otros procariontes son mas pequeñas ya que contienen alrededor de 300 aminoácidos (Fig. 17). Inclusive, la variante que conlleva al cambio de la alanina por una valina en la posición 222 se ha imitado con la construcción de una mutación que provoca los mismos cambios en la MTHFR de *Escherichia coli* [Guenther B.D, et al, 1999].

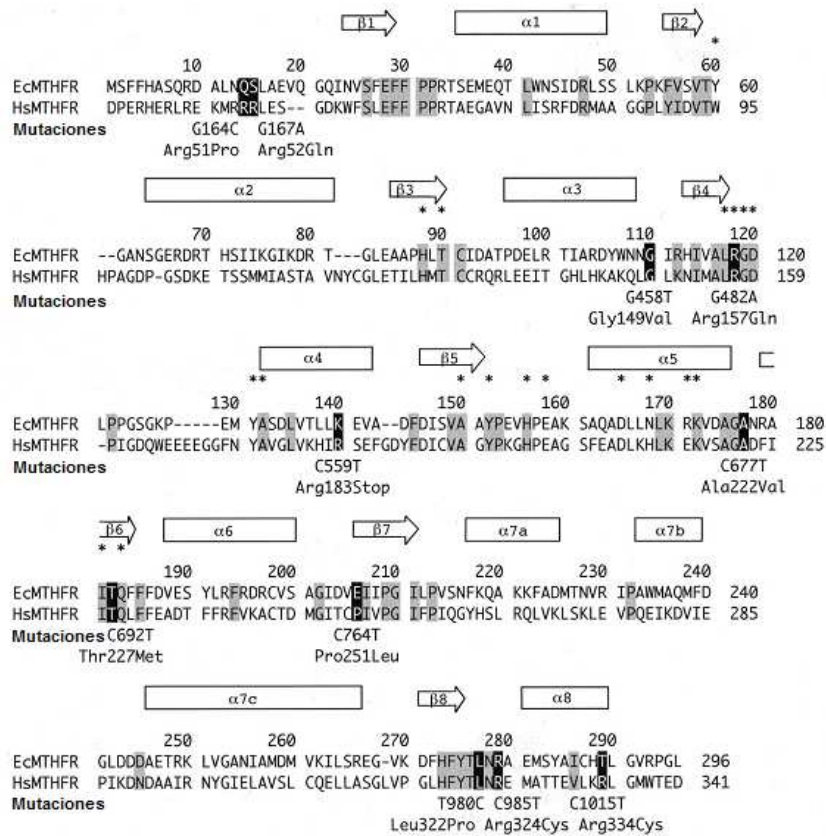


Fig. 17. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la enzima MTHFR de *Escherichia coli* y la humana, basado en el alineamiento simultáneo de 12 secuencias de la MTHFR de *E. coli* y las posiciones de las estructuras secundarias de la enzima. Las hélices y cadenas β están representadas por rectángulos y flechas respectivamente, mientras que los residuos que interaccionan con FAD están marcados con asteriscos. También se pueden observar las variantes que corresponden a la secuencia de DNA del humano con su respectivo cambio de aminoácido determinadas hasta 1999, dentro de las que se encuentra la variante C677T. Traducido de la Ref. [Guenther B.D, et al, 1999].

Debido a que, como se mencionó previamente, existe una relación entre la deficiente actividad de la MTHFR termolábil con la pérdida de su cofactor FAD, un estudio determinó que los niveles elevados de homocisteína total en plasma, se debieron a un genotipo homocigoto para la variante T para el gen *MTHFR* y una deficiencia en FAD, lo cual permite demostrar la importancia de este cofactor [McNully H, et al, 2002]. Debido a que de aquí en adelante se hará referencia a la estructura del FAD, se presenta su estructura en la figura 18.

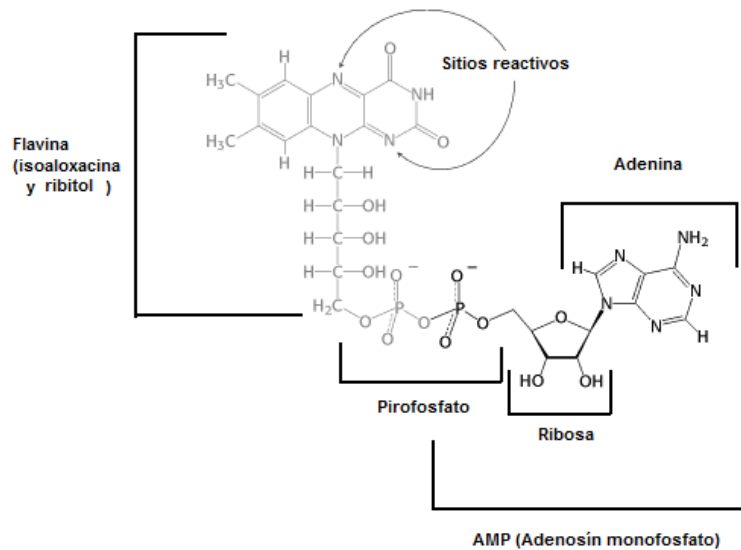


Fig. 18. Estructura del FAD. Mod. de Berg J.MI. Biochemistry, Fifth edition. W. H. and Company (2002) E.U.A.

Se ha establecido mediante muchos estudios que la MTHFR tiene una estructura de barril con 8 hélices α y 8 cadenas β (figura 19); de aquí en adelante las hélices y cadenas se designarán como tal, sin las letras griegas. Tal como en otras enzimas con esta estructura, el cofactor se une al extremo carboxilo de las cadenas β . El anillo de flavina se encuentra dentro del barril, su forma plana está paralela al piso del barril y su lado o cara *si* está expuesta. La parte del ribitol y los grupos fosfato está insertada entre las cadenas 4 y 5 del barril, la ribosa está sobrepuesta en la hélice 5 y la adenina se extiende a través del costado del barril; cabe mencionar que la ubicación del ribitol es característico de esta riboflavina al comparar con otras riboflavinas con la misma forma. Visto desde una perspectiva lateral, se puede apreciar que la cadena 8 y la hélice 8 están mas cortas a comparación del resto que componen el barril (Fig. 19B), lo cual abre un surco que va desde la parte externa de la enzima hasta la cara *si* de la flavina. Los sustratos, folato y el nucleótido de piridina (que en esta bacteria es NADH), se ha establecido que se unen al anillo de la pteridina que se encuentra de forma disponible para facilitar la transferencia de hidrógenos, y dicha transferencia se ha establecido que ocurre en la cara *si* del anillo de flavina. También se ha sugerido que el grupo p-aminobenzoil glutamato del metilentetrahidrofolato entra en el surco formado por la enzima, siendo una importante estructura para poder llevar a cabo esta reacción [Guenther B.D, et al, 1999].

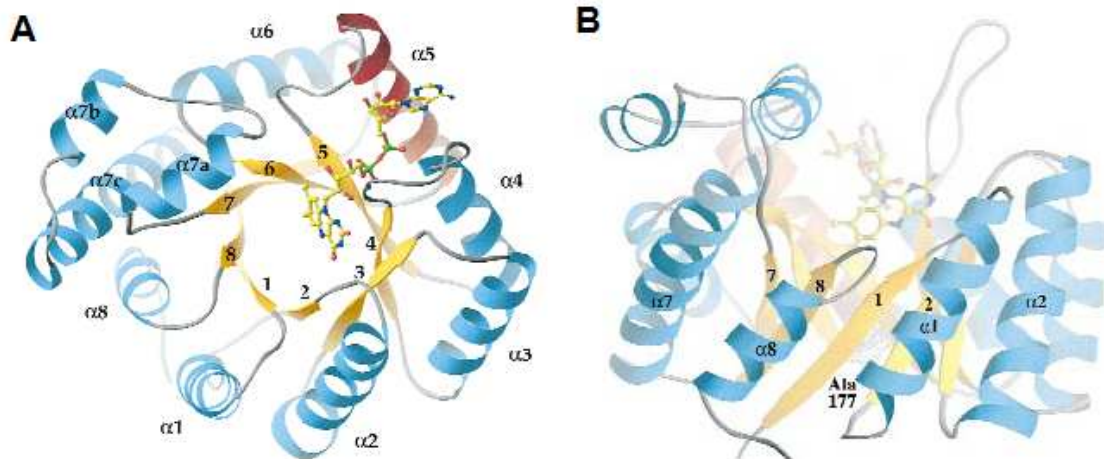


Fig. 19. Estructura de la MTHFR de *E. coli*. A – vista a lo largo del eje del barril hacia el extremo carboxilo de las cadenas β , la hélice 5 que precede al cambio de alanina por valina está en rojo. B - vista perpendicular del eje del barril hacia la cara o lado *si* del anillo de flavina, mostrando el truncamiento de la cadena 8 y hélice 8 y el surco formado, también se muestra donde se localiza el cambio A177V. Obtenido de la Ref. [Guenther B.D, et al, 1999].

La densidad electrónica que corresponde al anillo de la flavina y al entorno que provee la enzima se puede visualizar en la figura 20A, mientras que las interacciones entre FAD y algunos aminoácidos conservados en el sitio de unión se muestran en la figura 20B. Los residuos que se unen a FAD se encuentran al final de las cadenas 3, 4 y 5 y a lo largo de la hélice 5 (Fig. 19B). La estructura de FAD es forzada a entrar por un bucle que provoca que el pirofosfato se entierre, lo que provoca a su vez que los grupos ribosa y ribitol estén en contacto formando interacciones de van der Waals. En el sitio de unión a FAD, destaca también la forma de las cadenas laterales que rodean los grupos ribitol y fosfatos formando una especie de cinturón que es asegurado por la interacción de la arginina en la posición 118 y el glutamato en la posición 158 (Fig. 20B), lo cual se ha establecido que tiene una importante participación en el aspecto cinético y termodinámico de la unión de FAD. Otra región importante es un conector de la cadena 5 con la hélice 5, el cual incluye al glutamato en la posición 158 mencionado anteriormente, que encierra los segmentos correspondientes a los grupos ribitol, difosfato y ribosa de FAD, por lo que se ha establecido que rearrreglos en esta región de la proteína deben de ocurrir para permitir salir y entrar a FAD del sitio de unión [Guenther B.D, et al, 1999].

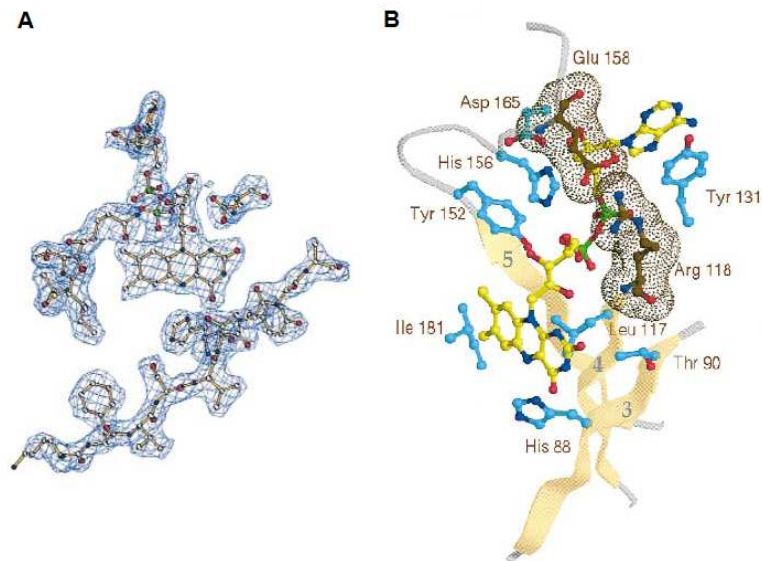


Fig. 20. El sitio de unión a FAD. A – densidad electrónica determinada en la cercanía del cofactor. Los aminoácidos alrededor de la cara *si* expuesta son His 88, Asp 120, Thr 182 y Gln 183; la cadena β 2 se encuentra en el primer plano. B – Dibujo mostrando algunos de los residuos conservados que tienen en contacto con FAD, el cual está dibujado en el modelo de bolas y barras con los átomos coloreados; los carbonos de las cadenas laterales están en color azul claro con el oxígeno y el nitrógeno de color rojo y azul fuerte respectivamente. Los residuos que conforman el cinturón (Arg 118 y Glu 158) están en color mas oscuro. Obtenido de la Ref. [Guenther B.D, et al, 1999].

Como ya se mencionó, la variante que conlleva al cambio A222V en la MTHFR humana fue reproducida en la enzima de *Escherichia coli* al introducir una mutación homóloga que conlleva al cambio A177V. Cuando se compararon las propiedades catalíticas de la enzima silvestre y la que tiene la mutación A177V no se encontraron diferencias entre la K_{cat} o la K_m ni para el metilentetrahidrofolato ni para el NADH. La variante que conlleva al cambio A222V en la enzima humana es más termolábil que la enzima silvestre, lo cual ocurre también con la enzima recombinante humana expresada en *E. coli*. Cuando se probó su comportamiento de la enzima mutada y silvestre de esta enterobacteria, se pudo observar que su desnaturalización era cada vez a menores temperaturas cuando se disminuía la concentración de las mismas, siendo una temperatura menor de desnaturalización de la enzima mutada. Se utilizó la técnica de filtración en gel para demostrar que la MTHFR de esta enterobacteria es un tetrámero que se disocia en dímeros cuando se diluye, lo cual conlleva a la pérdida de FAD. El valor inicial (medido en velocidad) de pérdida de FAD de la enzima mutante fue 11 veces mayor que el observado que en la silvestre al hacer diluciones, así como se observó que la concentración de la enzima mutada a la cual está unido el 50% de FAD fue de

5.9 μM y 1.3 μM para la silvestre, lo que sugiere que la mutación que conlleva al cambio de A177V disminuye la afinidad de la proteína por FAD. Por lo tanto, esta mutación se estableció que afecta el equilibrio entre los tetrámeros y dímeros, favoreciendo la formación de los dímeros [Guenther B.D, et al, 1999]. Debido al papel esencial de FAD para la actividad de esta enzima, esta mutación conlleva a que haya una disminución en la misma, disminuyendo hasta diez veces comparando con la silvestre.

En este trabajo, basándose en los reportes asociados a la protección del ácido fólico para la prevención en los defectos de tubo neural y otros padecimientos asociados a la deficiencia de la MTHFR, examinaron el efecto que se producía al adicionar folatos. Con esto, observaron que al agregar metiltetrahidrofolato se reducía la pérdida de FAD tanto en la enzima silvestre como en la mutada, que disminuía proporcionalmente al aumentar la concentración de este folato, aunque la enzima mutada requirió niveles mucho mas altos para poder conseguir este efecto y llegar a los valores parecidos a los que se obtuvieron con la enzima silvestre. Sin embargo, corroborando lo anteriormente mencionado, se percataron de que los derivados con triglutamato eran mas efectivos que aquellos con monoglutamato, demostrando así un mayor efecto protector por parte de aquellos derivados con poliglutamatos. La adición de metiltetrahidrofolato a los extractos de las enzimas promovió la protección en contra de la inactivación por calor, aunque sobresalió la protección de la enzima mutada; *in vivo* se obtiene un resultado parecido, ya que los derivados de los folatos son capaces de estabilizar la enzima [Guenther B.D, et al, 1999]. En aquellos individuos homocigotos para la variante C677T del gen MTHFR, la pérdida de FAD es disminuida en aquellos individuos en los que se aumenta el consumo de folatos, así como también disminuyen los niveles de homocisteína en plasma.

La mutación que provoca el cambio de A177V afecta la unión de FAD pero este residuo que cambia no forma parte del sitio de unión a este cofactor, además, de que la alanina en la posición 177 se encuentra cerca del fondo del barril, fuera de contacto directo de la flavina con los residuos conservados que son esenciales para la actividad o para la unión de los folatos (Figs. 19B, 21). Este

residuo se localiza en el asa que conecta la hélice 5 con la cadena 6, que encierra átomos de la lisina en la posición 172 justo antes del giro que da la hélice 5, así como también residuos conservados como la valina de la posición 136 de la hélice 4 y la valina 149 en la cadena 5; por lo que se estableció que esta mutación puede perturbar estas interacciones y afectar la estructura secundaria que es conformada por los residuos vecinos. Se estableció que estos cambios se pueden propagar hasta los sitios de unión a FAD por la perturbación de la hélice 5, la cual contiene residuos como lisina, aspartato y asparagina que interactúan con los grupos fosfato y ribosil. Este cambio también se asocia a alteraciones en la forma tetramérica [Guenther B.D, et al, 1999].

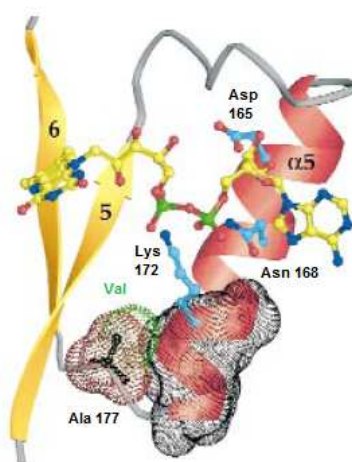


Fig. 21. Cambio A177V. La localización y el entorno de la Ala 177 que corresponde al sitio donde se lleva a cabo el cambio A222V de la MTHFR humana. La vista es perpendicular al eje del barril y está orientada para mostrar la hélice 5 y las cadenas vecinas. La porción con la sombra abarca los residuos 171 a 176, las nubes rojas representan el volumen ocupar por la Ala 177, mientras que la verde representa a la Val 177 que se traslapa con la hélice 5. Los demás residuos señalados son aquellos que interactúan con FAD. La posición 177 se encuentra cerca del extremo amino de la cadena 6. Obtenido de la Ref. [Guenther B.D, et al, 1999].

En un estudio más reciente [Pejchal R, et al, 2006], para estudiar los efectos del cambio A222V de la MTHFR humana, también utilizaron el modelo en *Escherichia coli*, retomando la importancia de que este cambio de aminoácido que reside entre la hélice 5 y la cadena 6 puede tener un efecto estérico en el que la valina se superpone con la hélice 5 desplazándola, y a su vez, modificando los sitios de unión a FAD (Fig. 21). Sin embargo, en este estudio se utilizó un análogo del 5-metiltetrahidrofolato con dos grupos azo (N=N) en las posiciones 5 y 10 y con el anillo *p*-aminobenzoilo sustituido por un tiofeno (en forma de monoglutamato), denominado LY309887, el cual ocupa los

mismos sitios de unión que su análogo [Pejchal R, et al, 2006]. Primero determinaron la estructura secundaria del monómero con la presencia de FAD y LY309887 (Fig. 22), la cual se compara en esta figura con la obtenida del estudio anterior para visualizar el sitio de unión del derivado del folato.

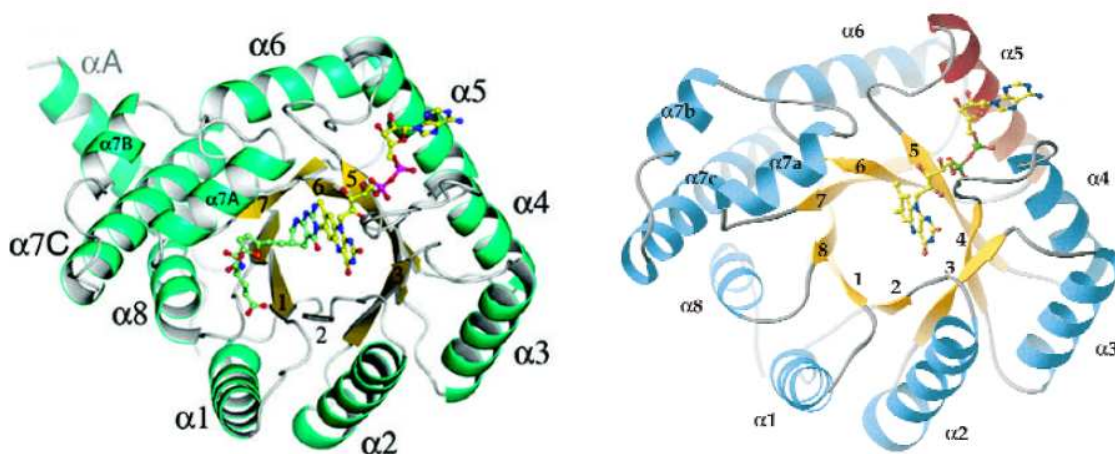


Fig. 22. Comparación del monómero unido con FAD y LY309887 en modelos de barras y bolas (lado izquierdo) con el modelo del mismo monómero solo con FAD. La superficie formada por la cadena 8 y el asa que une a esta misma cadena con la hélice 8 es en donde se acomoda el análogo del folato, cerca de la hélice marcada como 7A. Modificado de las Ref. [Guenther B.D, et al, 1999; Pejchal R, et al, 2006].

En este estudio, para examinar las alteraciones estructurales resultantes de la mutación, se analizaron las estructuras de esta enzima con la variante A177V con y sin el análogo del folato, comparando con las estructuras de la enzima silvestre y los complejos resultantes con el metiltetrahidrofolato o con NADH, y estableciendo las diferencias en las posiciones atómicas. Respecto a lo anterior, se encontraron principalmente alteraciones estructurales en donde el cambio A177V repercute sobretodo en los residuos del 165 al 180. Reforzando lo anteriormente mencionado, se encontraron diferencias significativas atribuidas al cambio de alanina por valina en la hélice 5 y la región que conecta dicha hélice con la cadena 6, comparando con la enzima silvestre; en esta región se encontró que la cadena lateral de la asparagina en la posición 168 de la hélice 5 adopta una nueva conformación, además de que algunos segmentos y sobretodo el extremo carboxilo de la hélice 6 están modificados. En cuanto a los cambios observados en el conector o asa de la hélice 5 y la cadena 6 provocados por un efecto estérico (Fig. 23), se destacó que la introducción de la valina en la posición 177 conlleva a un traslape de la cadena

lateral de este aminoácido con los oxígenos de los residuos en la posición 172 y 179, así como con el carbono α del residuo en la posición 173, que están en una posición inferior debido a la extensión del asa y el desplazamiento de la hélice 5, lo cual se puede apreciar mejor con el cambio de ángulo de la lisina que es el residuo de la posición 172 (Fig. 23B). A pesar del desplazamiento de la hélice, el grupo amino de la lisina mantiene su interacción con FAD (Fig. 23C), sin embargo, las interacciones y conformaciones de la cadena lateral de la asparagina en la posición 168 están completamente alteradas. Este rearrreglo de la asparagina tiene como consecuencia el rompimiento de un puente de hidrógeno con el oxígeno de la adenina fosfato (de FAD) y genera uno nuevo con el oxígeno en la posición 2' de la adenina ribosa, así como también incrementa la movilidad de la arginina en la posición 171 que se acompaña por la exposición al medio (solución o solvente) de la adenina fosfato. Por su parte, la arginina en la posición 171 se mueve hacia el medio en respuesta al desplazamiento de la asparagina, lo que provoca a su vez que el anillo de la adenina no esté contraído por el contacto con el carbono en la posición 8 de la asparagina; el desplazamiento de la arginina en la posición 171 también provoca una ruptura con el nitrógeno en la posición 7 de la adenina. Todos estos cambios conllevan a un cambio en las interacciones de FAD con esta enzima sumado a la exposición al medio de la adenina fosfato y el nitrógeno en la posición 7 de la adenina, provocan que la unión de FAD con la enzima mutante sea más débil que con la enzima silvestre [Pejchal R, et al, 2006].

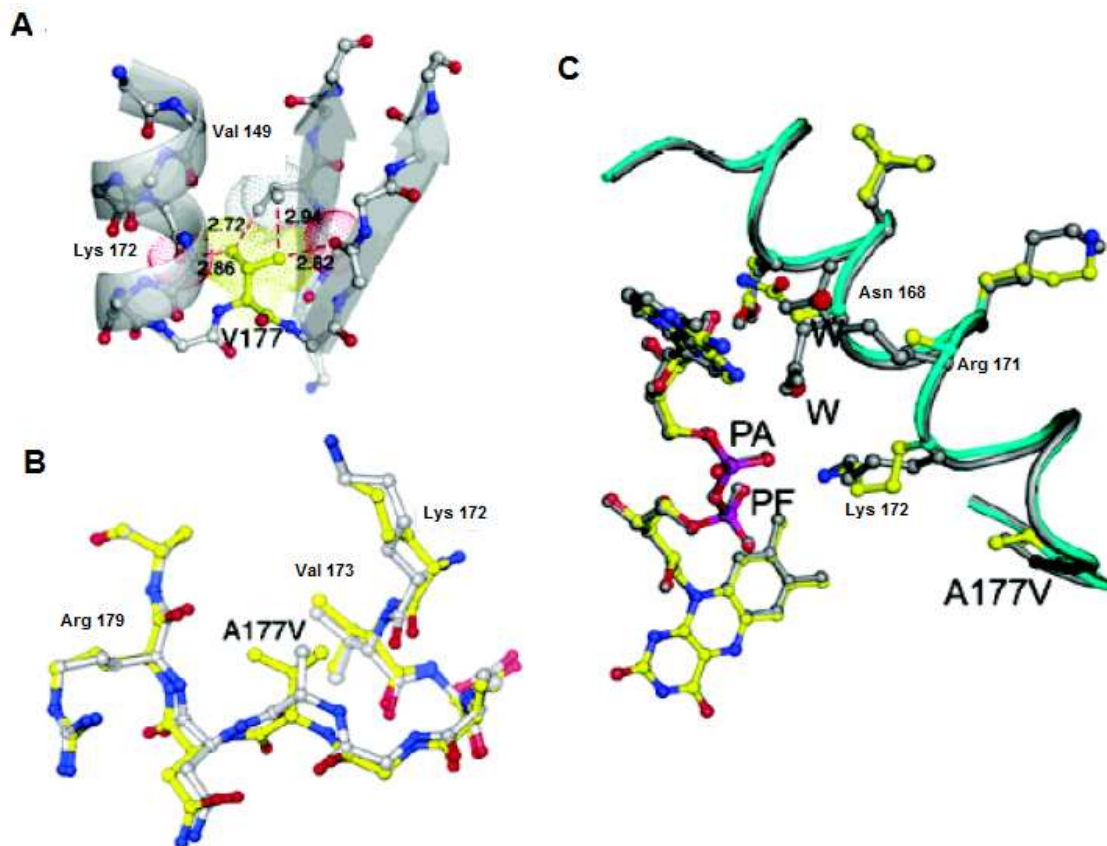


Fig. 23. Modificaciones provocadas por la variante A177V de la MTHFR de *E. coli*. A- Alteraciones en el sitio de la mutación y su propagación para la hélice 5, se muestra el traslape estérico que resulta del cambio de alanina por valina en la posición 177 y algunas de las regiones y aminoácidos afectados. B- Cambios estructurales en el asa que conecta la hélice 5 con la cadena 6, donde se superponen las estructuras moleculares de esta parte de la enzima silvestre (de color blanco) con las mismas de la enzima con el cambio A177V (de color amarillo), ambas con los átomos de distintos colores. C- Efecto del cambio sobre las interacciones de FAD con la enzima (conforme a lo establecido en el texto) teniendo al centro la Asn168 de la hélice 5, los colores corresponden a la enzima silvestre y mutada de acuerdo a la figura B; en la enzima mutada la Asn168 (que interacciona con PA en la silvestre) sufre un rearrreglo que provoca que se interponga el medio entre la PA y la hélice próxima; la Arg171 interactúa con el medio en lugar de con la adenina. PA: grupo adenina fosfato, W: medio, solvente o solución también señalado su interacción con color rojo. Obtenido de la Ref. [Pejchal R, et al, 2006].

Para determinar el efecto protector de cómo el folato previene la pérdida de FAD, utilizaron el análogo del 5-metiltetrahydrofolato ya mencionado (Fig. 24). En este complejo, el anillo de deazapterina del LY309887 está frente a la cara *si* del anillo de isoaloxacina de FAD, con la cadena lateral del carbono sobre la superficie formada dentro del fondo del barril. Las interacciones entre el LY309887 y la enzima, son muy similares con las observadas en las interacciones de ésta con el 5-metiltetrahydrofolato, con la diferencia de que el metiltetrahydrofolato contiene el grupo metilo en la posición 5, lo que hace que el anillo correspondiente esté menos cerca del anillo isoaloxacina de la flavina,

además de otras diferencias (Fig. 24B). Tanto el anillo deazapterina del LY309887 y el de pterina del metiltetrahidrofolato, están orientados por interacciones similares con el aspartato y la glutamina de las posiciones 120 y 183 respectivamente, mientras que el anillo de tiofeno ocupa el mismo hueco hidrofóbico que el anillo del ácido *p*-aminobenzóico del metiltetrahidrofolato [Pejchal R, et al, 2006].

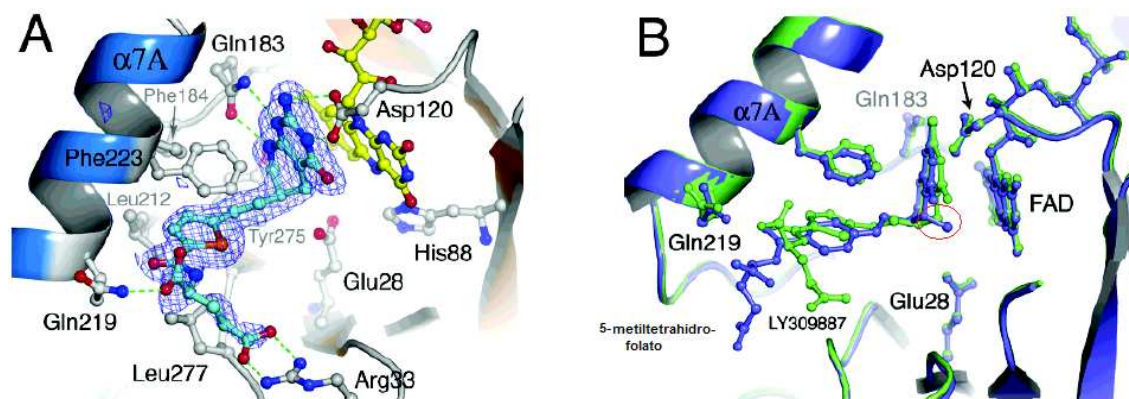


Fig. 24. Interacciones entre la MTHFR de *E. coli* y el LY309887 y el metiltetrahidrofolato. A- El anillo de 5-deazapterina interactúa mediante puentes de hidrógeno con Asp120 y Gln183, que son residuos conservados entre bacterias y mamíferos; el anillo de isoaloxacina y el de pterina se encuentran en contacto por fuerzas de van der Waals; el tiofeno se encuentra colocado entre Phe223 y Leu277; y existen puentes de hidrógeno entre Gln 129 y Arg33 con los carboxilatos de la posición α y γ de la cola de glutamato del LY309887. B- Comparación de la unión del LY309887 y el metiltetrahidrofolato, el complejo formado entre el análogo de folato y la enzima (color verde) se encuentra sobrepuesto con el complejo del 5-metiltetrahidrofolato y la enzima (color azul). El círculo rojo indica el grupo metilo del metiltetrahidrofolato. Obtenido de la Ref. [Pejchal, R, et al, 2006].

Como ya se ha establecido, muchos folatos tienen un efecto protector en contra de la disociación de FAD y la pérdida de actividad de la enzima MTHFR, entre los que se encuentran el 5-metiltetrahidrofolato, dihidrofolato, 5, 10-metilentetrahidrofolato y el LY309887 [Pejchal R, et al, 2006]. Uno de los mecanismos mediante el cual los folatos favorecen la unión de FAD es a través del apilamiento de los anillos de pterina e isoaloxacina, lo cual se cree que provee de energía libre favorable para la interacción. Además, los folatos pueden afectar la unión de FAD de manera indirecta a través de cambios conformacionales que son inducidos por la unión de los folatos. Existen conformaciones alternas de “abierto” y “cerrado” que son adoptadas por las asas L2 y L4 (que corresponden a los aminoácidos 61-67 y del 118-131 respectivamente) que dependen del pH y la presencia de ligandos (Fig. 25). La

conformación cerrada de las asas L2 y L4 forman puentes de hidrógeno que no existen en las conformaciones abiertas, los cuales son: el grupo NH del residuo en la posición 62 y el grupo NH del residuo en la posición 120 interactúan con los oxígenos de la flavina en la conformación cerrada de L2 y L4 respectivamente. En base a lo anterior, se sugirió que la afinidad de FAD debe estar regulada por la apertura de estas asas. Al comparar la enzima silvestre sin folato y el complejo de la enzima con el metiltetrahidrofolato a pH de 7.4, se visualizó que la unión del metiltetrahidrofolato induce el cierre del asa L4, estableciendo que los folatos permiten que el asa L4 se encuentre en la conformación cerrada. Por su parte, el asa L2 permanece cerrada independientemente de la presencia de folatos a un pH de 7.2. Por lo tanto, considerando que el pH mencionado es cercano al pH fisiológico normal (7.35 a 7.45), tanto el L2 como el L4, están cerrados cuando el metiltetrahidrofolato se une, por lo que la enzima tiene más interacciones directas con FAD en la presencia de folatos que en la ausencia de los mismos, disminuyendo la inactivación de la MTHFR [Pejchal R, et al, 2006].



Fig. 25. Conformaciones del asa L2 y sus interacciones con el anillo de flavina. Obtenido de la Referencia. [Pejchal R, et al, 2006].

3.3.3. Padecimientos asociados al polimorfismo C677T, niveles plasmáticos de homocisteína y folatos.

Como se mencionó al principio de esta sección, existe una clara relación entre los dos puntos anteriores, que a su vez están vinculados con la variante C677T, sobretodo en las vías metabólicas implicadas. En un estudio realizado recientemente se estableció que en población india, como cuando se presenta la variante C677T en la población de África (de la cual no se han encontrado individuos sanos homocigotos en muchos estudios), es más susceptible a los niveles altos de homocisteína, además de que existe una asociación positiva entre la homocisteína y este polimorfismo con el género masculino, el consumo de alcohol, tabaco, diabéticos e hipertensos [Vinukonda G, et al, 2009].

Además se han llevado a cabo estudios en modelos animales de ratón en los cuales se relaciona la deficiencia de la MTHFR en ratones knockout para el gen *Mthfr* (mediante la inserción de un vector que tiene como blanco el gen *Mthfr*), y las consecuencias de dicha deficiencia. Uno de los primeros estudios de este tipo que se realizaron, estableció que los niveles de homocisteína total plasmática en ratones knockout homocigotos y heterocigotos eran de 1.6 a 10 veces mas altos que los observados con genotipo silvestre respectivamente, así como la elevación de la S-adenosilhomocisteína y la disminución en los niveles de S-adenosilmetionina y en el estado de metilación del DNA. Mientras que el ratón heterocigoto para esta mutación parecía normal, el homocigoto era de menor tamaño y con retrasos en el desarrollo al comparar los demás ratones de la misma camada; conforme estos ratones crecieron se observó una acumulación de lípidos en la aorta que se asocia al efecto aterogénico que conlleva la deficiencia de esta enzima [Chen Z, et al, 2001]. Un estudio más reciente, en el que se utilizó la misma técnica para obtener los ratones knockout, estableció que la deficiencia en la MTHFR aunado a una deficiencia en folatos incrementa el riesgo en la pérdida gestacional, así como el riesgo de tener descendencia con retraso en el crecimiento intrauterino y con cardiopatías congénitas, sin embargo, se utilizaron ratones heterocigotos ya que encontraron que la mortalidad era muy alta en aquellos ratones

homocigotos [Deqiang L, et al, 2005]. Cabe mencionar que los anteriores son modelos que consideran la total deficiencia de la enzima MTHFR, sin embargo los hallazgos encontrados en el fenotipo son parecidos a los encontrados en individuos humanos con la variante *C677T* (para los ratones heterocigotos), lo que permite visualizar el efecto de este polimorfismo en la enzima.

3.3.3.1 Polimorfismo *C677T* y cáncer.

Se han establecido muchas teorías en las que se supone una relación de la deficiencia en la MTHFR con el cáncer, las cuales predisponen un efecto negativo o favorable. En cuanto al efecto favorable o de protección, se ha establecido que la deficiencia en la MTHFR tiene como consecuencia una acumulación en la cantidad total de 5, 10-metilentetrahidrofolato, que sirve como donador de metilos para la síntesis de timidina. Lo anterior, puede conllevar a una reducción en la incorporación errónea de uracilo en el DNA (ya que se obtiene timina a partir de la metilación del uracilo), que puede resultar en la ruptura de la doble cadena del DNA durante la reparación del mismo, siempre y cuando se cuente con un nivel adecuado de folatos. También se ha hecho la suposición de que el gran requerimiento de síntesis de DNA necesario para la rápida proliferación de las células tumorales se vería afectada por las deficiencias en folatos, sin embargo esto también afectaría a las células normales. Por lo anterior, se realizó un estudio para establecer el efecto de este polimorfismo en 71 pacientes con leucemia linfocítica aguda, en el cual, al comparar con 114 controles se asoció a una disminución de 4.3 veces el riesgo de esta enfermedad debido a la menor proporción del genotipo *677TT* en los pacientes; sin embargo, en el mismo estudio, se incluyeron aparte 237 casos con leucemia mieloide crónica y 344 controles, sin embargo no se encontró una diferencia estadísticamente significativa, lo cual sugirió la importancia del impacto de la variante *C677T* en el desarrollo de la leucemia linfocítica aguda [Skibola C.F, et al, 1999]. Otro grupo encontró que al estudiar 253 pacientes pediátricos con leucemia y 200 controles, el polimorfismo se asociaba a un efecto de protección en pacientes con leucemia que portaban los rearrreglos cromosómicos de la leucemia mixta (linfocítica y granulocítica), así como en

aquellos con genotipo 677TT y 1298CC en leucemias hiperdiploides [Wiemels J.L, et al, 2001].

Por otra parte, debido a que la deficiencia de la MTHFR conlleva a una alteración en las reacciones de metilación del DNA (como la hipometilación del DNA genómico), que es una característica común en las neoplasias ya que puede provocar la sobreexpresión de oncogenes o el silenciamiento de los genes supresores de tumor, se ha asociado la variante C677T con un efecto negativo en el desarrollo del cáncer. Lo anterior, fue corroborado en un estudio en el cual se buscaron variaciones en genes que codifican para proteínas que catalizan las reacciones de metilación en 233 pacientes con distintos tumores sólidos, ya que encontraron una asociación positiva con la variante C677T y la alteración mencionada en la metilación del DNA en dichos pacientes [Zúñiga-Noriega JR, et al, 2007]. Otro estudio que refuerza lo anterior, es aquel que se realizó en 96 personas sanas, en el cual se determinó que el genotipo 677TT está asociado a una disminución en el patrón de metilación del DNA [Govindaiah V, et al, 2009].

Un estudio del 2008 realizado en México, que incluyó 51 pacientes con cáncer gástrico distal y 83 controles étnicamente similares, se basó en que los niveles bajos de folatos (debido a una dieta deficiente en los mismos) y la presencia de esta variante puede conllevar a un incremento de uracilo en el DNA, y por lo tanto el desarrollo de cáncer gástrico distal, sin embargo, no se encontró asociación en la población estudiada. Se estableció que en los resultados obtenidos no hubo dicha asociación ya que al suplementar una dieta adecuada en folatos, los niveles de folato en el epitelio gástrico aumenta hasta dos veces mas que el observado en el plasma, confiriendo una posible protección al desarrollo de tumores en esta zona [Cardona H, et al, 2002].

3.3.3.2. Pérdida gestacional recurrente y padecimientos relacionados.

La pérdida de tres veces o mas consecutivas del embarazo en el primer trimestre o a principios del segundo, se ha definido como pérdida gestacional recurrente (PGR) [Castro R, et al, 2004]. Tiene una prevalencia en menos del

5% de los embarazos de acuerdo a la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (aunque en algunas publicaciones se menciona que esta cifra corresponde a dos pérdidas consecutivas), mientras que a partir de las tres pérdidas consecutivas consideradas se dice que la frecuencia es menor al 1% [Zúñiga-Noriega J.R, et al, 2007]. Existen diversos factores que contribuyen en aproximadamente el 50% de los casos, como son: la exposición a agentes tóxicos, aberraciones cromosómicas, defectos en el útero, enfermedades hormonales, factores inmunológicos, enfermedades en el proceso de coagulación, infecciones, entre otras. La etiología del otro 50% de los casos es desconocida [Strobino B, et al, 1982].

Se ha demostrado que alteraciones en el metabolismo de los folatos y las otras vías implicadas, como la deficiencia de folatos, la hiperhomocisteinemia materna y la variante *C677T*, contribuyen a la etiología de la PGR en distintas poblaciones [Wouters M.G, et al, 1993]. Dentro de estos factores, se ha estipulado que la etiología del padecimiento se debe a que la homocisteína tiene un efecto tóxico directo para el embrión, misma que tiene un efecto para incrementar el potencial trombogénico, a que existe una alteración en la relación S-adenosilmetionina/S-adenosilhomocisteína, a una posible incorporación errónea de uracilo en el DNA, a la formación de micronúcleos y un efecto genotóxico [Castro R, et al, 2004]. Lo anterior se ha determinado que puede tener un gran impacto en las distintas poblaciones del mundo debido a la heterogeneidad que tiene la prevalencia de la variable *C677T*, por lo que se han realizado diversos estudios para establecer la asociación de este polimorfismo con la PGR en distintas poblaciones.

Un estudio realizado en Colombia con 93 mujeres con historia de PGR y 206 mujeres de grupo control, buscó la asociación entre el genotipo de la variante *C677T* y los niveles de homocisteína. Este estudio tuvo como antecedente el hecho de que se encontró una frecuencia del alelo T de alrededor de 36%, la cual es relativamente alta al comparar su frecuencia con otros países (pero menor a la de México). Sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa al comparar con los controles, lo cual fue atribuido a la dieta rica en folatos y a los productos sintéticos que contienen

ácido fólico [Zúñiga-Noriega J.R, et al, 2007]. Por el contrario, estudios realizados en Brasil y Uruguay, encontraron una diferencia estadísticamente significativa que apuntaba a un mayor riesgo de PGR en aquellas madres con el alelo mutado respecto a las madres del grupo control [Wouters M.G, et al, 1993; Couto E, et al, 2005].

En un estudio publicado en el 2009, se reclutaron del año 1999 al 2006 140 parejas con una historia de pérdida gestacional recurrente excluyendo factores de riesgo independientes de la hiperhomocisteinemia y la variante *C677T*, así como también se incluyeron 140 parejas controles con una historia reproductiva normal (con dos o más hijos y sin pérdida gestacional) [Castro R, et al, 2004], ambos del sur de la India. En este estudio no se encontró una asociación entre la edad materna y la PGR, contrario a lo que se observó en el aumento de la edad paterna, tal vez debido a la mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas en las células germinales, a un aumento en el daño al DNA, aneuploidía, entre otras causas [Slama R, et al, 2005]. En cuanto a los niveles de homocisteína se encontró que están aumentados en las parejas con PGR con respecto a los controles, incrementando el riesgo de este padecimiento de 4 a 7 veces dependiendo si se trata de la madre o el padre respectivamente, estableciendo que puede ser un factor independiente de la PGR; un aumento de los niveles de homocisteína en ambos individuos se encontró en el 7% de las parejas con PGR, mientras que ninguna de las parejas controles estaba en esta situación. Respecto a los genotipos de la variante *C677T*, se encontró una asociación estadísticamente significativa con el genotipo homocigoto para la variante *C677T* en el padre, además de que se encontró una asociación positiva entre el genotipo y los niveles de homocisteína, lo cual tiene asociación con la PGR por el daño al DNA. Los niveles de homocisteína asociados a un mayor riesgo en los padres, se estableció que se debió a la mayor proporción del alelo T en los individuos hombres estudiados, así como al efecto protector de los estrógenos en el aumento de los niveles de homocisteína en las mujeres. El daño al DNA determinado por la presencia de micronúcleos, determinó el efecto de los niveles altos de homocisteína sobre el DNA en dichos pacientes.

Además de los estudios mencionados anteriormente, muchos autores han encontrado una asociación positiva con la hiperhomocisteinemia y la variante C677T con la PGR sobretodo en madres. Un ejemplo de lo anterior, es un caso en el que se reportaron 5 pérdidas de embarazo consecutivas en una mujer con el genotipo homocigoto para la variante mutada e hiperhomocisteinemia, aunado a la alta prevalencia de hiperhomocisteinemia (12%), deficiencia en folatos (15%) y la presencia del genotipo CT y TT (20%) que fueron reportados en 100 mujeres con PGR [Quere I, et al, 1998]. Otro estudio estableció que la deficiencia en folatos y la hiperhomocisteinemia estaban asociadas al aumento en el riesgo de la PGR alrededor de 3 veces a comparación de los controles, ante lo cual, se sugirió que el aumento en los niveles de homocisteína pueden estar asociados con una presencia de vasos sanguíneos coriónicos anormales [Nelen W.L, et al, 2000]. A pesar de las asociaciones positivas mencionadas, un meta-análisis basado en 26 estudios en el que se incluyen 2120 casos de PGR y 2949 controles, encontró que no había una asociación estadísticamente significativa con el genotipo TT y la PGR [Ren A, et al, 2006], contrario a lo que encontró en otro meta-análisis realizado anteriormente [Nelen W.L, et al, 2000]; sin embargo es importante considerar en estos casos las poblaciones estudiadas, ya que en el primer caso se incluyen a las poblaciones europea y china, las cual tienen una menor prevalencia en general del alelo mutado y una mejor alimentación. La suplementación de ácido fólico ha demostrado tener efectos benéficos al disminuir los niveles de homocisteína y aumentar los niveles de folatos tanto en el plasma de la madre como en el líquido amniótico [Castro R, et al, 2004]. En el caso de otro estudio realizado en la población india, un estudio realizado en 24 mujeres con PGR mostró una prevalencia de hiperhomocisteinemia y una deficiencia en folatos a comparación de los controles [Kumar K.S, et al, 2003].

Algunos estudios muestran la asociación que existe entre la esterilidad y la hiperhomocisteinemia, sin embargo la mayoría están enfocados a la fertilización *in vitro*. Debido a lo anterior, se llevó a cabo un estudio en el cual se evaluaron los niveles de homocisteína, el genotipo de la variante C677T del gen *MTHFR*, los niveles de folatos y de vitamina B12 en 20 pacientes con PGR y 20 mujeres con esterilidad idiopática [D'Uva M, et al, 2007]. En ambos grupos

se determinó la presencia de hiperhomocisteinemia, una alta frecuencia en el genotipo homocigoto para la variante mutada y un nivel menor de folatos y vitamina B12 al comparar con los controles. Lo anterior concuerda con los otros estudios en los cuales se relaciona la hiperhomocisteinemia y la variante *C677T* con PGR, sin embargo, se establece una nueva asociación entre el aumento de los niveles de homocisteína y los niveles bajos de folatos con la esterilidad idiopática en mujeres.

Recientemente, se ha encontrado evidencia de que la trombofilia (propensión a desarrollar trombosis o formación de coágulos sanguíneos) puede tener efectos negativos en el embarazo, como es el caso de su fuerte asociación con la PGR. Es importante mencionar que dentro de los factores asociados con la trombofilia de tipo hereditario, se encuentran el polimorfismo *C677T* y la hiperhomocisteinemia, los cuales como ya se mencionó anteriormente, están relacionados con la pérdida gestacional [Robertson B, et al, 2006]. Se llevó a cabo un reporte de casos en el cual se incluyeron 8 pacientes con historia de PGR, con la variante *677T* en homocigosis y con problemas de trombofilia únicamente asociados a la variante mutada del gen *MTHFR*, y con exclusión de otras causas independientes de la PGR [Altomare I, et al, 2007]. Se sugirió que la tromboembolia observada en estos pacientes se pudo deber a los daños causados por la homocisteína en el epitelio vascular, lo que también conllevó a un deterioro en la placenta. En cuatro de estos pacientes homocigotos para el alelo mutado de la variante *C677T* se observaron una gran cantidad de pérdidas gestacionales a pesar de que sus niveles de homocisteína eran normales, lo cual sugiere que existe un mecanismo que no depende tanto de los niveles de homocisteína apuntando a una alteración en los patrones de metilación. En este reporte, se propuso un tratamiento de estos pacientes con heparina (anticoagulante) como un método de intervención terapéutica para aumentar la probabilidad de llegar al término del embarazo y disminuir el riesgo de recurrencia de pérdida gestacional, teniendo en cuenta el riesgo de una hemorragia masiva que puede haber en el momento del embarazo. Dos de las pacientes tratadas con heparina han llevado a término con éxito su embarazo, en el 2007 se reportó que una de las pacientes estaba en el tercer trimestre de

embarazo sin algún problema, y las pacientes restantes hasta ese año estaban siendo tratadas con heparina.

3.3.3.3. Fallo renal.

El fallo renal está asociado a un incremento en el riesgo a desarrollar enfermedades cardiovasculares, así como a un incremento en los niveles de homocisteína [Bostom A.G, et al, 1999]. Estudios han establecido que los pacientes con fallo renal que tienen genotipo TT son más susceptibles a desarrollar hiperhomocisteinemia que aquellos con el genotipo CC, sin embargo, tras una suplementación de ácido fólico los niveles de homocisteína disminuyen, así como algunos de los efectos relacionados en estos pacientes [Ueland P.M, et al, 2001]. Los mecanismos por los que la homocisteína se encuentra elevada en pacientes con insuficiencia renal se ha descrito que son complejos, ya que la disminución en la eliminación urinaria no es la causa principal, si no que se debe básicamente a una alteración en su metabolismo [Chauveau P, et al, 1993]. Dentro de los factores asociados, se encuentra la pérdida de la parénquima renal, los efectos tóxicos debido a la uremia, la dieta restrictiva en proteínas, deficiencia en vitaminas, los fármacos como la ciclosporina, factores relacionados con la diálisis, entre otros [Bostom G.A, et al, 1997]. Respecto a la uremia, existen estudios donde se sugiere que la uremia puede favorecer la hidrólisis de la vitamina B6 en el plasma, el cual es un cofactor para las reacciones enzimáticas involucradas en la obtención de cisteína a partir de homocisteína. Los pacientes con nefropatía diabética, insuficiencia renal crónica, así como la población en diálisis y transplantada, presentan hiperhomocisteinemia desde leve a moderada, asociándose los niveles más elevados con mayor riesgo de patología cardiovascular [Millán I, et al, 1998].

3.3.3.4. Padecimientos neurológicos.

El cerebro es en particular vulnerable al estrés oxidante, principalmente debido a su alto consumo de oxígeno, el uso continuo de glutamato como

neurotransmisor, a que el nivel de los antioxidantes es menor que en otros órganos, la presencia de células microgliales que pueden producir especies reactivas de oxígeno, entre otras causas [Halliwell B, et al, 2007].

Se ha tenido un gran interés en la homocisteína y en el metabolismo de los folatos a partir de que se estableció que la homocisteína era una neurotoxina y un factor de riesgo para la enfermedad cerebrovascular, además de su relación con la deficiencia de folatos y la variante *C677T* del gen *MTHFR* [Sachdev P.M, 2005]. Desde hace muchos años, se estableció la relación entre la homocistinuria hereditaria y pacientes con retraso mental y epilepsia [Mudd S.H, et al, 1983]. Actualmente, se establece que la homocisteína promueve la atrofia neuronal en adultos y por lo tanto es un factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer [Sachdev P.M, 2005].

Se ha establecido que el aumento de la homocisteína en las neuronas es debido a que es rápidamente asimilada a través de un transporte específico, además de que el cerebro en particular, es vulnerable a dichos niveles debido a que carece de dos vías importantes para la eliminación de la homocisteína [Sachdev P.M, 2005](metilación de la betaína y transulfuración) (Fig. 1). Dentro de los mecanismos de neurodegeneración descritos, el aumento del estrés oxidante, el daño a DNA, la excitotoxicidad y la promoción de la apoptosis, son aquellos en los que participa directamente la homocisteína, los cuales se encuentran brevemente descritos a continuación y resumidos en la figura 26.

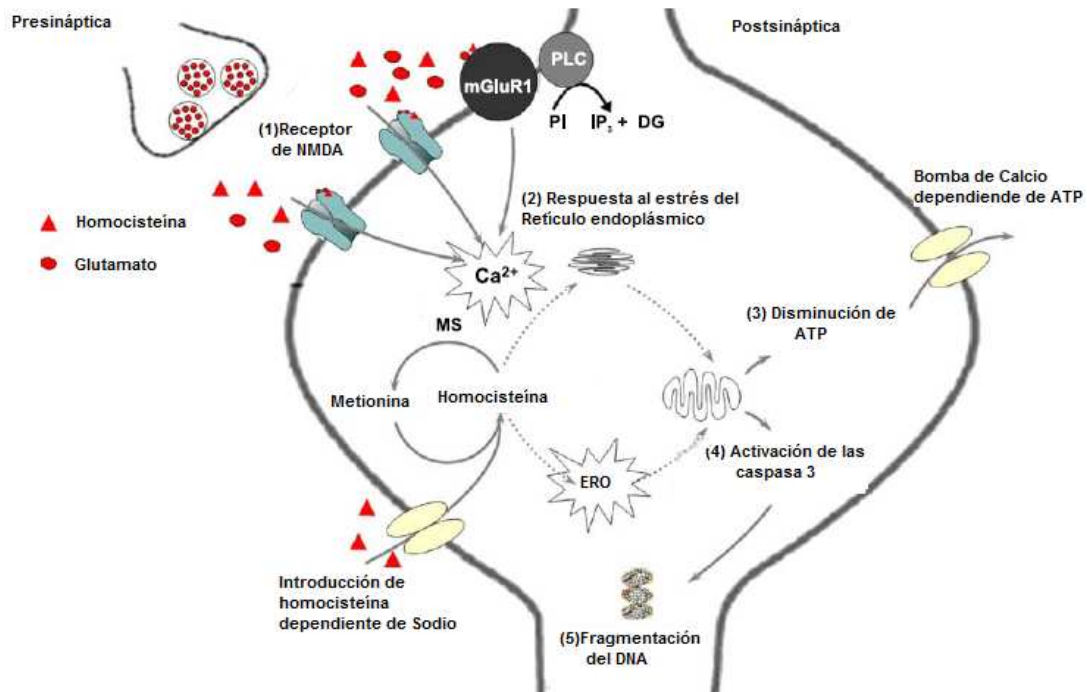


Fig. 26. Mecanismos de neurotoxicidad de la homocisteína. (1) La homocisteína actúa como agonista al unirse en el sitio del glutamato en el receptor de NMDA, así como también al unirse al receptor metabotrópico de glutamato del grupo I (mGluR1) activando la señalización intracelular que concluye en la entrada de Calcio al citoplasma. (2) La homocisteína induce el estrés en el ER que conlleva a apoptosis. (3) La bomba de calcio y el daño a las mitocondrias disminuye los niveles de ATP disponibles. (4) El calcio intracelular y las especies reactivas de oxígeno (ERO), dañan a la mitocondria la cual exporta el citocromo c que a su vez activa a la caspasa 3 que desencadena la apoptosis. (5) La fragmentación del DNA es una característica que indica la apoptosis. Traducido de la Ref. [Halliwell B, et al, 2007].

- Aumento del estrés oxidante. El aumento de las especies reactivas de oxígeno, peróxido de hidrógeno y anión superóxido, se lleva a cabo de acuerdo a lo establecido anteriormente en la sección de homocisteína y estrés oxidante. Una suplementación de ácido fólico ha demostrado disminuir los niveles de dichas especies reactivas de oxígeno considerablemente [Bleich S, et al, 2000].
- Excitotoxicidad, daño a DNA y apoptosis. La homocisteína participa como un aminoácido excitatorio a través de la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I (mGluR 1 y 5) [Shea T.B, et al, 2002] y de los receptores de N-metil-D-Aspartato (NMDA) [Lazarewicz J.W, et al, 2003], además, algunos derivados de la homocisteína como el ácido homocisteico y el ácido cisteico también son agonistas de los receptores metabotrópicos de glutamato. Los

receptores metabotrópicos de glutamato de tipo I pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G, los cuales al estar en presencia de su ligando activan una serie de mecanismos de señalización intracelular en la que la fosfolipasa C genera el trifosfato de inositol (y diacilglicerol) como segundo mensajero, el cual llega hasta el retículo endoplásmico e interacciona con un receptor, lo que provoca la apertura de los canales de calcio y tiene como consecuencia el aumento de los niveles de calcio intracelulares; dicho aumento de calcio intracelular provoca que la mitocondria lo transporte en su interior para regular sus niveles mediante tres mecanismos (transporte uniporte, modo rápido y por el receptor de rianodina). Sin embargo, la mitocondria se puede sobrecargar de calcio, lo que ocasiona que se abra el poro de permeabilidad transitorio, que a su vez, tiene como consecuencia la liberación del citocromo c al citoplasma que activa el proceso de apoptosis a través de la activación de la caspasa 3 [Lipton S.A, et al, 1997], lo cual es el principio de la excitotoxicidad [Haliwell B, et al, 2007]. Por su parte, los receptores de NMDA son receptores de glutamato del tipo ionotrópico, ya que al coactivarse con sus dos ligandos (glutamato y glicina), y al haber una despolarización en la membrana, provocan la apertura de un canal iónico no específico para cationes (al retirarse el magnesio), dentro de los que se encuentra el calcio (fig. 27). Es importante mencionar, que bajo condiciones fisiológicas normales la homocisteína es un agonista parcial del receptor de glicina, por lo que al aumentar los niveles de homocisteína ocurre una sobreactivación del receptor de NMDA que conlleva al daño excitotóxico, lo cual tiene mayor impacto bajo condiciones fisiológicas adversas en las que se altera la barrera hematoencefálica.

EL MAGNESIO BLOQUEA EL RECEPTOR
BAJO CONDICIONES NORMALES DEL
POTENCIAL DE MEMBRANA

CUANDO OCURRE LA DESPOLARIZACION DE LA
MEMBRANA, EL MAGNESIO SE DESPRENDE Y
PERMITE EL PASO DE CATIONES



Fig. 27. Receptor NMDA y su activación. Dicha activación depende del potencial que se genera por la despolarización de la membrana. Otro catión que pasa a través de este canal es el Na⁺, mientras que se ha encontrado que el Zn²⁺ inhibe la actividad de este receptor. Modificado de la Ref. [Haliwell B, et al, 2007].

Se ha establecido que los receptores metabotrópicos del grupo I incrementan la actividad de los receptores de NMDA, mientras que los del grupo II y III disminuyen dicha actividad. Algunos pacientes con hiperhomocisteinemia y animales a los que se les ha administrado homocisteína, han presentado convulsiones, lo que demuestra la alteración provocada en las señales excitatorias [Feissner R.F, et al, 2009]; así como también se ha demostrado que al administrar antagonistas del receptor de NMDA, la neurotoxicidad debida a la homocistinuria es revertida parcialmente.

- La homocisteína también puede causar daño en las neuronas a través del estrés inducido en el retículo endoplásmico a través de la expresión de las proteínas chaperonas y no chaperonas. El mecanismo del estrés inducido en el retículo endoplásmico será abordado en el siguiente punto.

Se ha establecido que existe una relación entre los niveles de homocisteína y diversos padecimientos neurológicos, de los cuales, la mayoría se basa en el daño neuronal descrito. Existen estudios en los cuales se relaciona la hiperhomocisteinemia con la atrofia cerebral en ancianos sanos mayores de 65 años, con la disminución en la habilidad cognitiva en sujetos sin demencia, con la atrofia cerebral en sujetos alcohólicos, con la enfermedad de Parkinson, entre otras [Sachdev P.M, 2005]. En el último caso, los aumentos de los niveles

de homocisteína se han asociado a los efectos secundarios del metabolismo de la levodopa (precursor de la dopamina que se utiliza en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas), los cuales se ha establecido que son mas severos cuando existe una deficiencia de folatos y la presencia de la variante C677T del gen *MTHFR* [Kuhn W, et al, 2001].

Muchas publicaciones han establecido una asociación positiva entre la homocisteína y la enfermedad de Alzheimer (EA), en los que también se encuentran relacionados los niveles de folatos, y ambos factores correlacionan con la severidad física y dependencia social de los sujetos con esta enfermedad [Nilsson K, et al, 2000]. Una suplementación de ácido fólico, junto con el tratamiento normal para los pacientes con EA y altos niveles de homocisteína, manifestó mejores resultados que cuando solo se administra el tratamiento normal. La homocisteína se dice que promueve dos de los mecanismos principales a través de los cuales se provoca el daño neuronal, la acumulación del péptido β -amiloide y fosforilación anormal de la proteína tau [Sachdev P.M, 2005]. En cuanto al primer mecanismo, se ha demostrado que la homocisteína presenta un efecto sinérgico para la neurotoxicidad del péptido β -amiloide *in vitro* y en ratones transgénicos que tienen sobreexpresado el gen que codifica para el precursor amiloide, mediante el estrés oxidante y la promoción de la apoptosis; cabe mencionar, que estos péptidos se generan a partir de la proteína precursora amiloidea (que es cortada enzimáticamente) y se acumulan hasta formar unas placas denominadas placas β -amiloideas, las cuales son insolubles y se desarrollan principalmente en el hipocampo (una estructura en el cerebro que ayuda a codificar los recuerdos), y en otras áreas de la corteza cerebral que se usan para pensar y tomar decisiones, alterando la función de las neuronas y las conexiones con otras células nerviosas, provocando la muerte de las mismas. Por otra parte, se ha encontrado que la homocisteína promueve la fosforilación de la proteína tau, cuya función es estabilizar los microtúbulos. Esta proteína al estar hiperfosforilada, tiene un cambio estructural y tiende a formar enredos o marañas características, que como consecuencia provoca la desintegración de los microtúbulos, una alteración en la comunicación entre las neuronas y finalmente la muerte.

Un meta-análisis realizado en el 2005, incluyó 6 estudios en los que se incluyeron un total de 1119 pacientes con esquizofrenia y 1308 controles para establecer la prevalencia de la variante *C677T* en dichos pacientes [Lewis S. J, et al]. En este estudio encontraron un aumento estadísticamente significativo en el riesgo para esta enfermedad en aquellos individuos homocigotos para el alelo mutado, lo cual concuerda con otro estudio en el que además se estableció que existe una correlación entre los niveles de homocisteína y el riesgo a padecer esquizofrenia [Muntjewerff J.W, et al, 2006]. Estudios más recientes confirman la asociación anterior, añadiendo que la severidad del fenotipo observado correlaciona con la disminución en los niveles de folatos [Roffman J.L, et al, 2008].

Como se puede observar, existen numerosos padecimientos neurológicos asociados a los altos niveles de homocisteína y la variante *C677T*, ya que por ejemplo, también se encontró en un meta-análisis un aumento en el riesgo de depresión en aquellos individuos homocigotos para el alelo mutado en comparación con aquellos homocigotos para el alelo silvestre [Lewis S.J, et al, 2006]. Sin embargo, se ha establecido que la homocigocidad para la variante *T* confiere un efecto modesto de protección para la migraña clásica o con aura (previa distorsión de la visión) [Schürks M.D, et al, 2008].

3.3.3.5. Aterosclerosis y padecimientos relacionados

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico y complejo en el que la disfunción endotelial juega un papel primordial en su desarrollo y progresión. Es una enfermedad de las arterias grandes e intermedias en la que surgen depósitos de grasa (llamados placas ateromatosas) en las superficies internas de las paredes vasculares, y se caracteriza por los depósitos de colesterol, la infiltración de monocitos, la presencia de células espumosas, etc. Una vez que se lleva a cabo la lesión en el endotelio vascular, ocurre la activación del endotelio, que tendrá como consecuencia el aumento de la producción de especies oxidantes y la disminución en la disponibilidad del óxido nítrico (ON) endotelial (por el daño a las células endoteliales que lo producen) [Wei-guo Z,

et al, 2009]. Debido a lo anterior, habrá una mayor migración de monocitos que darán lugar a las células espumosas (macrófagos con lipoproteínas de baja densidad ingeridas y oxidadas), aumentando la secreción de citocinas inflamatorias y quimiocinas que aumentarán el tamaño de la placa junto con la acumulación de lípidos; finalmente, dicha placa obstruye el vaso sanguíneo hasta romperlo, con la formación posterior de una placa aterotrombótica que puede obstruir el paso de fluido (Figura 28). Es importante mencionar que se ha establecido que la homocisteína y otros agentes prooxidantes pueden provocar la activación del macrófago al promover el estrés oxidante, incluso llevándolos a la muerte, lo cual tiene como consecuencia una respuesta inflamatoria y la subsecuente pérdida de estabilidad en la placa aterosclerótica [Bea F, et al, 2009].

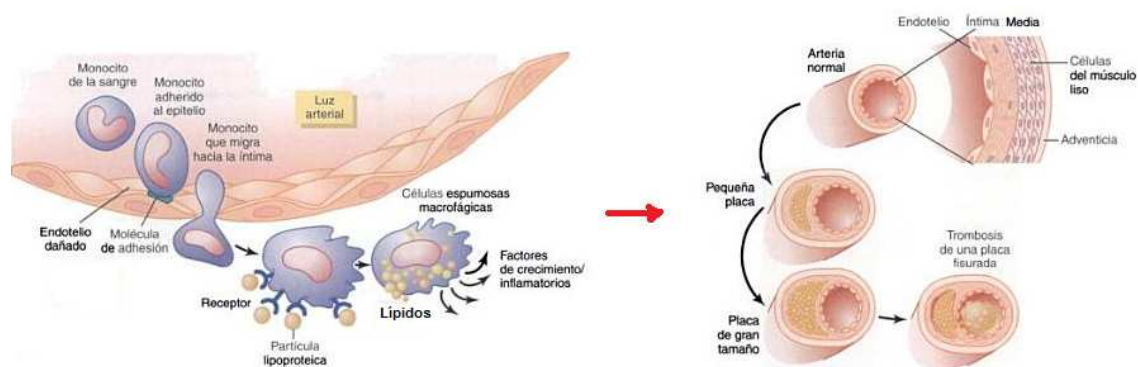


Fig. 28. Desarrollo de la placa aterosclerótica. Modificado de Guyton and Hall. Tratado de Fisiología médica, 10ª edición, Elsevier Saunders; Madrid, España (2006) 851.

Muchos estudios han demostrado que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente para desarrollar aterosclerosis, ya que es uno de los principales agentes que ocasionan la lesión endotelial promoviendo su disfunción y la apoptosis de células involucradas en el desarrollo del padecimiento (como las células endoteliales), que se ha demostrado que también es una característica importante de esta enfermedad [Austin R.C, et al, 2004].

En cuanto a la disfunción endotelial, se refiere a la alteración en la homeostasis normal presente en el endotelio vascular, donde se incluye la regulación del tono vascular, la hemostasis y la inflamación. Dicha disfunción endotelial se caracteriza por una alteración en la vasodilatación dependiente del endotelio y

sugiere una predisposición a padecimientos cardiovasculares. Se ha demostrado mediante modelos animales y en estudios realizados en humanos que la hiperhomocisteinemia provoca dicha disfunción a través de diversas maneras [Austin R.C, et al, 2004].

Una forma en la que se provoca la disfunción endotelial, es mediante la disminución de la disponibilidad del ON, el cual es uno de los principales vasodilatadores y es producido por la óxido nítrico sintetasa en las células endoteliales a partir de la L-arginina, activada por un complejo de calcio/calmodulina y por una cascada de fosforilaciones. Un estudio *in vitro* llevado a cabo en células endoteliales, ha demostrado que el aumento en los niveles de homocisteína disminuye proporcionalmente la cantidad de ON liberada, que correlaciona con otros estudios *in vivo*, sin embargo es importante establecer que existes distintos mecanismos por los cuales se disminuye la disponibilidad del ON [Wei-guo Z, et al, 2009]. Uno de los mecanismos involucrados, y el principal para disminuir la disponibilidad del ON y limitar la respuesta normal vasodilatadora que se ha demostrado *in vitro* e *in vivo*, es a través de los agentes oxidantes que aceleran su inactivación al oxidarlo, como por el anión superóxido que lo convierten a peroxinitrito; tanto el peroxinitrito como el anión superóxido contribuyen a que se alteren los tejidos, resultando en la peroxidación de lípidos y, en particular para el peroxinitrito, la modificación de las proteínas al nitrar los residuos de tirosina. Recientemente, se ha establecido que al aumentar los niveles de homocisteína en células endoteliales se incrementa proporcionalmente la generación de especies oxidantes lo cual correlaciona con otros estudios *in vivo* [Wei-guo Z, et al, 2009].

Otro mecanismo para la disfunción endotelial que se ha establecido, es a través de un inhibidor endógeno de la óxido nítrico sintetasa denominado dimetilarginina asimétrica, ya que se ha establecido que la homocisteína es capaz de inhibir el catabolismo de esta sustancia por la disminución en la actividad de las dimetilarginina dimetilaminohidrolasas, que hidrolizan dicho compuesto a citrulina y metilaminas [Stuhlinger M.C, et al, 2003]. Por otra parte, se sabe que la tetrahidrobiopterina es un cofactor esencial para la óxido

nítrico sintetasa y que en la ausencia de este cofactor, puede generar anión superóxido a expensas de la síntesis de óxido nítrico; además, la degradación de este cofactor se puede llevar a cabo por su oxidación gracias al estrés oxidante generado por la hiperhomocisteinemia y, asimismo, la homocisteína puede inhibir su síntesis a través de la alteración en la actividad de la sepiapterina reductasa que participa en la síntesis de novo y clásica [Topal G, et al, 2004].

Estudios realizados en cultivos celulares han demostrado que la homocisteína induce la producción de una gran cantidad de citocinas proinflamatorias, lo cual es de gran importancia en la enfermedad de la aterosclerosis, ya que por sí misma, se considera como un tipo de inflamación crónica [Austin R.C, et al, 2004]. Aunado a lo anterior, se ha establecido que la homocisteína, a través del estrés oxidante, incrementa los niveles de expresión de la interleucina-8, que es un agente quimiotáctico para linfocitos T y neutrófilos; lo anterior lo lleva a cabo a través de la activación un factor de transcripción (NF- κ B) que estimula también la producción de otras citocinas y quimiocinas, la expresión de moléculas de adhesión para leucocitos y factores de crecimiento, que aportan una importante contribución en la inflamación vascular y la consecuente aterogénesis, ya que además se promueve la transmigración de los leucocitos circulantes en la lesión provocada por la placa aterosclerótica. También se ha comprobado mediante un modelo animal en ratón, que la hiperhomocisteinemia puede acelerar la aterogénesis a través de la inflamación vascular, por lo general en las etapas tempranas de este padecimiento. Un estudio reciente, basándose en el papel indispensable de las células dendríticas en la inmunidad adaptativa para la promoción de la aterogénesis, demostró que cuando los niveles de homocisteína son incrementados se induce una mayor adhesión de las células dendríticas en las células endoteliales, así como un aumento en la transmigración al comparar con los controles, lo cual es uno de los pasos determinantes para que dichas células se dirijan al lugar donde se encuentra la lesión aterosclerótica; tanto la transmigración como la adhesión fueron inhibidas parcialmente cuando se administró conjuntamente la enzima superóxido dismutasa, lo cual comprueba el efecto de la homocisteína a través de la generación de especies reactivas oxidantes [Wei-guo Z, et al, 2009].

Un estudio realizado en ratones homocigotos y heterocigotos para la variante *C677T* mostró una acumulación de lípidos en la aorta, lo cual es una de las características mencionadas de las lesiones ateroscleróticas [Austin R.C, et al, 2004].

Un mecanismo muy interesante a través del cual la homocisteína promueve el desarrollo de la aterosclerosis, es por el estrés del retículo endoplásmico (ERE) [Austin R.C, et al, 2004]. El retículo endoplásmico es el sitio principal en el que se lleva a cabo el plegamiento y maduración de las proteínas transmembranales, secretadas y las mismas que pertenecen al retículo endoplásmico. Para proporcionar asistencia en el correcto plegamiento de nuevas proteínas sintetizadas, así como para prevenir la agregación de los intermediarios durante el plegamiento, el retículo endoplásmico posee una gran cantidad de moléculas chaperonas (como la calnexina, calreticulina y la isomerasa de enlaces disulfuro de proteínas), que actúan como un sistema de control de calidad para asegurar que solo las proteínas correctamente plegadas sean procesadas para después dirigirse al aparato de Golgi, para su posterior procesamiento y secreción. Bajo condiciones patológicas o debido a la interacción con agentes que interfieren con la correcta maduración y plegamiento de las proteínas, se activa la respuesta por proteínas mal Plegadas (RPP), la cual consiste en una ruta de señalización intracelular que responde a dicho ERE promoviendo el aumento en la expresión de los genes involucrados en la RPP (donde se incluyen los genes que codifican para las moléculas chaperonas), atenuando la traducción global de proteínas y degradando las proteínas mal plegadas (Fig. 29). Por su parte, la RPP es regulada a través de proteínas transmembranales sensoras residentes del retículo endoplásmico como IRE-1 (proteína requeridora de inositol), ATF-6 (activador de factor de transcripción) y PKR tipo cinasa del retículo endoplásmico; la activación de dichos sensores depende de su disociación de GRP78 (proteína de estrés regulada por glucosa) provocada por el ERE. Como resultado, la PRR se encarga de coordinar esta respuesta de manera oportuna y eficiente para asegurar la supervivencia de la célula, ya que si hay una falla que afecte la función de la RPP o, existe un daño prolongado o severo por el ERE, que puede resultar en la apoptosis y contribuir a una gran cantidad de

patologías como la enfermedad de Alzheimer, diabetes, enfermedad de Parkinson, etc. Como se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos propuestos mediante el cual se lleva a cabo el daño en el endotelio a través de la homocisteína es por el ERE y la activación de la RPP, lo que también se complementa con el efecto que tiene la homocisteína y sus metabolitos sobre la alteración de la estructura de las proteínas. Corroborando lo anterior, se ha demostrado que elevados niveles intracelulares de homocisteína promueven el ERE, y a su vez la activación de la RPP, ya que induce la activación de los sensores como el IRE-1. Lo anterior se ha demostrado que también induce la apoptosis dependiente de la señalización de IRE-1 principalmente.

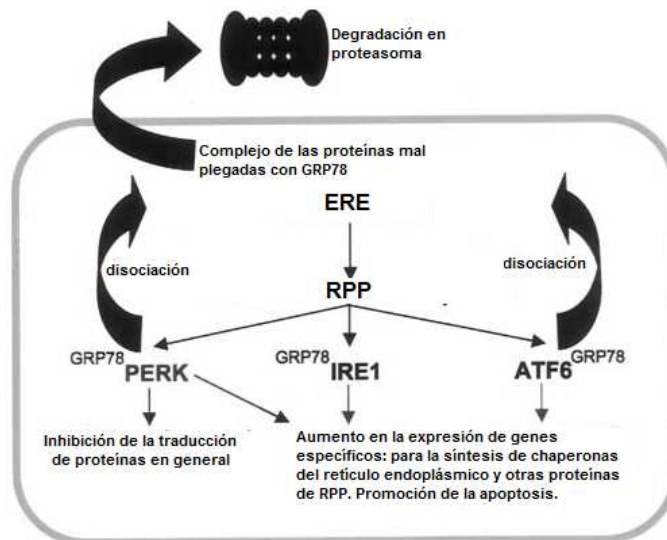


Figura 29. Estrés del retículo endoplásmico (ERE), la respuesta a proteínas mal plegadas (RPP) y sus respectivos sensores. La activación de los sensores ocurre por la disociación de GRP78 en respuesta al ERE. Una vez activado la RPP, se inicia una vía de señalización intracelular que culmina en la disminución de la traducción, el aumento en la expresión de los genes que codifican para las chaperonas y la degradación de las proteínas mal plegadas por el proteasoma. Traducido de la Ref. [Austin R.C, et al, 2004].

La enfermedad arterial coronaria es un padecimiento multifactorial, en el cual se involucran muchos genes de susceptibilidad y su interacción con el ambiente; una de sus causas más frecuentes es la aterosclerosis, la cual provoca que las arterias que suministran la sangre al músculo cardíaco se endurezcan y se estrechen [Wei-guo Z, et al, 2009]. Esta patología, es una de las principales consecuencias cardiovasculares que son producto de la elevación de la homocisteína, en pacientes con otras enfermedades como diabetes o daño renal, también es una de las causas principales de muerte. La hiperhomocisteinemia ha sido reportada como un factor de riesgo

independiente para la enfermedad arterial coronaria, tiene gran significado sobretodo en poblaciones con un gran riesgo a padecer estas enfermedades cardiovasculares, como en el caso de la población mexicana, que tiene un alto riesgo considerando que la frecuencia del polimorfismo *C677T* del gen *MTHFR* es la mas alta reportada en las poblaciones del mundo [Dávalos I.P, et al, 2000]. Recientemente se llevó a cabo un estudio sobre la influencia de esta variante en la enfermedad arterial coronaria en población india, ya que como se ha establecido, los individuos de esta población con dicha variante son más susceptibles a la elevación en los niveles de homocisteína. En este estudio, se observó una alta prevalencia de la hiperhomocisteinemia en pacientes con enfermedad arterial coronaria al comparar con los controles, la cual fue estadísticamente significativa. Una vez que controlaron los factores de riesgo convencionales para esta enfermedad, se encontró una asociación entre el polimorfismo *C677T* y esta enfermedad, estableciendo de esta manera, que es un factor de riesgo independiente para la enfermedad arterial coronaria [Vinukonda G, et al, 2009]. Un meta-análisis demostró también una asociación positiva de la hiperhomocisteinemia con la enfermedad isquémica cardiaca [Wald D.S, et al, 2002], así como otro estudio determinó que la variante *C677T* es un factor de riesgo para la enfermedad arterial coronaria [Alam M.A, et al, 2008]. Resulta interesante mencionar, que en una publicación se estableció que en población india que reside en Inglaterra no presenta asociación entre la prevalencia de este polimorfismo y la hiperhomocisteinemia, así como con la enfermedad arterial coronaria [Chambers J.C, et al, 2000]. Se ha establecido que esta diferencia en los resultados obtenidos entre ambos estudios se debe a la influencia de la dieta, sobretodo a que en países como Inglaterra existe una fortificación de los alimentos con ácido fólico [Vinukonda G, et al, 2009].

3.3.3.6. Malformaciones congénitas y defectos de tubo neural.

Alrededor del 30% de los embarazos termina en aborto espontáneo, la mayoría de las veces durante el primer trimestre, como resultado de anomalías cromosómicas o de otro tipo. Se ha establecido que alrededor del 2% de los recién nacidos vivos presenta malformaciones congénitas que requieren intervención quirúrgica [Behrman R.E, et al, 2006]. Los teratógenos (agentes

que causan alteraciones en el producto de gestación) asociados a anomalías físicas y mentales macroscópicas comprenden diversos microorganismos infecciosos (toxoplasmosis, rubeola, sífilis), sustancias químicas (como la talidomida, etanol, homocisteína), entre otros. En el caso de cualquier posible teratógeno, la extensión y la naturaleza de sus efectos están determinadas por las características del individuo expuesto, así como por la dosis y el tiempo de exposición. Los sistemas de órganos son más vulnerables durante los periodos de crecimiento y diferenciación máximos, en general durante el primer trimestre, el cual es denominado organogénesis. En la figura 30 se muestran los periodos que se asocian a sensibilidad durante la gestación en diferentes partes anatómicas.

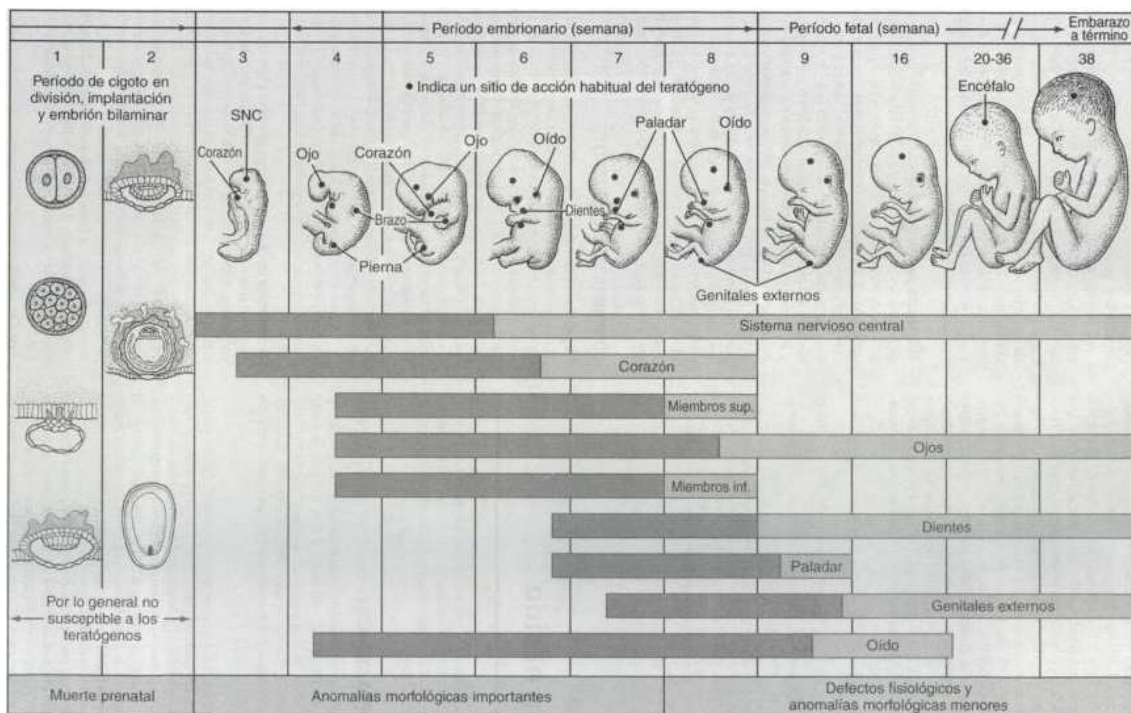


Fig. 30. Esquema que ilustra los periodos sensibles durante el desarrollo gestacional. Los cuadros oscuros indican periodos donde se incrementa la sensibilidad; los cuadros claros indican periodos menos sensibles a teratógenos a comparación del observado en los cuadros oscuros. Obtenido de la Ref. [Behrman R.E, et al, 2006].

Como se puede apreciar en el esquema anterior, en la tercera semana se inicia la formación del tubo neural, el cual es un evento crítico y está asociado a una alta susceptibilidad a teratógenos para desarrollar defectos congénitos [Secretaría de Salud, 2003]. Posteriormente, en la cuarta semana se lleva a cabo la organogénesis, la cual es una de las etapas más importantes del

desarrollo embrionario, la cual concluye en la octava semana y también otorga una gran susceptibilidad a desarrollar anomalías congénitas, sobretodo si hay exposición a teratógenos cuando no se tiene conocimiento del embarazo, lo cual es muy frecuente; dichas anomalías congénitas dependen de qué órgano o estructura se esté desarrollando y diferenciando, ya que confiere mayor susceptibilidad en el tiempo en que actúa el teratógeno.

Existe una gran cantidad de información epidemiológica y experimental que demuestra la importancia de la interacción de los genes con el ambiente en el desarrollo de malformaciones congénitas, resaltando el impacto de los factores socioeconómicos, geográficos, étnicos, consideraciones respecto al estado de salud de la madre y sobre todo los nutricionales [Finnell R.H, et al, 2004]. Respecto a los últimos, existe evidencia que demuestra que el exceso o deficiencia de componentes alimenticios específicos pueden afectar el desarrollo del embrión. Desde hace algunos años, ha incrementado el interés que tiene la participación de factores nutricionales en el desarrollo embrionario, en particular las vitaminas B, dentro de las cuales se encuentra el ácido fólico, que su suplementación durante el periodo periconcepcional, tiene un efecto positivo en la reducción del riesgo para malformaciones congénitas como los defectos de tubo neural, cardiopatías congénitas y malformaciones craneofaciales. Por su parte, dichas malformaciones están asociadas a consecuencias adversas emocionales, económicas y sobre la salud. En México se ha establecido que los defectos de nacimiento y las enfermedades genéticas constituyen un problema de salud pública, ya que son una causa importante de morbilidad y mortalidad [Zubieta-Ruiz B, et al, 2009]. De acuerdo al informe del Consejo Nacional de Población (CONAPO), las enfermedades congénitas incrementaron su incidencia a partir de 1997, y desde entonces ocupan el segundo lugar de las causas de muerte [CONAPO, 1999]. Por su parte, el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) señaló en el 2006 que las malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas son la segunda causa de muerte en niños de uno a cuatro años, la tercera en niños de cinco a 14 años y como causa de morbilidad general, se considera que ocupa el número 20; además, el Anuario Estadístico 2007 del Instituto Nacional de Pediatría informó que las enfermedades congénitas

presentan una tasa de 11.2 por cada 100 pacientes atendidos (como consulta de primera vez), la cual es la más alta para dicho período. En cuanto a la importancia en el impacto económico en el país, se ha estimado el costo por caso de Espina Bífida en 2 millones de pesos, y el costo de cada cirugía de labio paladar hendido entre 30 y 18 mil pesos (en el estado de Querétaro), mientras que en el Hospital de Especialidades del Niño y la Mujer la atención por meningocele en su hospitalización inicial, cuando nace el bebé, y la primera cirugía cuesta 10 mil 500 pesos, por mencionar algunos ejemplos [Secretaría de Salud, 2003].

Debido al efecto de protección que ha demostrado tener la suplementación de ácido fólico en contra de este tipo de padecimientos, muchos investigadores se han enfocado en estudiar los genes cuyos productos interactúan con los factores nutricionales que tienen impacto en el desarrollo embrionario, como la búsqueda de polimorfismos en genes que codifican para las enzimas que participan en el metabolismo de los folatos y su transporte [Finnel R.H, et al, 2004]. Además, es importante mencionar que la adecuada expresión en el contexto temporal y espacial de muchos genes reguladores es indispensable para tener como resultado el nacimiento de un individuo fenotípicamente normal. Durante el desarrollo, el embrión requiere de responder al nivel de transcripción a muchos factores ambientales (como el estado nutricional de la madre), por lo que al interrumpir los procesos fundamentales como la proliferación celular, diferenciación para formar tejidos y la migración de las células a su posición anatómica final puede resultar en un producto malformado. Un caso más específico de lo anterior, es la relación que existe entre el ciclo de los folatos y el de la metilación de la homocisteína, ya que, como se mencionó anteriormente, la deficiencia de folatos puede alterar directamente la respuesta transcripcional de los genes que codifican para proteínas críticas envueltas en cualquiera de los procesos mencionados anteriormente, y tener como consecuencia efectos adversos en la embriogénesis. El patrón de metilación en las islas CpG es determinado durante etapas tempranas de la embriogénesis, donde es borrado para después restablecerse en la implantación por las metiltransferasas que participan en la metilación de novo principalmente. Por lo tanto, existe un gran

impacto del nivel de los folatos y la homocisteína sobre el desarrollo embrionario, ya que repercuten en los cambios en patrones de metilación de genes críticos que son regulados en esta etapa; lo anterior ha sido demostrado en ratones transgénicos homocigotos para mutaciones deletéreas en alguno de los genes que codifican para las metiltransferasas, los cuales murieron durante el desarrollo embrionario o presentaron atrofia severa y retardo en el desarrollo [Rodríguez M, et al, 2004]. Como ya se ha mencionado, la presencia del polimorfismo *C677T* del gen *MTHFR* es uno de los mecanismos por los cuales se relacionan las anomalías con el ciclo de los folatos y la metilación de la homocisteína.

Muchos de los estudios que relacionan la variante *C677T* con las malformaciones congénitas se han enfocado principalmente en los defectos de tubo neural. Las formas más comunes de los defectos de tubo neural son conocidas como espina bífida, anencefalia y encefalocele, los cuales son resultado del inadecuado cierre del tubo neural durante el desarrollo fetal y que pueden provocar la muerte prematura o incapacidad, así como una gran cantidad de condiciones adversas como la falta de desarrollo del cerebro en la anencefalia. La prevalencia de los defectos de tubo neural es variable, pero es de aproximadamente de 1 por cada 1000 nacimientos en muchos países, sin embargo, se ha disminuido la ocurrencia de estos defectos al suplementar una dieta periconcepcional de ácido fólico en las madres [Botto L.D, et al, 2000], y en particular, en México la prevalencia de estos defectos es grande.

La formación del tubo neural en el humano ocurre en dos fases, pero además, hay que considerar que todo el sistema nervioso central y parte del sistema nervioso periférico se derivan de un tubo inicial. La primera fase de la formación del tubo neural corresponde al plegamiento de una placa neural que se localiza en la parte dorsal del embrión y que resulta en la formación del cerebro y de la médula espinal. En cuanto a la segunda fase, se refiere a una serie de procesos secuenciales de canalización y de diferenciación de toda la médula neural (o tubo neural), resultando en el desarrollo de la parte más distal (caudal) de la médula espinal [Van der Put N.M.J, et al, 2001]. En cuanto al término de defectos de tubo neural, se refiere a la malformación del cerebro del

embrión o de la médula espinal. Las distintas formas de tubo neural se caracterizan por un incompleto desarrollo del sistema nervioso central y está relacionado con estructuras que se encuentren cercanas. Tal como se mencionó anteriormente, factores ambientales y genéticos están relacionados con la embriogénesis, y en este caso en particular al desarrollo del tubo neural. Por lo que alteraciones en cualquiera de estos factores y procesos puede resultar en modificaciones en el cierre del tubo neural, que se manifiestan primariamente como anencefalia o espina bífida, y son acompañadas por alteraciones esqueléticas, meningovasculares y en tejido dérmico que están relacionadas con la canalización. Uno de los aspectos con los que se ha relacionado los defectos de tubo neural es aquel que tiene que ver con los folatos y la homocisteína, ya que se ha asociado a mutaciones en los genes que codifican para los receptores de folato, alteraciones en la vía de transulfuración de la homocisteína, en la vía de remetilación de la homocisteína, alteraciones en la actividad de la metionina sintetasa, mutaciones y polimorfismos en el gen que codifica para la MTHFR, entre otras, las cuales apuntan a un aumento en los niveles de homocisteína. La homocisteína por sí misma produce un efecto neurotóxico en el embrión durante el proceso de formación del tubo neural (y muchos otros), y está relacionado con la alteración en la metilación del DNA [Van der Put N.M.J, et al, 2001].

En una revisión publicada en el 2000 en la que se incluyeron estudios con casos y controles realizados en algunos países de Europa y Norteamérica de 1995 a 1999, se encontró un mayor riesgo asociado a este padecimiento en individuos homocigotos para la variante *C677T* que para los individuos con los otros dos posibles genotipos, sin embargo, es importante mencionar que cada país tenía diferente riesgo debido a la prevalencia característica del polimorfismo para cada nación y a otros factores, encontrando asociación en algunas poblaciones y en otras no. Otro hallazgo interesante que encontraron fue que el riesgo en las madres homocigotas para la variante mutada era casi el doble que para los otros genotipos, mientras que en los padres no hubo asociación estadísticamente significativa con el genotipo [Botto L.D, et al, 2000].

Como ya se había comentado anteriormente, los defectos de tubo neural tienen una gran prevalencia en la población mexicana, como lo mostró un estudio del programa de Registro y Vigilancia Epidemiológica de Malformaciones Congénitas Externas (RYVEMCE), en el que se estableció que en 1 de cada 250 productos concebidos con 20 semanas de gestación o más tenían un defecto de tubo neural, lo cual es hasta cuatro veces más lo observado en poblaciones relacionadas [Mutchinick O.M, et al, 1988]. De acuerdo al mismo estudio, la prevalencia de anencefalia, espina bífida y encefalocele fue, por cada 10,000 nacimientos, de 18.4, 15.6 y 3.2 respectivamente. Debido a lo anterior, se llevó a cabo un estudio para relacionar la prevalencia en los pacientes con defectos de tubo neural con el polimorfismo *C677T*, sin embargo no se encontró una asociación que fuera estadísticamente significativa [Mutchinick O.M, et al, 1999].

Muchos estudios han establecido que una de las principales maneras de prevenir estas malformaciones, es mediante el establecimiento de una dieta fortificada con ácido fólico para la madre de 400 a 800 µg diarios, lo cual reduce la ocurrencia de los defectos de tubo neural en un 40% [Werler M.M, et al, 1993], siendo la dosis diaria mínima recomendada 400 µg. Un estudio más reciente realizado en 118 casos y 112 controles sobre anencefalia en tres estados en donde la prevalencia es muy alta (Puebla, Estado de México y Guerrero), excluyendo los factores que pueden evitar obtener resultados confiables, se determinó que en madres con el genotipo *677TT* fue significativamente asociado a mayor riesgo de tener hijos con anencefalia que aquellas madres con el genotipo homocigoto silvestre [Muñoz J.B, et al, 2007].

Se han asociado los altos niveles de homocisteína, la deficiencia en folatos y la variante *C677T* con otras malformaciones congénitas, como lo es el caso del labio paladar hendido.

3.4. Labio/Paladar Hendido no sindrómico.

En humanos, las hendiduras orofaciales son malformaciones congénitas muy comunes con una prevalencia de 1 a 2 por cada 1000 nacidos vivos. Usualmente, éstas se dividen en dos diferentes fenotipos: labio hendido, también llamado labio leporino, con o sin paladar hendido (labio/paladar hendido o L/PH) y paladar hendido aislado (PH). Además, de ser no sindrómicos (aislados) o sindrómicos, en base a la presencia de otras anomalías. Aproximadamente el 30% y el 50% de los pacientes con L/PH y PH respectivamente, están asociados a una gran cantidad de síndromes, sin embargo, el L/PH no sindrómico es el que mas se ha estudiado en humanos [Lidral A.C, et al, 2008]. Generalmente, se ha aceptado que el L/PH y el PH tienen distintas características, ya que el PH es menos frecuente con una prevalencia de 1 por cada 1500 a 2000 nacidos vivos en caucásicos, mientras que el L/PH tiene una prevalencia de 1 a 2 por cada 1000 nacidos vivos; además, se ha encontrado que la prevalencia del PH no varía en distintos grupos étnicos mientras que la prevalencia del L/PH varía considerablemente (los africanos tienen la menor prevalencia y los asiáticos y amerindios tienen la mayor) y se ha encontrado que existe un mayor número de individuos afectados del sexo femenino con PH, contrario a lo que ocurre con el L/PH.

El labio/paladar hendido no sindrómico es un ejemplo de las enfermedades complejas, en las cuales existe una interacción entre el medio ambiente y múltiples genes para su desarrollo. A continuación se describirá brevemente como se lleva a cabo el desarrollo del labio y el paladar, así como posteriormente se establecerán las condiciones patológicas, los genes que se han asociado a la patología, la interacción del medio ambiente con los mismos, la situación actual en México.

3.4.1. Desarrollo del labio superior y paladar.

Después de la concepción, durante el desarrollo se lleva a cabo una cascada de procesos coordinados, dentro de los cuales se encuentran la migración

celular, el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis, los cuales conllevan al desarrollo de las estructuras craneofaciales a partir de la membrana orofaríngea. Al principio de la sexta semana de gestación, las prominencias nasales mediales se fusionan entre sí y con las prominencias maxilares bilaterales para dar origen al paladar primario y el labio superior; sin embargo se ha establecido en estudios recientes que el labio superior se forma por completo a partir de las prominencias maxilares [Moore K.L, et al, 2009] (Fig. 31). El paladar primario o primitivo, forma la porción anterior/media del maxilar y la porción premaxilar, que sólo representa una pequeña parte del paladar duro del adulto (Fig. 33). El labio inferior y la mandíbula son formados por fusión de las prominencias mandibulares. El paladar secundario (precursor del paladar duro y blando) comienza a desarrollarse al principio de la sexta semana a partir de dos proyecciones mesenquimatosas (prolongaciones palatinas laterales), que se extienden desde las porciones internas de las prominencias maxilares (Fig. 32). En un principio, las prolongaciones palatinas se proyectan en dirección inferomedial a cada lado de la lengua. Durante las semanas 7 y 8, la apoptosis y la transformación epitelial-mesenquimal (TEM) en los extremos mediales permiten que las proyecciones palatinas se fusionen después de que dichas proyecciones han adoptado una posición horizontal por arriba de la lengua; este cambio de orientación se produce por un proceso de corriente facilitado en parte por la liberación de ácido hialurónico en la mesénquima de las prolongaciones palatinas [Moore K.L, et al, 2009]. Diversas proteínas como las integrinas, las metaloproteinasas de matriz, microtúbulos y citoesqueletos de actina están envueltas en el proceso de TEM [Jugessur A, et al, 2005].

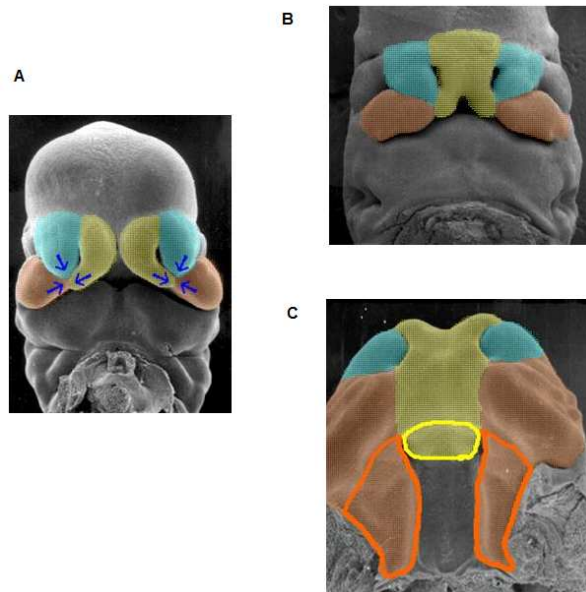


Fig. 31. Desarrollo de labio superior y paladar primario. A- Unión de las prominencias nasales medial (amarillo) y lateral (azul), que junto con las prominencias maxilares (café) forman el labio superior. B- Las prominencias nasales mediales (amarillo) se unen en la parte media para suavizar el surco de la parte central. C- Las prominencias nasales mediales (amarillo) participan en la formación del paladar primario (marcado en amarillo), y las proyecciones palatinas secundarias (marcado en café) son extensiones de las prominencias maxilares (café). Obtenido de <http://www.med.unc.edu>.

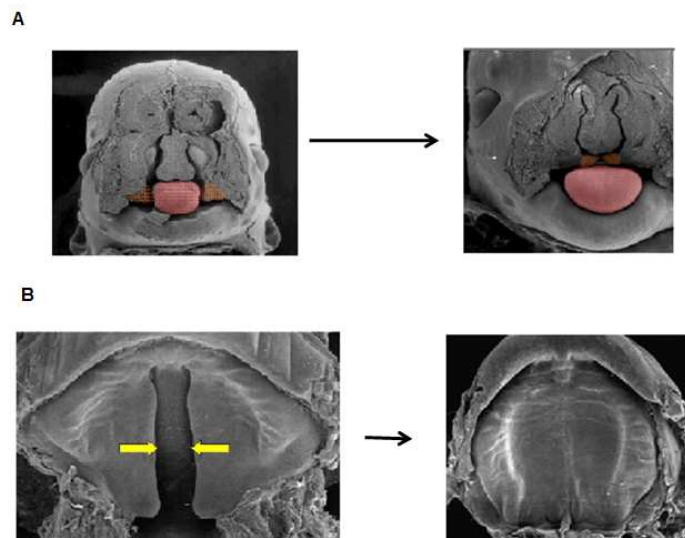


Fig. 32. Desarrollo adecuado de paladar secundario. A- Las proyecciones palatinas secundarias o laterales (café) migran de manera dorsal para llevar a cabo su fusión, ya que inicialmente la lengua (rosa) está interpuesta. B- Unión de las proyecciones palatinas laterales. Obtenido de <http://www.med.unc.edu>.

En el paladar primitivo se lleva a cabo un desarrollo progresivo del hueso que forma la parte premaxilar del maxilar (donde se ubican los dientes incisivos). Al mismo tiempo, el hueso se extiende desde los huesos maxilares y palatinos hasta las prolongaciones palatinas para formar el paladar duro, sin embargo,

las partes posteriores de estas prolongaciones no se osifican, sino que se extienden en sentido posterior más allá del tabique nasal y se fusionan para formar el paladar blando, incluyendo su proyección cónica blanda denominada úvula [Moore K.L, et al, 2009] (Fig. 33).

En el plano medio del paladar se encuentra un pequeño canal nasopalatino situado entre la parte anterior del maxilar y las apófisis palatinas de los maxilares, que en el paladar duro del adulto este canal está representado por la fosa incisiva, que es la abertura común de los pequeños canales incisivos derecho e izquierdo. Una sutura irregular corre a cada lado desde la fosa incisiva a la apófisis alveolar del maxilar, entre los dientes incisivos y caninos de cada lado, la cual es visible en la región anterior del paladar de las personas jóvenes e indica el lugar de fusión de los paladares embrionarios primitivo y secundario [Moore K.L, et al, 2009]. Cabe mencionar que el tabique nasal se desarrolla como un crecimiento hacia abajo que surge de las partes internas de las prominencias nasales mediales fusionadas, además, que la fusión entre el tabique nasal y las prolongaciones palatinas comienza en la parte anterior durante la novena semana y se completa en la parte posterior en la semana 12, por encima del paladar duro.

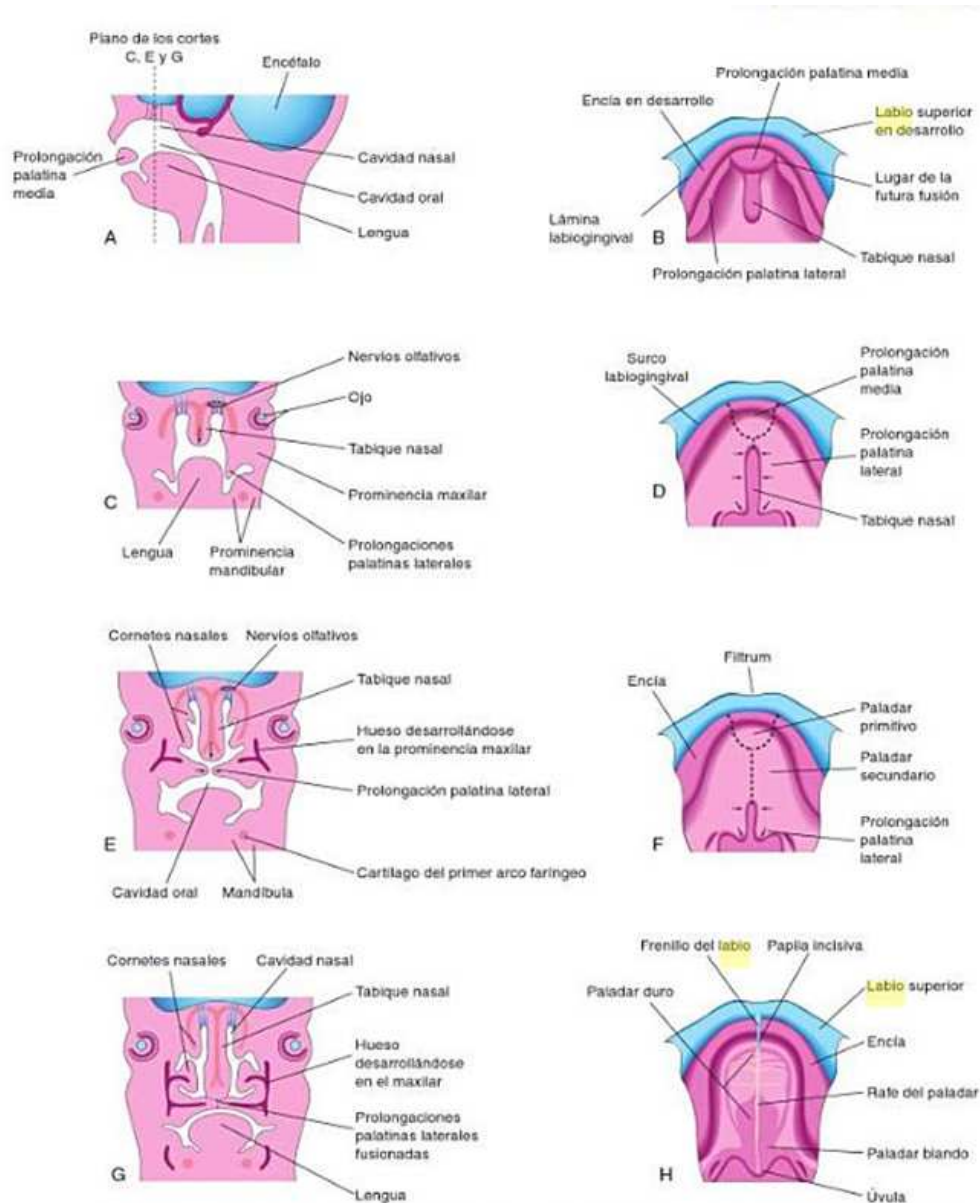


Fig. 33. Esquema del desarrollo del paladar. A- Corte sagital de la cabeza del embrión al final de la sexta semana mostrando la prolongación palatina media. B, D, F y H- Techo de la boca desde la semana 5 a la 12 con el desarrollo del paladar. Las líneas discontinuas en D y F indican los lugares de fusión de las prolongaciones palatinas. Las flechas indican el crecimiento medial y posterior de las prolongaciones palatinas laterales. C, E y G- Cortes frontales de la cabeza con la fusión de las prolongaciones palatinas laterales entre sí, el epitelio nasal y la separación de las cavidades oral y nasal. Obtenido de la Ref. [Moore K.L, et al, 2009].

Los eventos moleculares que controlan la formación de las estructuras orofaciales se encuentran bajo un estricto control, llevado a cabo por múltiples genes como aquellos que codifican para el factor de crecimiento de fibroblastos (*FGF*), el homólogo de sonic hedgehog (*SHH*), las proteínas morfogenéticas del hueso (*BMP*), miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (*TGF-\beta*), y por factores de transcripción como *DLX*, *PITX*, *HOX*, *GLI* y los que pertenecen a la familia T-BOX, los cuales tienen un papel

fundamental en la especificación mandibular y maxilar, y están regulados por las señales producidas por SHH, BMPs y FGF. Algunos de los genes implicados en la morfogénesis craneofacial se encuentran en la tabla 5, los cuales se han estudiado en modelos murinos ampliamente (Fig. 34). El *SHH*, cuyo producto tiene un papel primordial en la organogénesis de los vertebrados y tiene diferentes efectos dependiendo de su concentración, se encuentra expresado en la lámina epitelial media (que se forma cuando las proyecciones palatinas se están fusionando). Por otra parte, el *BMP2* y *BMP4*, se expresan de manera más específica en el epitelio y mesénquima de las proyecciones palatinas; ambas pertenecen a la superfamilia de las TGF β , sin embargo, la primera está involucrada en la formación del hueso y cartílago, mientras que la segunda se especializa en el desarrollo dental y de miembros, así como también participa en la temprana diferenciación del embrión. La expresión del gen homeótico *MSX1*, es necesaria para que a su vez se expresen *BMP2*, *BMP4* y *SHH*, los cuales en conjunto están implicados en la formación del labio superior y el paladar primario.

En el caso particular de la fusión palatina, está dirigida por una gran cantidad de moléculas de adhesión, en las que se incluyen la nectina1, los desmosomas y la colágena tipo IX, así como factores de crecimiento como los TGF α y el TGF β 3 [Jugerssur A, et al, 2005]. El factor de crecimiento epidermal, estimula la producción de mucopolisacáridos (como el ácido hialurónico) en las proyecciones palatinas, mientras que el TGF α estimula la biosíntesis de la matriz extracelular en la mesénquima palatina [Stanier P, et al, 2004]. La fibronectina y la colágena tipo III actúa como regulador de la expansión provocada por el ácido hialurónico durante la reorientación de las proyecciones palatinas, mientras que la colágena tipo IX también tiene un papel fundamental en la señalización implicada en las interacciones mesénquima-epitelio, apareciendo en la superficie celular de la lámina epitelial media para la elevación de las proyecciones.

Tabla 5.

Algunos de los genes principales implicados en la morfogénesis craneofacial a partir de modelos murinos. Obtenido de la Ref. [Stanier P, et al, 2004].

Función del producto	Genes
Proteínas de señalización	<i>Shh, Bmp2, Bmp4 and Bmp7, Wnt5a, Smad2-4</i>
Factores de crecimiento	<i>Egf, Egfr, Tgfa, Tgfb1-3, Fgf1, Fgf2, Fgf8</i>
Receptores para factores de crecimiento	<i>Fgfr1, Fgfr2</i>
Factores de transcripción	<i>Ap2a, Dlx1-6, Gli2-3, Hoxa2, Irf6, Lhx8, Pax9, Pitx1, Pitx2, Prx1, Msx1, Tbx1, Tbx22</i>
Moléculas para adhesión celular	<i>Pvr11, Connexin43, E-cadherin</i>
Proteínas de matriz extracelular	<i>Col2A1, Col11A1 and Col11A2, Mmp2, Mmp3, Mmp9, Mmp13, Timp1-3, Fibronectin</i>

Se ha establecido que los miembros de la familia TGF β son de particular importancia en el desarrollo del paladar, ya que las isoformas 1, 2 y 3 de esta proteína se expresan durante todo el proceso, y su función es regulada a través de la ruta de señalización de Smad (regulación de la transcripción).

TGF β 3 se expresa más temprano que los anteriores y se encuentra en el componente epitelial de las prolongaciones palatinas laterales en su posición vertical, aunque también se expresa posteriormente en dichas prolongaciones de forma horizontal y en la lámina epitelial media. Por su parte, la expresión de TGF β 1 está limitada en las prolongaciones cuando se encuentran en su forma horizontal y al igual que el anterior. Mientras que TGF β 1 y TGF β 2 tienen la función de acelerar la fusión del paladar, se ha establecido que TGF β 3 tiene un papel en la inhibición del crecimiento y es crucial para la primer interacción adhesiva, además, se ha demostrado que la fusión del paladar no se lleva cabo en la ausencia de TGF β 3, contrario a lo que sucede con TGF β 1 o TGF β 2 [Stanier P, et al, 2004]. La remodelación del tejido durante la fusión palatina consiste en una combinación de la degradación de la membrana basal y la transformación del epitelio mesenquimal, los cuales están bajo un estricto control por las metaloproteinasas de la matriz (enzimas proteolíticas que se encargan de remodelar la matriz extracelular) y por las proteínas de tejido inhibitoras de metaloproteinasas [Stanier P, et al, 2004].

Todo lo anteriormente descrito, corresponde a una pequeña parte de toda la cascada de señales y genes implicados para el desarrollo adecuado del labio y

el paladar, los cuales tienen un control muy riguroso, y cualquier alteración en alguna de las moléculas implicadas puede conllevar a malformaciones orofaciales.

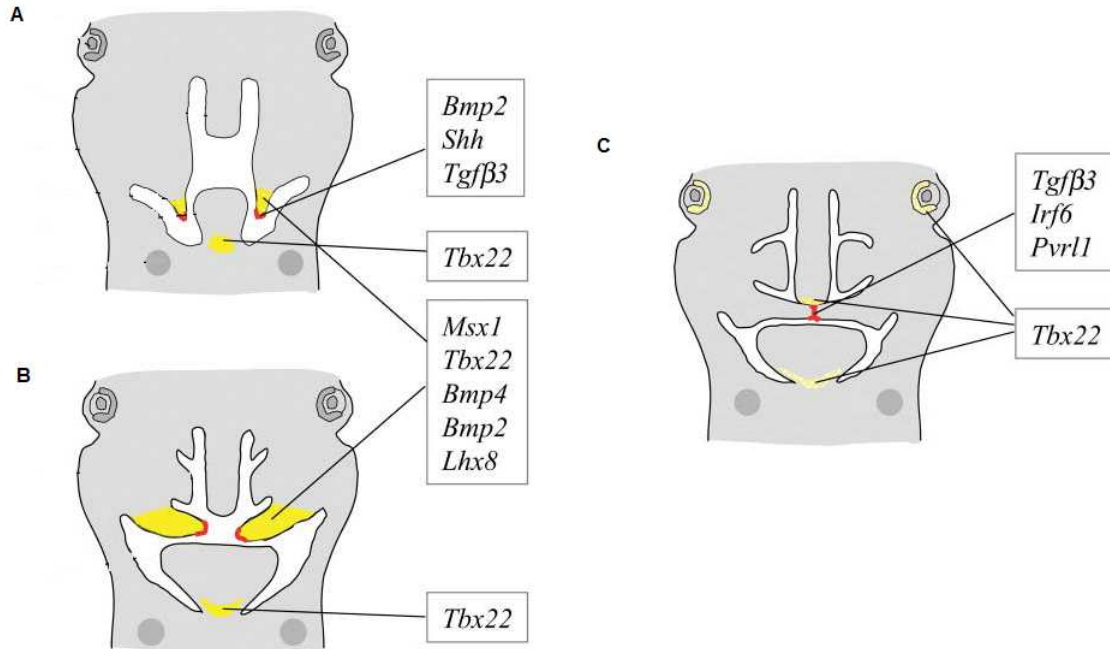


Fig. 34. Sitios de expresión de algunos de los genes principales envueltos durante la palatogénesis a partir de un modelo murino. A, B y C- Cortes frontales de la cabeza con la fusión de las prolongaciones palatinas laterales entre sí, el epitelio nasal y la separación de las cavidades oral y nasal. Obtenido de la Ref. [Stanier P, et al, 2004].

3.4.2. Condiciones clínico-patológicas del L/PH.

Como ya se mencionó anteriormente las hendiduras del labio y del paladar son de las anomalías craneofaciales más frecuentes. Es importante mencionar que este tipo de hendiduras tienen una importancia especial porque producen un aspecto facial anormal, así como dificultades para el lenguaje y la lactancia. Además de los criterios previamente descritos para clasificarlas, también suele hacerse tomando como punto de referencia la fosa incisiva. De esta manera, las hendiduras anteriores se refieren al labio hendido, en la que puede haber o no hendidura de la porción alveolar del maxilar y se deben a una deficiencia de la mesénquima de la prominencia maxilar y de la prolongación palatina media (Fig. 34C y D). La malformación con hendidura anterior completa es aquella en la que la hendidura se extiende por el labio y la porción alveolar del maxilar hasta la fosa incisiva, separando las partes anterior y posterior del paladar. Por

su parte, las hendiduras posteriores son aquellas que se refieren al paladar secundario y se extienden por las regiones blanda y dura del paladar hasta la fosa incisiva, separando las partes anterior y posterior del paladar (Fig. 35E y F), y se deben a un desarrollo defectuoso del paladar secundario y a distorsiones del crecimiento de las prolongaciones palatinas laterales, que impiden su función, principalmente [Moore K.L, et al, 2009].

Las hendiduras observadas en el labio hendido varían entre pequeñas muescas en el borde del labio a las mayores que se extienden hacia el suelo de la nariz y por la porción alveolar del maxilar. La hendidura del labio puede ser bilateral o unilateral. La hendidura unilateral del labio superior se debe a la falta de unión de la prominencia maxilar del lado afectado con las prominencias nasales mediales fusionadas. Esta alteración es del resultado de la falta de fusión de las masas mesenquimatosas, de la falta de proliferación de la mesénquima y del alisamiento del epitelio de revestimiento. La consecuencia de todo ello es la persistencia del surco labial. Además, el epitelio del surco labial se distiende y los tejidos del suelo del surco se separan. El resultado es que el labio se divide en porciones medial y lateral [Moore K.L, et al, 2009]. La hendidura del labio bilateral se debe a que las masas mesenquimatosas de las dos prominencias maxilares no se encuentran y no se unen a ellas las prominencias nasales mediales fusionadas. El epitelio de los dos surcos labiales se distiende y se rompe. Estos defectos provocan deformaciones muy importantes debido a la pérdida de continuidad del músculo orbicular de la boca, encargado de cerrar y fruncir los labios [Moore K.L, et al, 2009]. La hendidura media del labio superior es una anomalía muy rara que se debe a una deficiencia mesenquimatososa que produce una falta parcial o completa de fusión de las prominencias nasales mediales y de la formación de la prolongación palatina media.

El paladar hendido, con o sin labio hendido, puede afectar solo a la úvula o puede extenderse por las regiones blanda y dura del paladar, e inclusive extenderse por la porción alveolar del maxilar y por los labios a ambos lados en los casos más graves [Moore K.L, et al, 2009].

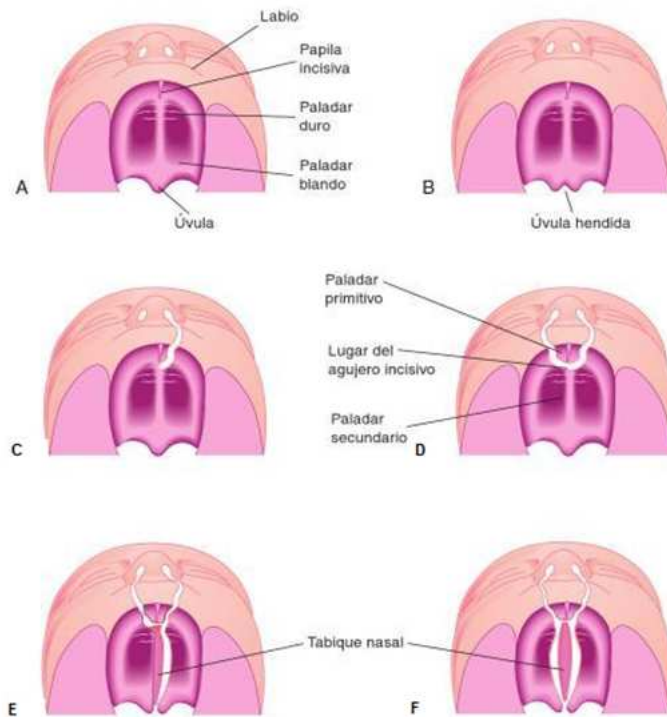


Fig. 35. Diferentes tipos de L/PH. A- Labio y paladar normales. B- Uvula hendida. C- Hendidura unilateral completa del labio y de la apófisis alveolar del maxilar con hendidura unilateral del paladar primario o anterior. D- Hendidura bilateral completa del labio y las apófisis alveolares de los maxilares con hendidura bilateral de la parte anterior del paladar. E- Hendidura bilateral completa del labio y las apófisis alveolares de los maxilares con hendidura bilateral de la parte anterior y hendidura unilateral de la parte posterior del paladar. F- Hendidura bilateral completa del labio y de las apófisis alveolares de los maxilares son hendidura bilateral completa del paladar anterior y posterior. Obtenido de la Ref. [Moore K.L, et al, 2009].

3.4.3. Genes implicados directamente en la etiología de L/PH.

Como ya se mencionó previamente, el L/PH es un ejemplo de enfermedad compleja. La mayoría de los afectados no tienen historia familiar positiva y la evaluación de los patrones de herencia en los casos familiares no muestra un modo de herencia del tipo Mendeliano, así como también se ha observado que existe baja penetrancia. Sin embargo, existe suficiente evidencia como para afirmar que esta patología tiene un importante componente genético, ya que hay un aumento de 40 veces en el riesgo de padecerla cuando existe un individuo afectado con primer grado de parentesco, y existe una gran concordancia con gemelos monocigotos (idénticos) al comparar con gemelos dicigotos. Cabe mencionar que la concordancia en gemelos monocigotos es del 40% al 60%, sugiriendo que la influencia del ambiente es un factor importante [Lidral A.C, et al, 2008].

Como ya se visualizó en la parte del desarrollo de estas estructuras orofaciales, estudios han estimado que de 3 a 14 genes que interactúan entre ellos y presentan efectos multiplicativos, están envueltos en la etiología de esta enfermedad, lo cual indica, junto con la influencia del ambiente, que se trata de un padecimiento complejo, con un origen genético heterogéneo. Lo anterior confiere mayor dificultad al mapear los genes involucrados, ya que solo una parte de los individuos afectados podrá tener una mutación en el mismo gen. Estudios humanos han utilizado análisis de asociación y ligamiento para evaluar el papel de genes candidatos en la etiología de L/PH. Los genes candidatos han sido escogidos en base a los patrones de expresión durante el desarrollo facial, modelos en ratones knockout o transgénicos con fenotipos de hendidura, asociaciones con las hendiduras de las formas sindrómicas, hallazgos positivos encontrados previamente en humanos, el papel en las vías de detoxificación y nutrición, y locus adyacentes a las aberraciones cromosómicas asociadas con fenotipos con hendiduras orofaciales (Tabla 6). A continuación se describirán algunos de los genes candidatos y/o sus productos, así como su asociación con este padecimiento.

Tabla 6.
Genes candidatos con evidencia positiva sobre la participación en el L/PH no sindrómico. Obtenido de la Ref. [Lidral A.C, et al, 2008].

Regiones candidatas	Genes candidatos	Ligamiento	Asociación	Modelo animal	Aberración cromosómica	Hendidura sindrómica
1p36	<i>MTHFR, SKI, PAX7</i>		X	X	X	
1q32	<i>IRF6</i>	X	X	X	X	X
2p13	<i>TGFA</i>	X	X			
4p16	<i>MSX1</i>		X	X	X	X
6p23 a 25	<i>TFAP2A, OFCC1</i>	X	X	X	X	
14q24	<i>TGB3, BMP4, PAX9</i>	X	X	X		
17q12 a 21	<i>RARA, Cif1</i>	X	X	X		
19q13	<i>BCL3, CLPTM1, PVRL2, TGFB1</i>	X	X		X	

- *IRF6*. Mutaciones en este gen causan el síndrome de Van der Woude, y considerando que este síndrome tiene una presentación similar al L/PH fue evaluado como gen candidato, encontrando una gran asociación

significativa entre las variantes de este gen con el L/PH [Zuccherio T.M, et al, 2004]. De esta manera se sugirió que dichas variantes contribuyen en un 12% en el desarrollo de esta patología y triplican el riesgo de recurrencia en algunas familias. Estos resultados se han obtenido en al menos cuatro poblaciones distintas, sin embargo aun no se han identificado las mutaciones específicas. Este gen codifica para el factor 6 regulador del interferón (IRF6), el cual es un factor de transcripción que contiene dominios de unión a DNA y a proteínas, y se expresa en la lámina epitelial media de las prolongaciones palatinas secundarias. También se ha establecido que el IRF6 regula la expresión de otros genes durante la palatogénesis. Un estudio estableció la hipótesis de que las mutaciones en este gen pueden conllevar a una represión en la ruta de señalización de TGF- β , de manera análoga a la represión mediada por IRF1, que conlleva a un aumento en la apoptosis epitelial antes de que las proyecciones laterales se fusionen [Cox T.C, et al, 2004].

- MSX1. Es un factor de transcripción que cuando es inactivado en ratones conlleva al paladar hendido y agenesia dental [Satokata I, et al, 1994], ya que se identificó una mutación en el gen que lo codifica en una familia con agenesia dental familiar hereditaria, así como otro estudio demostró que variaciones en este gen estaban asociados al L/PH. Recientemente se han encontrado mutaciones en el gen *MSX1* en el 2% de los pacientes cono hendiduras orofaciales no sindrómicas. Con lo anterior también se estableció que este factor de transcripción estaba implicado en el desarrollo del paladar primario y secundario.
- TGF β 3. Como ya se mencionó anteriormente, esta proteína tiene un papel indispensable en el desarrollo del paladar. Además del estudio realizado con ratones, estudios de ligamiento han mostrado resultados positivos para la región donde se encuentra el gen que codifica para esta proteína [Marazita M.L, et al, 2004], sin embargo solo en el 15% de las familias se obtuvo un resultado positivo, por lo que se estableció que posiblemente los genes *BMP4* y *PAX9*, que se encuentran cerca de

TGFβ3 y que también están asociados a las hendiduras orofaciales, estén implicados [Lidral A.C, et al, 2008].

- 19Q13.1 (*CLPTM1*, *PVRL2*, *TGFB1*). Muchos estudios han encontrado ligamiento o asociación con genes candidatos a lo largo del brazo largo del cromosoma 19 [Lidral A.C, et al, 2008]. Además, aberraciones cromosómicas también implican a esta región en familias con L/PH [Yoshiura K, et al, 1998]. Los genes candidatos en este locus son *CLPTM1*, *PVRL2* y *TGFβ1*. De éstos, se ha establecido que *PVRL2* es similar a *PVRL1* (receptor tipo-1 de poliovirus codifica para una molécula de adhesión que se expresa en el epitelio de las prolongaciones palatinas), cuyas mutaciones se asocian al síndrome de displasia ectodermal con L/PH, que se caracteriza por labio y paladar hendido, sindactilia parcial de los dedos de las manos y los pies, malformaciones dentales y cabello escaso [Zlotogora J, et al, 1994]. Además se ha establecido que los portadores de una mutación en *PVRL1* tienen un mayor riesgo para L/PH no sindrómico; por lo que se ha establecido que *PVRL2* puede tener un papel análogo [Lidral A.C, et al, 2008]. Por su parte, *TGFβ1*, como ya se mencionó participa en el desarrollo orofacial. El *CLPTM1* codifica para la proteína transmembranal asociada al labio y paladar hendido, la cual fue descubierta en un estudio de asociación y se ha establecido que participa en distintos procesos como la diferenciación celular, el desarrollo de organismos multicelulares y la regulación de la diferenciación de las células T en el timo.
- *FGFR1*. Mutaciones y deleciones en este gen se encuentran en aproximadamente el 10% de los pacientes con el síndrome de Kallman, los cuales tienen hendiduras orofaciales, malformaciones dentales, hipogonadismo y anosmia (pérdida o disminución del sentido del olfato) [Sato N, et al, 2004]. Este gen codifica para el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos, el cual es un receptor transmembranal con un dominio de tirosinasa que transduce las señales a partir de los factores de crecimiento de fibroblastos. Estudios de asociación y

ligamiento han relacionado este gen en el desarrollo de L/PH [Lidral A.C, et al, 2008].

- Búsqueda de genes adicionales para L/PH en el genoma. Con el surgimiento de las tecnologías para la genotipificación a gran escala y de las herramientas estadísticas, se ha podido examinar todo el genoma para identificar genes adicionales de que estén relacionados con un padecimiento. El primer análisis de este tipo para L/PH fue publicado en el 2000 [Presscot N.J, et al, 2000], para que posteriormente se llevarán a cabo otros 5 de diferente escala. En general los resultados no han sido muy significativos, con la excepción de un estudio en una familia grande de Siria, en la cual se obtuvo un valor de 3.0 de LOD ($\text{Log}_{10}\text{Odds}$) en 17p13.1, donde los valores de LOD mayores a 3.0 se consideran como evidencia significativa de ligamiento, mientras que aquellos que están debajo de -2.0 se excluyen [Lidral A.C, et al, 2008]. Un meta-análisis de estas publicaciones y un análisis de ligamiento en el cual se toma en cuenta la heterogeneidad genética (debido a que se estudiaron diferentes familias) mostró valores significativos de LOD para las regiones 1p12-p13, 6p23, 6q23-q25, 9q22-q33, 14q21-q24 y 15q15. De estos, la región 9q22-q33 obtuvo un valor de LOD de 6.6, el cual es el valor mas significativo reportado para L/PH [Lidral A.C, et al, 2008].
- 18q21.1. Recientemente se llevó a cabo un análisis de ligamiento utilizando microarreglos para SNPs con alrededor de 10000 marcadores, en el cual se obtuvo evidencia significativa de un nuevo locus de susceptibilidad en una región genómica de 5.7 Mb en 18q21.1 en una familia con este padecimiento que presenta un patrón de herencia autosómico dominante [Beiraghi S, et al, 2007]. Lo anterior tuvo como antecedentes una gran cantidad de estudios en los cuales se indica que las aberraciones relacionadas con el cromosoma 18 están asociadas a una alta incidencia de L/PH no sindrómico, incluyendo deleciones en 18q, trisomías 18 parciales o totales en las que se ve envuelta la región 18q21, así como algunas aberraciones en las que se ha encontrado L/PH junto con otras anomalías, como es el caso de un feto reportado

con un isocromosoma de 18q con labio y paladar hendido, retraso en el crecimiento, entre otras [Chen C.P, et al, 1998]. Este locus presente en el intervalo de 5.7 Mb contiene 36 transcritos curados (Ensembl), dentro de los cuales se incluyen genes implicados en el desarrollo normal y patológico de las estructuras craneofaciales. Dentro de los genes candidatos de esta región se encuentran los genes *SMAD2*, *SMAD4*, y *SMAD7*, lo cual tienen una gran relevancia, ya que como se mencionó anteriormente los miembros de la superfamilia *TGFβ* que participan en la unión del paladar durante el desarrollo del mismo se encuentran regulados por un sistema de señalización de SMAD. El análisis de haplotipos mediante una gran cantidad de eventos de recombinación, permitió definir el intervalo de 5.7 Mb asociado a este padecimiento, el cual está limitado por los SNP *rs824683* y *rs768206*. Lo anterior también permitió identificar el haplotipo de riesgo compartido en todos los individuos afectados, el cual no fue encontrado en ninguno de los cónyuges no relacionados y no afectados. Teniendo en cuenta que este padecimiento muestra baja penetrancia, todos los padres no afectados (sujetos 4001, 4004, 4030 y 4032) que tuvieron hijos afectados comparten el haplotipo ligado al padecimiento. El análisis del haplotipo afectado confirma el patrón de herencia autosómico dominante en esta familia (Fig. 36).

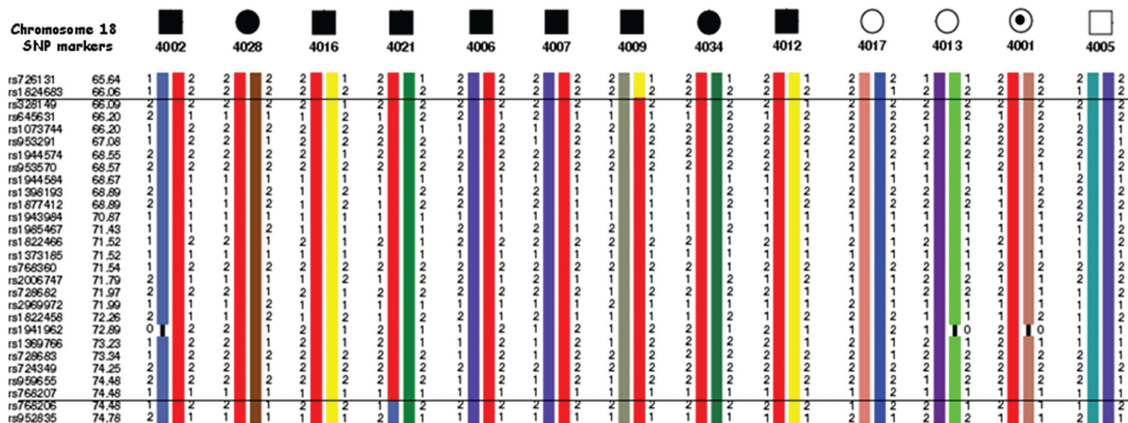


Fig. 36. Genotipos y haplotipos de marcadores de SNP de 18q21.1 de algunos individuos de la familia estudiada. Los haplotipos asociados a L/PH están marcados con rojo. El individuo 4001 es una portadora obligada puesto que tiene un hijo con el padecimiento y el correspondiente haplotipo (4002). Obtenido de la Ref. [Beiraghi S, et al, 2007].

3.4.4. Interacciones entre los genes y el ambiente.

Estudios epidemiológicos han demostrado un incremento en el riesgo de L/PH cuando hay exposición durante el embarazo con alcohol [Jones K.L, et al, 1973] y cigarro [Wyszynski D.F, et al, 1997]. Además, una gran cantidad de estudios sugieren que la suplementación periconcepcional de folatos o multivitamínicos tienen un efecto protector a tener hijos con L/PH [Presscot N.J, et al, 2002]; aunque cabe aclarar que no todas las madres que tuvieron esta suplementación tuvieron hijos normales. Por lo tanto, como ya se especificó previamente, existe una interacción entre ciertos genes y los factores ambientales, y la variación genética de éstos afecta el riesgo de L/PH.

Una vez que se obtuvo evidencia de que tanto los defectos de tubo neural como el L/PH pueden ser prevenidos por una suplementación de folatos en la dieta de las madres, se han llevado a cabo estudios en los cuales se evaluaron genes que participan en el ciclo de los folatos, entre éstos el gen *MTHFR*. Sin embargo, no se ha establecido claramente donde se tiene el mayor efecto, si en la madre o en el feto en desarrollo, puesto que no existe la misma interacción con los agentes externos. Se ha establecido la posibilidad de que el feto tenga un bajo riesgo de L/PH debido a sus genes, sin embargo, el riesgo aumenta a medida de la exposición a agentes ambientales por la madre y a su habilidad genética para la detoxificación [Lidral A.C, et al, 2008]. En el caso de los folatos, se cree que su deficiencia juega un papel indispensable en la etiología de la enfermedad. En un estudio que se llevó a cabo en California, se observó una reducción del 50% en el riesgo de ocurrencia para las hendiduras orofaciales en los hijos de las mujeres que tomaron ácido fólico antes y durante el embarazo, lo cual concuerda con otros estudios realizados [Finnel R.H, et al, 2004]. Una manera de probar la relación del ácido fólico con la disminución en la incidencia de L/PH, fue la realizada por un estudio en el cual se determinó un aumento en el riesgo de tener hijos con este padecimiento en aquellas madres bajo tratamiento con antagonistas de los folatos (como algunos anticonvulsivantes) comparando con el menor riesgo observado en aquellas madres con una suplementación adecuada de ácido fólico. Lo anterior también se ha demostrado ampliamente mediante modelos animales, en los que el

mantenimiento de una dieta deficiente en folatos tiene como consecuencia que la descendencia tenga malformaciones, dentro de las cuales se encuentran las hendiduras orofaciales, similar a lo que se observa al administrar antagonistas de folatos. Por otra parte, se ha demostrado *in vitro* que cuando se agrega ácido fólico en el medio, éste promueve la fusión palatina [Finnel R.H, et al, 2004]. Defectos severos craneofaciales se han observado en ratones genéticamente modificados que no tienen la habilidad de transportar los folatos.

Se ha descrito que existe una asociación entre las hendiduras y el consumo de folatos, basándose en que sus células comparten el origen embriológico que contribuyen al desarrollo del tubo neural y de las estructuras craneofaciales incluyendo la mayoría de los tejidos en los que están envueltos el cierre del labio y del paladar [Finnel R.H, et al, 2004]. Tal como se mencionó, las células del tubo neural son una población celular que responden de manera positiva tras una suplementación de ácido fólico, y debido a que comparten dicho origen embriológico, se ha establecido la hipótesis de que también puede participar en la prevención de las hendiduras orofaciales. Sin embargo, el epitelio oral y las células mesenquimales que facilitan el cierre del labio y el paladar se encuentran en rápida división, por lo que requieren una adecuada reserva intracelular de folatos y un mecanismo eficiente para la asimilación de los folatos.

Dentro de los genes relacionados con el ciclo de los folatos, el más estudiado, (al igual que en otras áreas) es el gen *MTHFR*, y en particular la variante *C677T*. Sin embargo, se han obtenido resultados contradictorios, en los cuales en algunas poblaciones se ha encontrado asociación con el L/PH y en otras no, que se ha justificado principalmente a la heterogeneidad en la distribución de esta variante, así como en la diferencia que existe respecto a los factores nutricionales principalmente. Dentro de los sujetos que son objeto de estudio se encuentran los pacientes (para investigar el efecto de esta variante sobre el fenotipo), y su madre (para investigar el efecto de esta variante y los niveles de homocisteína en el desarrollo de L/PH). Estos son los que estudian principalmente, ya que defectos en las células germinales del padre se asocian principalmente a infertilidad y a otras aberraciones más severas. Los estudios también se han enfocado en establecer el efecto protector de la administración

periconcepcional de ácido fólico en los hijos de las madres con esta variante (así como también cuando el hijo tiene la variante mutada) para reducir el riesgo a L/PH. También se ha estudiado la influencia de esta variante junto con otros factores de riesgo como el humo del cigarro, así como con la deficiencia de folatos, lo cual en la mayoría de los casos ha tenido una asociación positiva.

Se han identificado también una gran variedad de genes implicados en la detoxificación de compuestos encontrados en el humo del tabaco, dentro de los cuales se incluyen deleciones en los genes glutatión s-transferasa (como *GSTT1* y *GSTM1*). Las madres fumadoras con el alelo nulo del *GSTT1* tienen un alto riesgo de tener hijos con L/PH, mientras que aquellas que tienen deleciones en ambos genes, su riesgo aumenta hasta 6 veces [Lidral A.C, et al, 2008].

3.4.5. Situación en México del L/PH.

Al igual que en otras poblaciones, el labio y paladar hendido son las malformaciones congénitas más frecuentes de todas las anomalías faciales, tiene una incidencia de 1 por cada 800 o 1000 nacidos vivos y ocupa uno de los primeros lugares entre todas las malformaciones congénitas. Debido a los costos que requieren las cirugías reconstructivas y a las condiciones económicas en las que se encuentran la mayoría de las personas atendidas en instituciones dependientes del Sector Salud, éstos pacientes tienden a tener dificultades en la lactancia, fonación nasal, infecciones del oído (por el escaso desarrollo de los músculos palatinos necesarios para abrir las trompas de Eustaquio) y desafortunadamente un rechazo familiar generalmente cuando se desconocen los antecedentes familiares [Gómez R, et al, 2008]. En un estudio en el cual se recopilaron los datos del Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica correspondientes del 2003 al 2006, se obtuvieron las tasas de este padecimiento para cada entidad federativa, en los cuales durante este período no hubo una diferencia significativa en la frecuencia de los casos.

Por la información que se tiene sobre la patología, los genes relacionados y la participación del ambiente, el presente estudio tiene por objetivos determinar la

prevalencia del polimorfismo *C677T* del gen *MTHFR* en 27 pacientes diagnosticados con L/PH y sus madres, realizar un análisis estadístico para determinar si existe alguna relación significativa entre el genotipo y el fenotipo y establecer si existe una asociación entre el polimorfismo y la patología. Además, considerando el marco teórico descrito, se evaluará la hipótesis de que la presencia del genotipo *677TT* en población mexicana, sobretudo en madres, esté asociado a que los hijos presenten L/PH, teniendo un impacto mayor en el fenotipo más severo.

III. Metodología

4.1. Población de estudio.

El estudio se llevó a cabo en 27 pacientes con labio/paladar hendido y sus madres, que acudieron a consulta de genética en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

4.1.1. Criterios de selección.

Se consideraron como criterios de inclusión al presente estudio los siguientes puntos:

- Aquellos pacientes con diagnóstico de L/PH no sindrómico y sus madres, con previa aceptación para participar en el estudio y firma de una carta de consentimiento informado.
- Que no existiera alguna contraindicación para la toma de muestra y que los individuos no hubieran sido transfundidos en los tres meses previos a la misma.

Por otra parte, se consideraron como criterios de exclusión los siguientes puntos:

- Pacientes sin pretensión de participar en el estudio.
- Aquellos casos en los que el L/PH fue de tipo sindrómico.

4.1.2. Tamaño de la muestra.

Se analizaron muestras de 27 pacientes y sus respectivas madres. Cabe mencionar, que los individuos incluidos en el presente estudio, forman parte de

un protocolo mayor (HIM-012-2007), y la inclusión de los mismos, se llevó a cabo con la respectiva autorización por parte del Departamento de Genética del HIMFG, y de su titular, la Dra. Constanza García Delgado. El trabajo que inició este proyecto mayor, forma parte de la tesis para obtener el grado de Especialidad en Genética de uno de los residentes de dicho Departamento [Peña I.M, 2008]. Los pacientes reclutados fueron provenientes de la Ciudad de México y área metropolitana, los cuales fueron de un rango de edades desde recién nacidos hasta individuos con 16 años.

4.2. Toma de muestra.

Una vez que fueron confirmados los diagnósticos correspondientes, y cumplidos los criterios de selección, se tomó una muestra de 5 mL de sangre periférica en un tubo vacutainer con EDTA como anticoagulante a cada paciente y su madre, y fueron trasladadas al Departamento de Genética del HIMFG para la extracción de DNA genómico. Posteriormente las muestras se colocaron a 4°C para su conservación.

4.3. Extracción de DNA genómico.

La extracción de DNA genómico a partir de las muestras obtenidas en el paso anterior, se llevó a cabo por el método de lisis celular con detergentes aniónicos, el cual corresponde a un kit comercial (Qiagen). La técnica consiste en los siguientes puntos:

1. Lisis de glóbulos rojos. Este punto se basa en la sensibilidad de los eritrocitos a soluciones hipotónicas. Estos se quieren eliminar debido a que no tienen núcleo y por lo tanto DNA. Consta de los siguientes pasos:
 - Se agregan 300 μ L de sangre periférica en un tubo con 900 μ L de la solución de lisis para glóbulos rojos, para posteriormente

mezclar e incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente, invirtiendo el tubo varias veces durante la incubación.

- Centrifugar durante 20 segundos a 13000 revoluciones por minuto (r.p.m.). Se elimina el sobrenadante teniendo la precaución de no eliminar el pellet formado.
- Agitación con vórtex para resuspender el pellet.

2. Lisis celular. En este punto se lleva a cabo la lisis de los leucocitos presentes en la suspensión resultante del paso anterior para liberar los componentes celulares. Consiste en un sólo paso, en el cual se agregan 300 μ L de la solución de lisis celular y se resuspende utilizando la pipeta hasta obtener una solución homogénea. Esta solución consiste en una mezcla de detergentes aniónicos, los cuales disuelven los lípidos que constituyen la membrana celular sin interaccionar con las moléculas de DNA.

3. Precipitación de proteínas. En este punto, se agrega al tubo anterior, solución de precipitación de proteínas, la cual como su nombre lo indica se encarga de precipitar las proteínas presentes, y de esta manera, tener el DNA lo más puro posible, ya que durante los posteriores ensayos una contaminación de proteínas puede repercutir en los resultados. Consta de los siguientes pasos:

- Se agregan 100 μ L de la solución de precipitación proteica al lisado celular.
- Se agita vigorosamente en vórtex a máxima velocidad durante 30 segundos.
- Se centrifuga a 13000 r.p.m. durante 1 minuto, observando la presencia de un precipitado café.

4. Precipitación de DNA. Basándose en la solubilidad del DNA en distintos solventes, se llevan a cabo los siguientes pasos:

- El sobrenadante del paso anterior se transfiere a un tubo nuevo que contenga 300 μL de isopropanol, se mezcla por inversión durante 50 segundos asegurándose de la formación de una maraña (que corresponde al DNA) y se centrifuga durante 1 minuto a 13000 r.p.m.
- Se decanta el isopropanol y se agregan 300 μL de etanol al 70% para lavar el DNA. Se centrifuga a 13000 r.p.m. durante 1 minuto y se decanta el etanol cuidando que el pellet no se elimine.
- Se colocan los tubos en un desecador a velocidad media durante 15 minutos para eliminar los restos de los solventes anteriormente mencionados.

5. Hidratación del DNA. Se resuspende el DNA obtenido del paso anterior en 50 μL de solución de hidratación y se incuba durante 1 hora a 60°C para su posterior cuantificación y verificación de la integridad.

4.4. Cuantificación e integridad del DNA.

4.4.1. Cuantificación.

La determinación espectrofotométrica de la absorbancia a 260 y 280 nm de una solución de DNA, permite conocer la concentración y pureza del mismo. De esta manera, la lectura a 260 nm permite calcular la concentración de DNA en la solución (ya que presenta una absorción máxima a esta longitud de onda), teniendo en cuenta que 1 unidad de densidad óptica (DO) corresponde a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para DNA de doble cadena, además de que se cumple la ley de Lambert y Beer. La relación de la lectura a 260 nm entre la lectura a 280 nm,

proporciona un estimado de pureza de la muestra, ya que muchos de los contaminantes como proteínas y, RNA y DNA de una sola cadena presentan un pico máximo de absorción a 280 nm. Por lo tanto, un rango de pureza entre 1.8 y 2.0, indica que el DNA está libre de contaminantes celulares, y conforme se obtienen valores menores a 1.75, indica la presencia de proteínas principalmente; sin embargo, en muchos ensayos como en el caso de PCR se indica que se pueden obtener valores hasta de 1.65 para obtener resultados óptimos. La concentración de DNA depende de la aplicación para la cual se va a utilizar el mismo, ya que en el caso de la PCR se requiere por lo general una cantidad de 50 ng por reacción [Ausubel F.M, et al, 1991].

En el presente trabajo se utilizó un equipo denominado NanoDrop®, en el cual se deposita la muestra sin diluir en el detector, y está acoplado a un Software el cual hace los cálculos automáticamente y los muestra en pantalla. Los pasos a seguir son los siguientes:

1. Acceder al programa ND-1000 V3.2.1 y escoger la opción de ácidos nucleicos.
2. Cargar 2 μ L de agua inyectable y escoger la opción continuar.
3. Limpiar ambos lentes con agua inyectable y colocar 2 μ L para el blanco. Realizar la medición para el blanco.
4. Colocar la muestra, escribir el nombre de la misma, y realizar las mediciones.

4.4.2. Integridad.

Esta prueba se lleva a cabo para visualizar que tan íntegro se encuentra el DNA extraído, ya que si se tiene un DNA muy degradado, existe una alta probabilidad de que las secuencias blanco de estudio estén afectadas y no se obtengan resultados confiables, y que incluso, no se amplifiquen las mismas en el caso de la PCR. Lo anterior se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, cuya concentración se utiliza para fragmentos mayores a 1 kb, como lo es el caso del DNA genómico.

La electroforesis en gel de agarosa es un método empleado para separar moléculas de DNA y RNA basándose en su tamaño. Lo anterior, se lleva a cabo por el desplazamiento de las moléculas de ácidos nucleicos con carga negativa a través del gel de agarosa por un campo eléctrico, donde las moléculas más pequeñas se mueven más rápido y migran más lejos hacia el polo positivo que las más grandes.

Los pasos a seguir empleados para determinar la integridad de las muestras extraídas fueron los siguientes:

1. Se disuelve 1 g de agarosa en 100 mL de solución amortiguadora TBE 1X (Tris-boratos-EDTA), el cual es utilizado sobretodo para separar fragmentos menores a 1 kb (concentración final, 1%). Para poder llevar a cabo este paso es necesario calentar la suspensión resultante al agregar la agarosa, de esta manera, se funde la agarosa hasta formar una solución homogénea.
2. A la solución anterior, se le agrega 1 μ L de bromuro de etidio (0.5 mg), el cual es un colorante fluorescente que se intercala entre las bases del DNA y se puede visualizar con luz UV.
3. Lo anterior se coloca en un molde con peines, los cuales van a formar los pozos, dejándolo polimerizar durante 50 minutos.
4. El gel resultante se coloca en una cámara de electroforesis y se le quitan los peines. Se agrega solución de buffer TBE 1X hasta cubrir completamente el gel de agarosa.
5. Se mezclan 5 μ L de la solución con DNA con 1 μ L del buffer de carga, el cual permite que la muestra tenga el mismo pH que el buffer de la cámara, le da mayor densidad a la muestra para que se dirija al fondo del pozo y permite visualizar el nivel aproximado de las muestras debido a que tiene un colorante. La anterior mezcla se pipetea en los pozos del gel. Debe de colocarse además, una escalera de peso molecular, la cual permite establecer un aproximado del tamaño del fragmento visualizado.
6. Una vez colocadas todas las muestras y el marcador de peso molecular, se procede a conectar la cámara con una fuente de poder, la cual

aplicará un campo eléctrico para que el DNA migre hacia el ánodo. Se aplica un voltaje de 100 Volts durante 90 minutos.

- Una vez concluido el paso anterior, se coloca el gel en una cámara donde se va a tomar la fotografía del mismo aplicando luz UV, y de esta manera, se evalúa la integridad del DNA extraído.

4.5. Identificación de la variante C677T.

Para la identificación del genotipo respecto a esta variante del gen *MTHFR*, se utilizaron los oligonucleótidos (Tabla 7) y la enzima *HinfI* publicados por Frosst, para la PCR y restricción, respectivamente [Frosst P, et al, 1995]. Los anteriores se muestran en la figura 37.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la PCR.

<i>Oligonucleótido</i>	<i>Secuencia (5'-3')</i>	<i>Longitud (pb)</i>	<i>%GC</i>	<i>Tm (°C)</i>
Forward (hacia adelante)	TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA	23	56.52	67.20
Reverse (reverso)	AGGACGGTGCGGTGAGAGTG	20	65.00	66.01

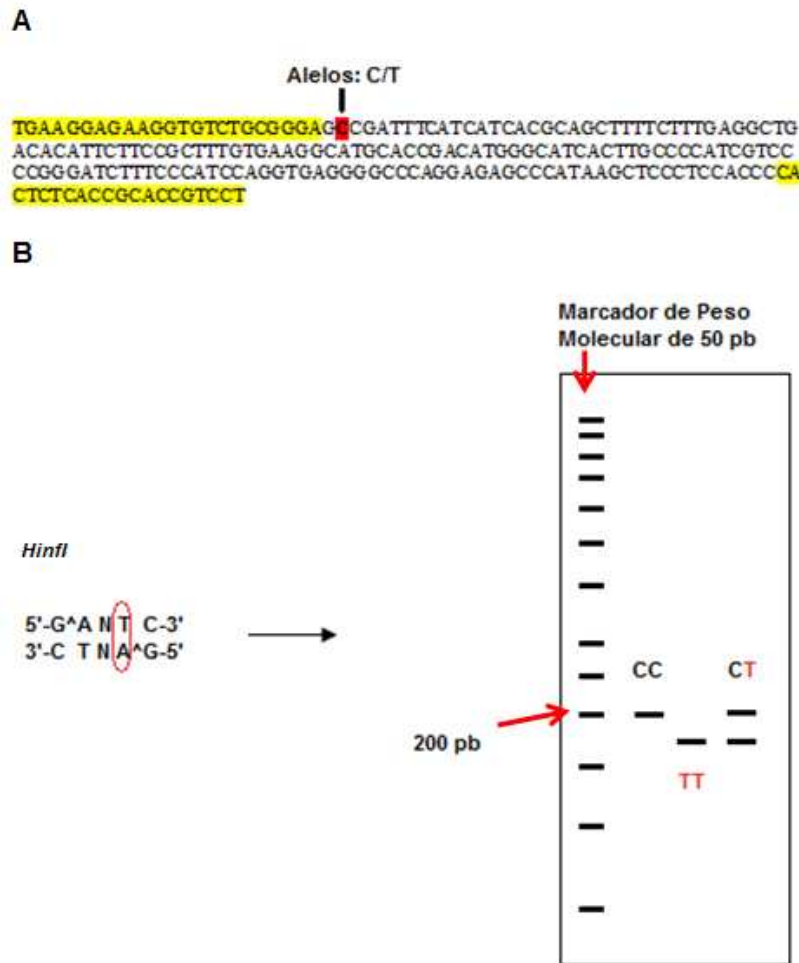


Fig. 37. Principio de la genotipificación de la variante C677T. A- Producto de amplificación de acuerdo a los oligonucleótidos (color amarillo) publicados por Frosst, de 198 pb. Esta secuencia blanco es parte del exón 5 del gen *MTHFR*. Se muestra el sitio de la variante C677T (color rojo). B- Sitio de reconocimiento y corte de *Hinfl*, fragmentos esperados con el corte producido en el amplicón obtenido por la PCR que corresponden a dos fragmentos de 176 pb y 22 pb; la variante está señalada en un círculo de color rojo. CC, homocigoto para el alelo silvestre; TT, homocigoto para el alelo mutado; CT, heterocigoto. Secuencia obtenida de www.ensembl.org.

4.5.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descrita por Kary Mullis en 1985 y por la cual recibió el Premio Nobel de Química en 1993, es un proceso enzimático en el cual, una región específica del DNA es replicada una y otra vez para producir muchas copias de una secuencia particular. Además de ser de particular interés en la identificación de polimorfismos y mutaciones en diferentes genes, también tiene muchas otras aplicaciones en distintas áreas, como son: análisis de genes (clonación, secuenciación, expresión, regulación),

estudios de mapeo genético, diagnóstico clínico, identificación de individuos, estudios evolutivos, etc. Existen tres aspectos muy importantes que se deben cumplir idealmente para que la PCR sea exitosa: que el producto sea específico (el producto de amplificación corresponde sólo a la secuencia blanco), que la secuencia de la nueva cadena corresponda a la de la cadena molde y se tenga una mayor cantidad de producto con la menor cantidad de ciclos. Para cumplir estos aspectos, es importante estandarizar las condiciones de la PCR, teniendo en cuenta la función de cada reactivo y fase de la misma.

Las fases de la PCR son las siguientes:

1. Desnaturalización. En esta fase se lleva a cabo la ruptura de los puentes de hidrógeno de la doble cadena del DNA. Generalmente se aplica una temperatura de 94°C a 96°C.
2. Alineación. Es el paso crítico de la reacción, ya que de ésta depende principalmente obtener una especificidad y eficiencia adecuadas. Consiste en la unión de los iniciadores al DNA molde y por lo general corresponde a una temperatura menor a la T_m de los oligonucleótidos, sin embargo, depende de la composición de bases, la concentración de los oligonucleótidos y el ambiente iónico.
3. Extensión. En esta fase se lleva a cabo la síntesis de las nuevas cadenas de DNA. Por lo general se aplica una temperatura de 65°C a 72°C dependiendo de las condiciones requeridas por la polimerasa que se esté utilizando. En este paso, principalmente, es indispensable el tiempo, ya que los productos de mayor tamaño mejoran con tiempos de extensión largos, contrario a lo que sucede con los productos pequeños, basándose en que la polimerasa *Taq* inserta nucleótidos a una velocidad de 2000 nucleótidos por minuto.

Por otra parte, los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Buffer para PCR 10X. Contiene Tris-HCl (pH 8.4) y KCl. A parte de proveer un pH óptimo para la enzima, los cationes (como en este caso el potasio), se unen a los grupos fosfato del DNA y neutralizan sus cargas negativas. Lo anterior debilita las fuerzas de repulsión entre la cadena molde y el oligonucleótido, estabilizando su hibridación. Es un reactivo que depende del volumen de reacción.
- Mezcla de dNTP's. Consiste en una mezcla de los cuatro desoxinucleótidos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), los cuales van a formar parte de las nuevas cadenas de DNA. También es un reactivo que depende del volumen de reacción.
- Cloruro de Magnesio. Este catión divalente es un cofactor de la polimerasa. Este catión se une al DNA molde, a los oligonucleótidos y a los nucleótidos en la reacción, estabilizando este complejo formado. La concentración de este reactivo depende del volumen de reacción.
- Oligonucleótidos. Son moléculas complementarias a la cadena molde, de menor tamaño, que por lo regular son de 19 a 21 bases y delimitan la región que se quiere amplificar. Son independientes del volumen de reacción.
- Polimerasa *Taq Platinum*. Es una DNA polimerasa recombinante de *Thermus aquaticus*, a la que está unida un anticuerpo que bloquea su actividad a temperatura ambiente. Dicha actividad se restablece después del paso de desnaturalización a una temperatura de 94°C, permitiendo que justo a esta temperatura comience a trabajar la polimerasa, disminuyendo la probabilidad de formar productos inespecíficos y aumentando la sensibilidad, especificidad y rendimiento.
- DNA molde. Corresponde al DNA genómico de cada paciente.

Las condiciones para cada PCR fueron las siguientes:

Tabla 8. Condiciones para la PCR.

<i>Reactivos</i>	<i>Concentración inicial</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Volumen final para 10 µL de reacción (µL)</i>
Buffer para PCR	10X	1X	1.0
dNTP's	10 Mm	0.2 mM	0.2
MgCl ₂	50 mM	2.5 mM	0.5
Pol. <i>Taq platinum</i>	1 u/µL	1 u	1.0
Primer Forward	10 pmol/µL	7.5x10 ⁻⁷ pmol	0.75
Primer Reverse	10 pmol/µL	7.5x10 ⁻⁷ pmol	0.75
DNA	-	50 ng	X
H ₂ O	-	-	p/llegar a 10.0

Las condiciones para la PCR en el termociclador fueron las siguientes:

Tabla 9. Condiciones para el termociclador.

<i>Paso</i>	<i>Fase</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo</i>
1	Desnaturalización inicial	95	5 min.
2	Desnaturalización	95	50 s.
3	Alineamiento	66	50 s.
4	Extensión	72	50 s.
Repetir 2-4 por 30 ciclos			
5	Extensión final	72	4 min.
6	Mantenimiento	4	-

Posteriormente se llevó a cabo una electroforesis, en la cual se asegura que se obtuvo el producto esperado. Lo anterior se realizó en un gel de agarosa al 2% durante 60 minutos a 100 Volts, utilizando un marcador de 100 pb y corriendo un negativo que corresponde a la mezcla de los reactivos sin DNA.

4.5.2. Longitud polimórfica del fragmento de restricción.

La técnica de longitud polimórfica del fragmento de restricción (RFLP) se emplea para el análisis de productos de PCR mediante el empleo de enzimas de restricción. Este método se puede emplear cuando la diferencia de dos alelos coincide con la presencia de un sitio de restricción, ya sea porque es parte del sitio de corte o del sitio de reconocimiento (Fig. 37). Este corte alelo-específico se lleva a cabo por endonucleasas de restricción, las cuales reconocen una secuencia de DNA que se caracteriza por ser específica y palíndrome. Aquellas moléculas que tengan el sitio de reconocimiento intacto

serán cortadas, mientras que aquellas que tengan modificado dicho sitio no serán cortadas [Syvanen A.C, et al, 2001].

La enzima utilizada presenta un 100% de actividad a 37°C. Además del DNA y la enzima, se utiliza una solución de buffer que mantiene un pH de 8.5 y contiene Tris-HCl, MgCl₂, KCl y BSA, que proporcionan un ambiente iónico óptimo para la actividad de la enzima.

Las condiciones para la restricción fueron las siguientes:

Tabla 10. Condiciones para la restricción con *Hinfl*.

<i>Reactivos</i>	<i>Concentración inicial</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Volumen final para 20 µL de reacción (µL)</i>
Buffer R	10X	1X	2.0
<i>Hinfl</i>	10 u/µL	1 u	0.1
DNA	-	-	5.0
H ₂ O	-	-	12.9

Las condiciones de incubación fueron las siguientes:

Tabla 11. Condiciones de incubación.

<i>Paso</i>	<i>Fase</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo</i>
1	Incubación	37	3 h.
2	Inactivación	65	20 min.
3	Mantenimiento	4	-

Una vez que se llevó a cabo lo anterior, las muestras se corren por electroforesis en un gel de agarosa al 2.5 %, durante 3 horas a 80 Volts de acuerdo al procedimiento escrito en la parte de integridad del DNA, utilizando un marcador de 50 pb. Los fragmentos esperados se muestran en la figura 33, con lo cual se establece el genotipo respecto a la variante C677T del gen *MTHFR*.

4.6. Pruebas estadísticas.

Todas las pruebas estadísticas utilizadas se realizaron mediante la página www.openepi.com. (a menos que se especifique lo contrario). Las pruebas estadísticas que se llevaron a cabo en todos los casos fueron la de Chi cuadrada (cuya tabla de distribución se encuentra en el Apéndice 9.3) y Odds Ratio.

Se utilizó una tabla de filas por columnas (F por C) para la prueba de Chi cuadrada, la cual se emplea para probar una asociación entre variables con más de 2 valores, que en este caso fueron los 3 genotipos (del paciente y su madre), los 3 fenotipos (de los pacientes) y los 7 binomios. El resultado es una prueba de Chi cuadrada para ver si resultados difieren de los esperados de las sumas marginales.

La prueba de Odds Ratio se llevó a cabo utilizando una tabla 2 x 2, en la cual se colocan los valores obtenidos en los pacientes o sus madres y los valores de los controles para establecer si existe una asociación entre el genotipo y la patología, en este caso.

V. Resultados.

5.1. Población estudiada.

El fenotipo de los pacientes estudiados se distribuyó de acuerdo a la gráfica 38. Como se puede observar en dicha gráfica, el labio y paladar hendido unilateral es el más frecuente en la población estudiada y el labio hendido es el menos frecuente, lo cual concuerda con estudios previos [Peña I.M, 2008]. Es importante establecer que se consideraron éstos tres fenotipos debido a que, de esta manera, se puede relacionar con la severidad del mismo, donde el labio hendido es el menos severo, seguido del labio y paladar hendido unilateral, y finalmente el labio y paladar hendido bilateral es el fenotipo más severo. Los datos se encuentran en la tabla 12 y resumidos en la tabla 13.

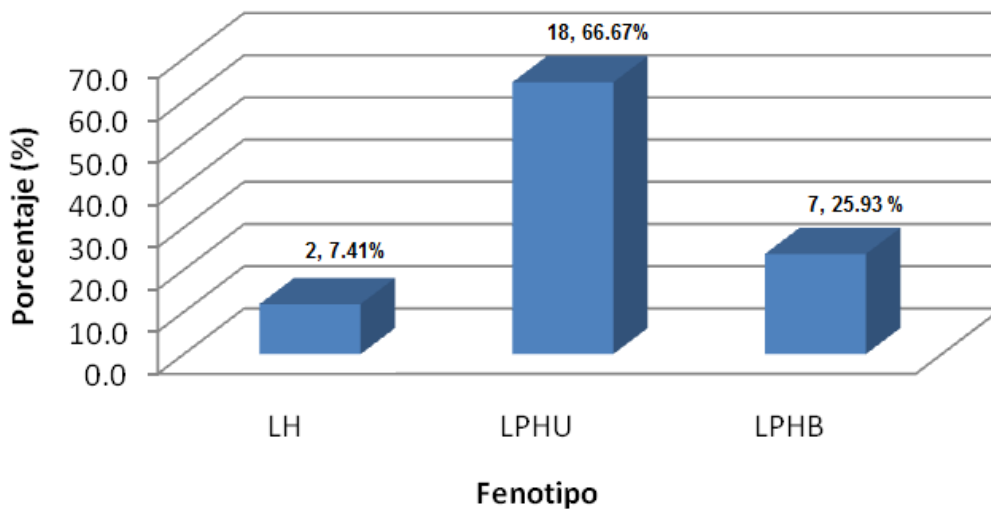


Fig. 38. Porcentajes de los distintos fenotipos observados en los pacientes diagnosticados con L/PH no sindrómico. De ahora en adelante, se mencionarán los fenotipos como se indica: LH, labio hendido; LPHU, labio y paladar hendido unilateral; LPHB, labio paladar hendido bilateral.

Se encontró que la frecuencia del sexo masculino en estos pacientes fue mayor, constituyendo dos tercios de la población estudiada. Esto concuerda con la literatura [Lidral A.C, et al, 2008], y se visualiza en la figura 39 (Tabla 12). Lo anterior concuerda con el fenotipo más severo (LPHB), lo cual será discutido más adelante.

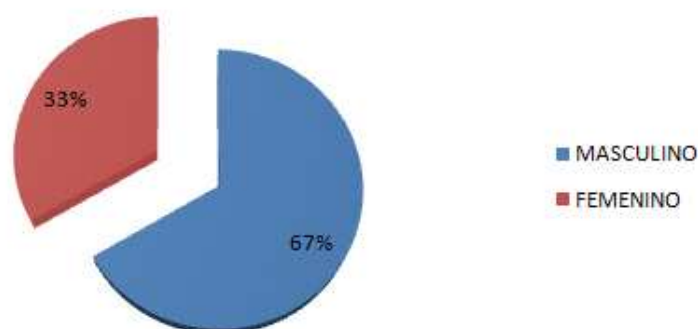


Fig. 39. Distribución del sexo de los pacientes diagnosticados con L/PH no sindrómico.

5.2. Cuantificación e integridad del DNA genómico.

La cuantificación e integridad del DNA extraído se muestra en la tabla 12 y la figura 40. Es importante mencionar que ninguna de las soluciones con el DNA extraído tuvo un valor de A_{260}/A_{280} menor a 1.65, así como también se obtuvieron concentraciones de DNA adecuadas para la PCR, aunque en algunos casos se realizó una dilución (por lo general 1:10), ya que en éstos la concentración de DNA obtenida fue muy alta. Por su parte, se determinó que la integridad del DNA fue adecuada, ya que no se observó degradación en las muestras al correrlas en el gel de agarosa.

Tabla 12. Cuantificación del DNA extraído. Se llevó a cabo mediante el Equipo Nano Drop® y su software correspondiente. A-pacientes, B-madres de pacientes.

Muestra	ng/ μ L	260/280	Muestra	ng/ μ L	260/280
1A	53.30	1.80	14B	19.30	1.82
1B	450.70	1.71	15A	46.40	1.67
2A	175.70	1.80	15B	50.10	1.68
2B	36.70	1.77	16A	54.00	1.75
3A	42.70	1.65	16B	39.80	1.69
3B	39.00	1.99	17A	37.20	1.76
4A	35.40	1.80	17B	34.20	1.65
4B	47.30	1.70	18A	80.20	1.86
5A	36.60	1.80	18B	37.10	1.65
5B	88.80	1.70	19A	80.60	1.69
6A	53.30	1.80	19B	59.50	1.66
6B	19.80	1.80	20A	29.10	1.82
7A	13.10	1.93	20B	43.60	1.69
7B	89.90	1.69	21A	40.20	1.70
8A	65.50	1.73	21B	121.00	1.84
8B	48.30	1.67	22A	17.60	2.01
9A	24.10	1.70	22B	8.20	1.81
9B	35.10	1.72	23A	44.00	2.01
10A	22.40	1.83	23B	148.50	1.88
10B	81.60	1.65	24A	184.20	1.72

11A	104.50	1.80	24B	103.90	1.68
11B	17.30	1.92	25A	157.80	1.87
12A	85.20	1.65	25B	121.20	1.79
12B	60.20	1.73	26A	45.40	1.87
13A	104.20	1.75	26B	102.80	1.90
13B	91.50	1.68	27A	102.44	1.88
14A	33.90	1.74	27B	14.60	1.69

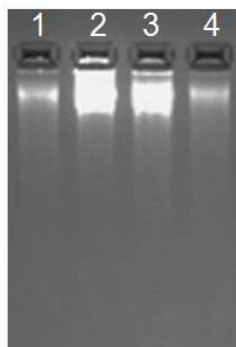


Fig. 40. Evaluación de la integridad del DNA extraído. La electroforesis para asegurar la integridad se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1% aplicando 100 Volts durante 90 minutos. 1-1A, 2-1B, 3-2A, 4-2B.

5.3. Genotipificación y análisis molecular.

Los productos de la PCR y restricción se visualizaron con luz UV, tal como se muestra en la figura 41. Cabe mencionar, que debido a que se realizó la electroforesis en gel de agarosa, no se visualiza el fragmento de 22 pb debido a su menor tamaño a comparación de las otras bandas observadas, ya que migra mucho más rápido e incluso sale del gel. Para visualizar el fragmento anterior se requiere de un gel de poliacrilamida, ya que éste se utiliza para visualizar fragmentos de DNA menores a 500 pb (incluso puede resolver fragmentos con la diferencia de 1 pb bajo las condiciones adecuadas), debido a que los poros formados son mucho más pequeños que aquellos que se forman en los geles de agarosa. Sin embargo, lo anterior no se llevó a cabo debido a que es más sencillo trabajar con geles de agarosa, a que no se requiere de una cámara especial para electroforesis y a que la genotipificación se puede realizar sin la necesidad de observar el fragmento de 22 pb, ya que al observar el fragmento de 176 pb se asegura que la endonucleasa realizó el corte y por lo tanto se establece que existe la presencia del alelo mutado (Fig. 41).

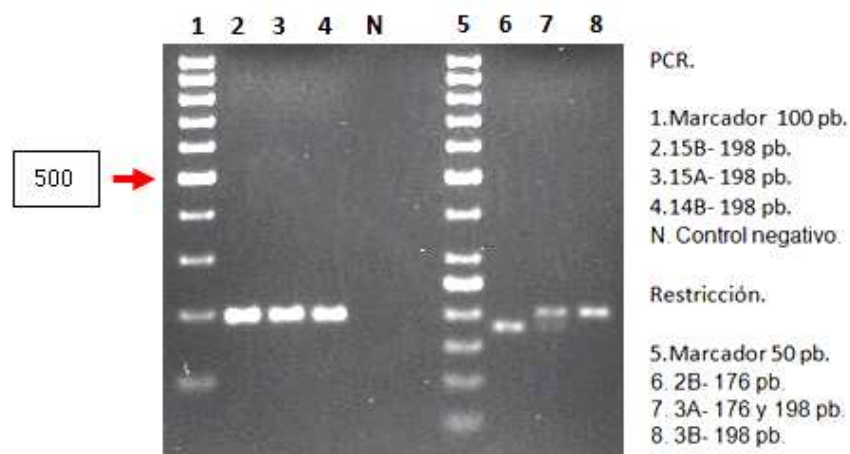


Fig. 41. PCR y restricción de tres individuos estudiados en los que se muestran los tres genotipos posibles. Como se mencionó anteriormente, no se visualiza el fragmento de 22 pb, sin embargo, con los fragmentos observados se puede llevar a cabo la genotipificación de la variante *C677T* del gen *MTHFR*. El genotipo de los individuos es: 2B, TT; 3A: CT; 3B: CC.

Los resultados obtenidos experimentalmente se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 13. Resultados experimentales. Análisis genotípico de la variante *C677T* del gen *MTHFR* en 27 pacientes diagnosticados con L/PH y sus madres. A-pacientes, B-madres pacientes, M-masculino, F-femenino.

No.	DIAGNOSTICO	SEXO	RESULTADO	No.	DIAGNOSTICO	SEXO	RESULTADO
1 ^a	LPHU	M	TT	15A	LPHU	M	CC
1B	Sana	-	TT	15B	Sana	-	CC
2 ^a	LPHB	F	TT	16A	LPHB	M	CT
2B	Sana	-	TT	16B	Sana	-	TT
3 ^a	LPHU	F	CT	17A	LPHU	F	TT
3B	Sana	-	CC	17B	Sana	-	CT
4 ^a	LPHU	M	CT	18A	LPHU	M	CT
4B	Sana	-	CT	18B	Sana	-	CT
5 ^a	LPHU	M	CT	19A	LPHU	F	TT
5B	Sana	-	TT	19B	Sana	-	CT
6 ^a	LPHU	M	CT	20A	LPHU	M	CC
6B	Sana	-	CT	20B	Sana	-	CT
7 ^a	LPHB	M	CC	21A	LPHB	M	CT
7B	Sana	-	CT	21B	Sana	-	CT
8 ^a	LPHU	M	TT	22A	LPHU	F	CT
8B	Sana	-	TT	22B	Sana	-	CT
9 ^a	LPHU	F	CC	23A	LPHU	M	CT
9B	Sana	-	CT	23B	Sana	-	TT
10 ^a	LPHB	M	TT	24A	LH	M	TT
10B	Sana	-	TT	24B	Sana	-	CT
11 ^a	LH	F	CT	25A	LPHB	M	CC
11B	Sana	-	CT	25B	Sana	-	CT
12 ^a	LPHU	F	TT	26A	LPHU	M	CT
12B	Sana	-	TT	26B	Sana	-	CT
13 ^a	LPHU	M	CT	27A	LPHB	M	TT
13B	Sana	-	CC	27B	Sana	-	TT
14 ^a	LPHU	F	CT				
14B	Sana	-	CT				

La distribución del fenotipo de los pacientes y su genotipo se encuentra en la tabla 14 y en la figura 42, donde también se señala la frecuencia del alelo mutado. Como se puede observar, los resultados obtenidos no tienen una relación estadísticamente significativa, ya que al realizar la prueba de Chi cuadrada se obtiene una $P=0.72$, lo que indica que se acepta la hipótesis nula de que no existe dicha relación.

Tabla 14. Distribución del genotipo y fenotipo de los pacientes.

Fenotipo/genotipo	CC	CT	TT	Total	% Fenotipos	Frec. alelo T (%)
LH	0.00	1.00	1.00	2.00	-	-
%	0.00	50.00	50.00	100.00	7.41	-
LPHU	3.00	10.00	5.00	18.00	-	-
%	16.67	55.56	27.78	100.00	66.67	-
LPHB	2.00	2.00	3.00	7.00	-	-
%	28.57	28.57	42.86	100.00	25.93	-
TOTAL	5.00	13.00	9.00	27.00	-	-
% TOTAL	18.52	48.15	33.33	100.00	100.00	57.41

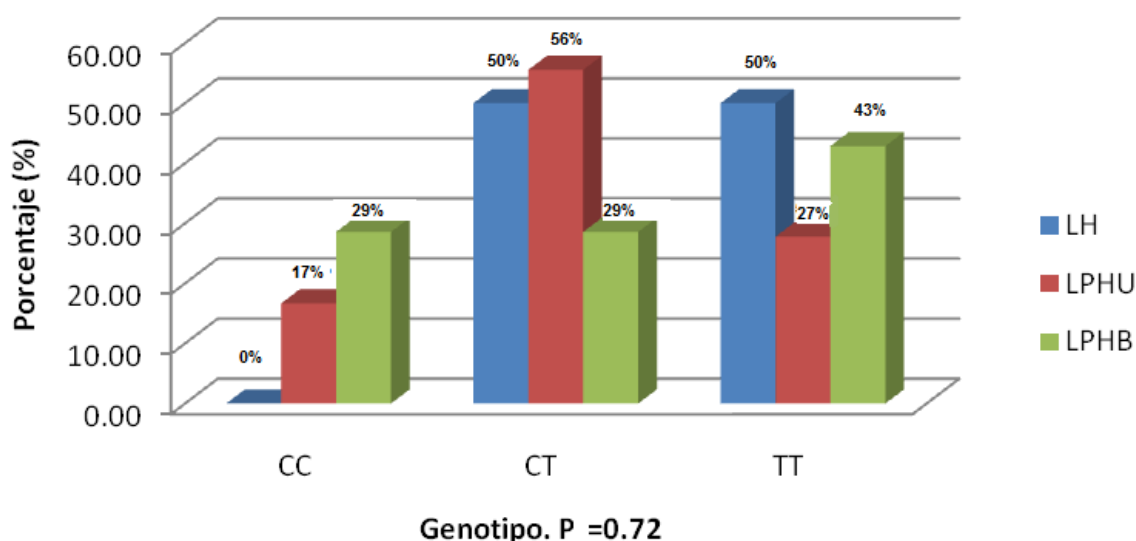


Fig. 42. Distribución del genotipo de la variante C677T del gen MTHFR en los pacientes con Labio/Paladar hendido no síndromico. De acuerdo a la prueba de Chi cuadrada no existe una relación estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos:

Análisis de Tabla F por C (Tabla 14). H_0 : las diferencias observadas entre los distintos genotipos y los fenotipos de los pacientes se deben al azar. H_a : existe una diferencia estadísticamente significativa entre el genotipo y el fenotipo de los pacientes. Nivel de significancia: $P \leq 0.05$. Grados de Libertad: 4. $\chi^2 = 2.073$. $P = 0.72$, por lo tanto se acepta H_0 .

Por otro lado, la distribución del genotipo de las madres y el fenotipo de los pacientes se encuentran en la tabla 15 y la figura 43. En la tabla 15 se incluyeron los datos de la población total estudiada, así como el porcentaje de los genotipos determinados para la misma; como se puede observar en ésta

tabla, la frecuencia alélica de la población estudiada es muy semejante a la obtenida en los dos grupos (madres y pacientes), además de que está en equilibrio de Hardy-Weinberg de acuerdo a la prueba de Chi cuadrada “Goodness of fit test”. Sin embargo, de acuerdo a la prueba de Chi cuadrada para los genotipos de las madres y el fenotipo de los pacientes, no existe una relación estadísticamente significativa. La razón de lo anterior, tanto para los pacientes como para las madres, se debe a que el tamaño de la muestra no es significativo, lo cual se sustenta con el hecho de que para el proyecto mayor se estableció un número de 92 individuos para que se obtuvieran resultados estadísticamente significativos [Peña I.M, 2008], además, en los datos por publicar del mismo proyecto (los cuales no se muestran), en los que se incluyen los resultados del presente trabajo y de la referencia [Peña I.M, 2008], se obtuvieron resultados similares pero estadísticamente significativos. Lo anterior también se aplica a los resultados posteriores del presente trabajo.

Tabla 15. Distribución del genotipo de las madres de los pacientes y el fenotipo de los pacientes.

Fenotipo/genotipo	CC	CT	TT	Total	Frec. alelo T (%)
LH	0.00	2.00	0.00	2.00	-
%	0.00	100.00	0.00	100.00	-
LPHU	3.00	10.00	5.00	18.00	-
%	16.67	55.56	27.78	100.00	-
LPHB	0.00	3.00	4.00	7.00	-
%	0.00	42.86	57.14	100.00	-
TOTAL	3.00	15.00	9.00	27.00	-
% TOTAL	11.11	55.56	33.33	100.00	61.11
TOTAL M-P	8.00	28.00	18.00	54.00	-
Frecuencia*	0.15	0.52	0.33	1.00	59.00

* Prueba de Chi cuadrada: 0.30

P = 0.86 (P > 0.05)

No existen diferencias significativas entre los genotipos observados y esperados, por lo tanto la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg.

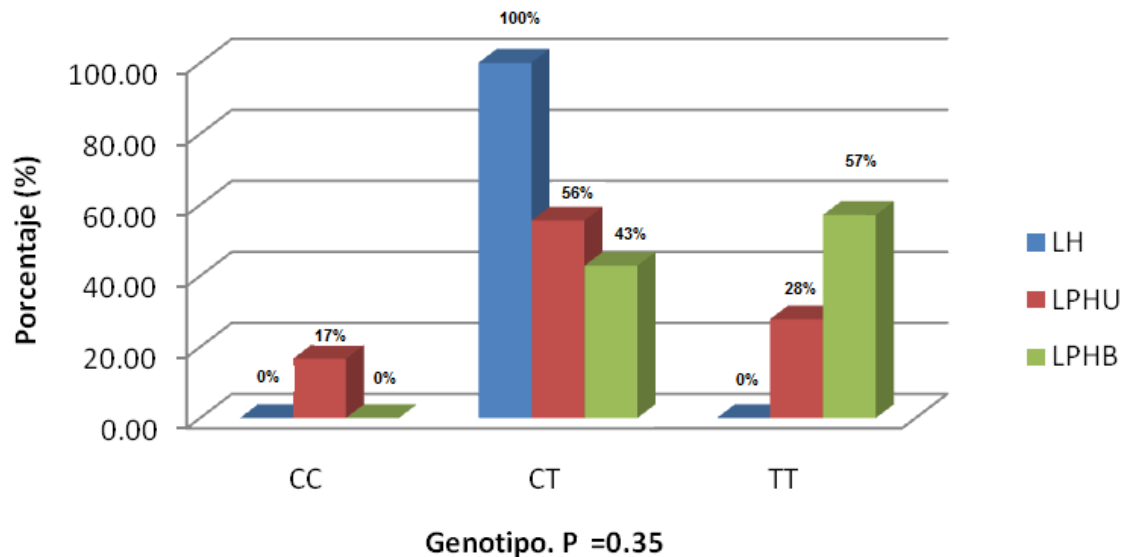


Fig. 43. Distribución del genotipo de la variante C677T del gen *MTHFR* en las madres de los pacientes con Labio/Paladar hendido no sindrómico y su relación con el fenotipo de los pacientes. De acuerdo a la prueba de Chi cuadrada no existe una relación estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos:

Análisis de Tabla F por C (Tabla 15). Ho: las diferencias observadas entre los distintos genotipos de las madres de los pacientes y los fenotipos de los pacientes se deben al azar. Ha: existe una diferencia estadísticamente significativa entre el genotipo de las madres de los pacientes y el fenotipo de los pacientes. Nivel de significancia: $P \leq 0.05$. Grados de Libertad: 4. $\chi^2 = 4.43$. $P = 0.35$, por lo tanto se acepta Ho.

La relación entre los genotipos determinados de los pacientes y sus madres, no fue estadísticamente significativa, ya que como se puede observar en la figura 44, se tienen frecuencias muy similares. Cabe mencionar que el alelo mutado es ligeramente más frecuente en las madres que en los pacientes, tal como se muestra en las tablas 14 y 15.

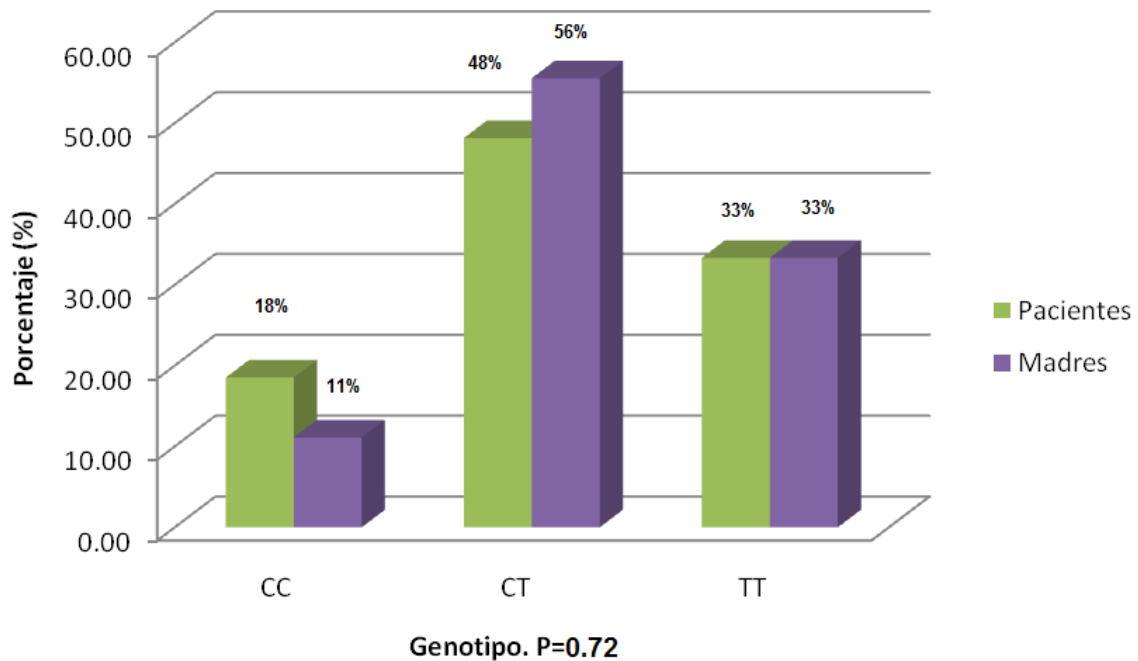


Fig. 44. Porcentaje de genotipos para la variante C677T del gen *MTHFR* en pacientes con Labio/Paladar Hendido no sindrómico y sus madres. De acuerdo a la prueba de Chi cuadrada no existe una relación estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos: Análisis de Tabla F por C (Tabla 14 y 15). Ho: las diferencias observadas entre los genotipos de los pacientes y sus madres se deben al azar. Ha: existe una diferencia estadísticamente significativa entre el genotipo de los pacientes y sus madres. Nivel de significancia: $P \leq 0.05$. Grados de Libertad: 2. $\chi^2=0.642$. $P=0.72$, por lo tanto se acepta Ho.

La relación establecida entre el polimorfismo C677T del gen *MTHFR* y el LP/H no sindrómico, se basa en la deficiencia enzimática de la MTHFR y a sus efectos asociados, la cual es provocada por la presencia del alelo mutante, sobretudo en estado homocigoto en el que se reduce hasta el 70% de la actividad enzimática. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, diversos estudios incluyen tanto al paciente como a la madre al estudiar este polimorfismo, ya que se trata de establecer si existe asociación entre el genotipo de la madre o el paciente con el padecimiento. Debido a los resultados obtenidos, se decidió utilizar el modelo del binomio, en el cual se establece la distribución de los distintos fenotipos considerando el genotipo de cada pareja (madre-hijo), tal como se muestra en la figura 45. A pesar de que no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos, se puede apreciar que en el caso del LPHB, la distribución de los binomios que tienen el alelo mutado en homocigosis es mayor que en los otros binomios, lo cual puede indicar que cuando madre e hijo son homocigotos para el polimorfismo C677T tiene repercusiones mayores en el fenotipo, ya que éste es el más severo.

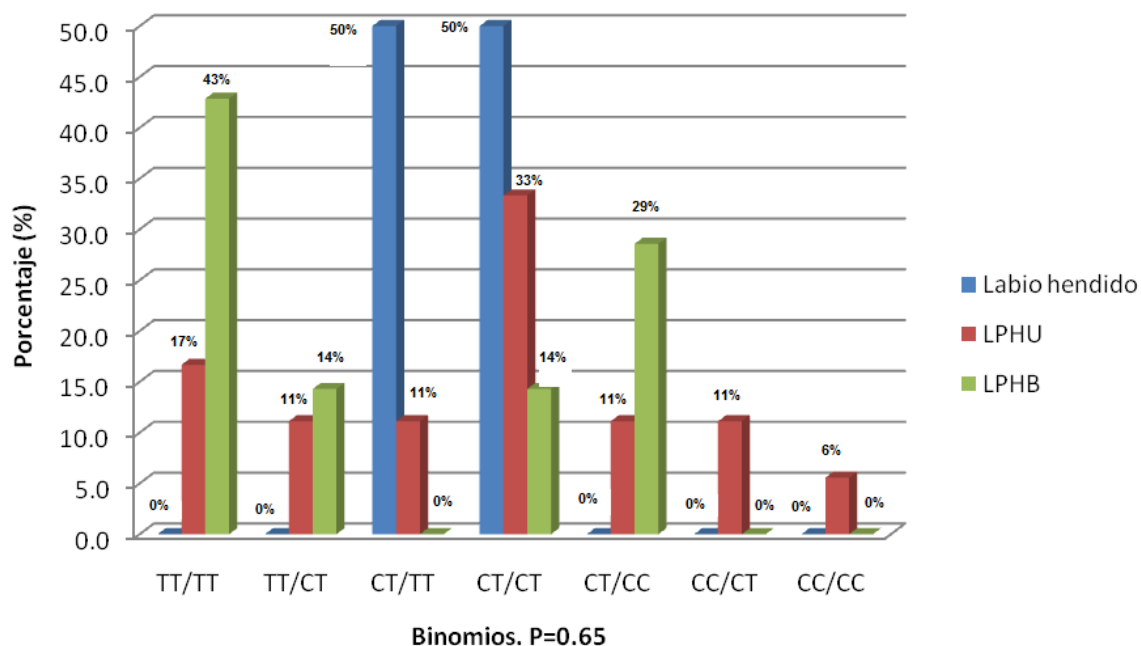


Fig 45. Distribución de los fenotipos en cada binomio madre-hijo. De acuerdo a la prueba de Chi cuadrada no existe una relación estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos:

Análisis de Tabla F por C (Tabla 13). Ho: las diferencias observadas entre los binomios y los fenotipos de los pacientes se deben al azar. Ha: existe una diferencia estadísticamente significativa entre los binomios y el fenotipo de los pacientes. Nivel de significancia: $P \leq 0.05$. Grados de Libertad: 12. $\chi^2 = 9.60$. $P = 0.65$, por lo tanto se acepta Ho.

Es importante mencionar que para establecer si existe una asociación de este polimorfismo con el L/PH no sindrómico, se hizo la comparación de los resultados obtenidos con la prevalencia del mismo en la población en general de la Ciudad de México, de acuerdo a lo publicado por Guéant-Rodríguez [Guéant-Rodríguez R, et al, 2006], ya que en el presente trabajo no se consideró el empleo de controles, de acuerdo a lo establecido por el Departamento de Genética del HIMFG. Sin embargo, hay que aclarar que esta población solo sirve de referencia para el presente trabajo, ya que no se puede establecer definitivamente si existe una asociación en caso de tener resultados significativos. Lo anterior se debe a que, a pesar de que en el estudio realizado por Guéant y colaboradores se establece que los sujetos incluidos fueron sanos y sin antecedentes de padecimientos genéticos, no se puede asegurar que su descendencia no tenga ninguna anomalía congénita (posterior a este estudio), ya que los individuos se encontraban en edad reproductiva (24 a 37 años). Para poder establecer si existe asociación entre este polimorfismo y el LP/H se requiere, principalmente, de controles que provengan de la misma

zona geográfica que los pacientes, considerar el estado social, nutricional y educacional, que las edades de las madres de los controles sean similares a las edades de las madres de los pacientes y que no tengan ningún familiar afectado en ningún grado de parentesco de consanguinidad.

Se comparó la frecuencia alélica del alelo T en ambas poblaciones, considerando que ambas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg [Guéant-Rodríguez, R, et al, 2006]. Como se puede observar, las frecuencias fueron muy similares, y al compararlas no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ($P=0.68$), de acuerdo a la prueba de Chi cuadrada, que fue el mismo resultado al estudiar las poblaciones de las madres y los pacientes por separado. Para determinar si existe la posibilidad de una asociación de los distintos genotipos con la patología estudiada, respecto a la referencia mencionada, se determinaron los Odds ratio, que están relacionados directamente con el riesgo relativo. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 16 y en las figuras 46 y 47, donde se puede observar que no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos debido al tamaño de la muestra de los casos, sin poder establecer si existe una posible asociación entre el genotipo y el padecimiento. Como se puede observar, en la tabla 16 se incluyeron por separado los resultados de las madres de los pacientes que tuvieron el fenotipo más severo, basándose en que en los resultados anteriores existe una mayor proporción de madres homocigotas para esta variante con hijos que presentan LPHB, además de probar la hipótesis de que el ambiente propiciado por la madre es el que mayor repercute en el fenotipo, debido al aumento de homocisteína plasmática. Sin embargo, tampoco se obtuvieron resultados significativos, aunque es importante señalar que los Odds Ratios obtenidos fueron los más altos.

Tabla 16. Odds ratio de los pacientes, sus madres y controles de la Ref. [Guéant-Rodríguez R, et al, 2006].

Genotipo	Proporción (#)	Valor P	O. R.	95% I.C.
Pacientes		LPH general/Controles		
CC	5 (27), 65 (300)	0.37	0.82	0.27, 2.16
CT	13 (27), 122 (300)	0.23	1.35	0.60, 3.02
TT	9 (27), 113 (300)	0.34	0.83	0.34, 1.89
Madres		LPH general/Controles		
CC	3 (27), 65 (300)	0.10	0.45	0.11, 1.42
CT	15 (27), 122 (300)	0.07	1.82	0.82, 4.12
TT	9 (27), 113 (300)	0.34	0.83	0.34, 1.89
Madres		LPHB/Controles		
CC	0 (7), 65 (300)	0.33	0.56	0.02, 3.81
CT	3 (7), 122 (300)	0.45	1.09	0.20, 5.38
TT	4 (7), 113 (300)	0.16	2.20	0.45, 11.98

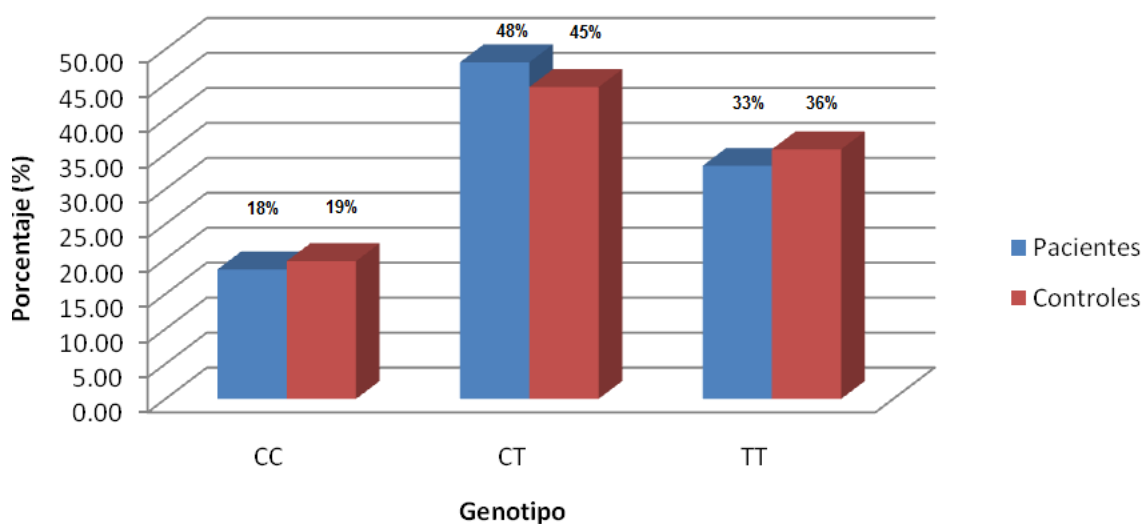


Fig. 46. Distribución de genotipos en los pacientes y los controles de la Ref. [Guéant-Rodríguez R, et al, 2006].

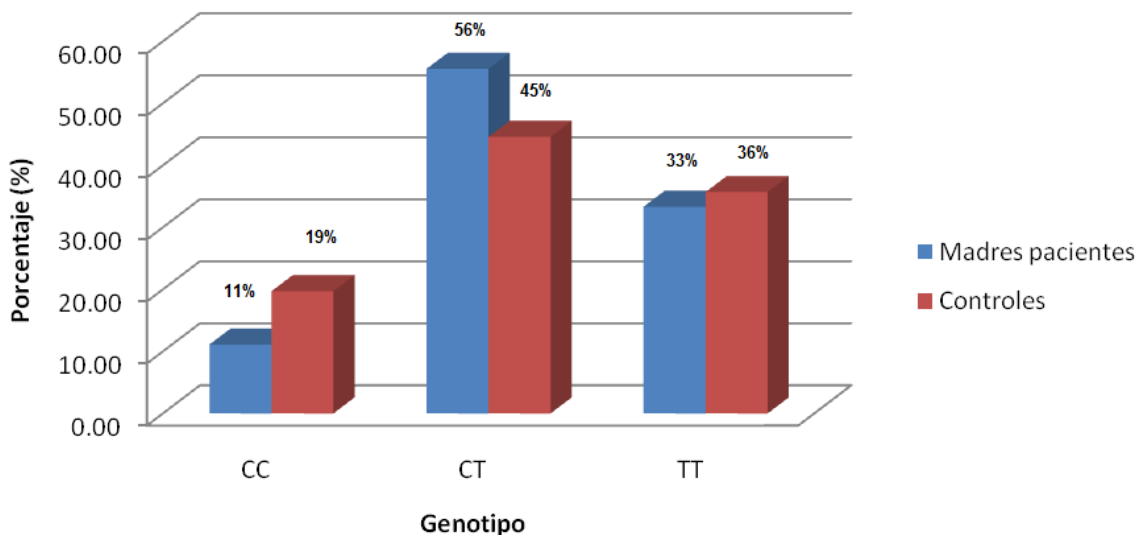


Fig. 47. Distribución de genotipos en las madres de los pacientes y los controles de la Ref. [Guéant-Rodríguez R, et al, 2006].

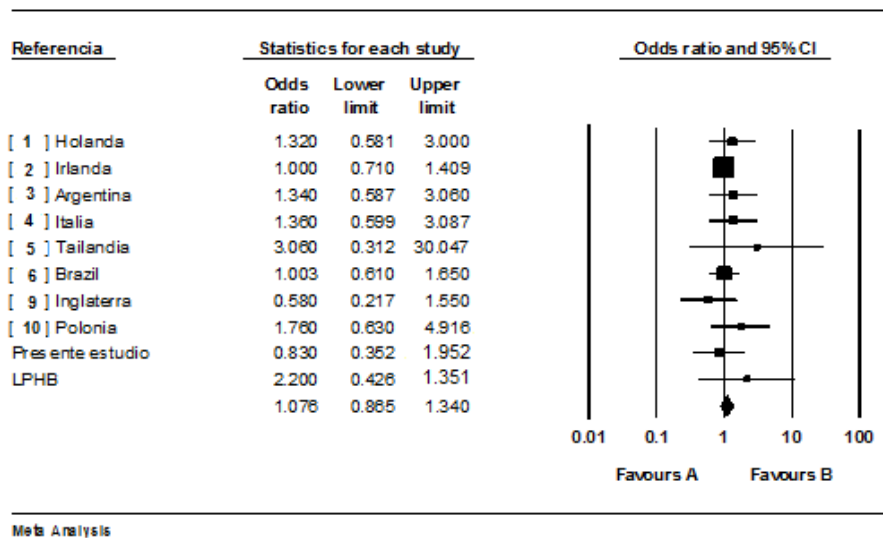
Considerando que la presencia de la variante *C677T* en estado homocigoto se ha asociado al LP/H en algunos países sobretodo con el genotipo de las madres, así como también que la presencia de este genotipo en el binomio madre e hijo muestra una posible asociación con el fenotipo más severo, a continuación se muestra un meta-análisis en el que se incluyen varios estudios en distintos países (Tabla 17 y 18). Lo anterior, se llevó a cabo tanto para las madres como para los pacientes, en el que al tomar en cuenta todos los datos no se obtuvo asociación. El meta-análisis se llevó a cabo mediante el software “Comprehensive Meta-analysis” Versión 2 (muestra de evaluación).

Tabla 17. Odds Ratio en distintos estudios de distintos países en cuanto al genotipo 677TT de pacientes y su posible asociación con el L/PH. 1-[Van Rooji I, et al, 2003], 2-[Mills J.L, et al, 2008], 3-[Tolarova M.M, et al, 1998], 4-[Martinelli M, et al, 2001], 5-[Shotelersuk V, et al, 2003], 6-[Gaspar D.A, et al, 1999], 7-[Shaw G.M, et al, 1998], 8-[Grunert R.R, et al, 2002].

Referencia	Statistics for each study			Odds ratio and 95% CI
	Odds ratio	Lower limit	Upper limit	
[1]Holanda	1.900	0.501	7.210	
[2]Irlanda	1.080	0.779	1.498	
[3]Argentina	2.519	1.030	6.163	
[4]Italia	1.200	0.523	2.755	
[5]Tailandia	0.922	0.041	20.871	
[6]Brazil	0.795	0.510	1.239	
[7]EUA	1.010	0.643	1.587	
[8]Alemania	0.610	0.210	1.773	
Presente estudio	0.830	0.352	1.952	
	1.028	0.841	1.256	

Meta Analysis

Tabla 18. Odds Ratio en distintos estudios de distintos países en cuanto al genotipo 6777T de las madres de los pacientes y su posible asociación con el L/PH. 1-[Van Rooji I, et al, 2003], 2-[Mills J.L, et al, 2008], 3-[Tolarova M.M, et al, 1998], 4-[Martinelli M, et al, 2001], 5-[Shotelersuk V, et al, 2003], 6-[Gaspar D.A, et al, 1999], 9-[Little J, et al, 2008], 10-[Motowska A, et al, 2006].



Finalmente, considerando la asociación de los niveles altos de homocisteína con la presencia del polimorfismo estudiado, sobretodo en individuos homocigotos, se puede establecer que la posible participación de este polimorfismo en la etiología de la enfermedad se debe a la alteración en los patrones de metilación del DNA, a la disminución de los folatos reducidos requeridos para la metilación de la homocisteína y al efecto teratogénico directo e indirecto de la homocisteína. Lo anterior se ha comprobado mediante diversos estudios mencionados anteriormente, sin embargo, es importante considerar particularmente, que el aumento de los niveles de homocisteína plasmática y homocisteína tiolactona pueden afectar a los productos proteicos mediante la formación de aductos con las mismas, lo cual puede conllevar a la alteración tanto en la estructura como en la funcionalidad de la proteína en cuestión [Lussier-Cacan et al, 1996; Jakubowski H, 1998; Jakubowski H, 1990]; además, si hay niveles altos de homocisteína intracelulares, estos aductos formados pueden inducir el estrés del retículo endoplásmico, el cual además de degradar las proteínas afectadas, puede aumentar la apoptosis en las células involucradas en la fusión del paladar o en cualquier otro proceso. Por lo tanto, esto es de particular interés en las proteínas que participan durante el desarrollo del labio y el paladar, ya que como fue señalado anteriormente, es

un proceso muy complejo y estricto en el que si existe alguna alteración en la señalización involucrada puede repercutir de una manera importante en el fenotipo. Los residuos a los cuales se incorpora principalmente la homocisteína tiolactona, son la lisina y la cisteína, formando ya sea un enlace del tipo de las amidas o formando un puente disulfuro, respectivamente, además, de que éste último es también el mecanismo por el cual la homocisteína forma un aducto con la cisteína.

Basándose en lo anterior, se analizaron las estructuras proteicas de 4 moléculas indispensables durante el desarrollo del labio y el paladar utilizando el software Ball View 1.2 [Moll A, et al, 2005] a partir de las estructuras presentes en el Protein Data Bank. En estas estructuras se muestran los residuos de lisina (en color amarillo) y cisteína (en color rojo), los cuales debido a su disposición espacial, pueden ser susceptibles a reaccionar con la homocisteína o la homocisteína tiolactona, formando posibles aductos que tengan como consecuencia, por ejemplo, la pérdida de actividad. Las estructuras incluidas corresponden a las proteínas SHH, MSX1, BMP2 y TGF β 3 (Fig. 48, 49, 50 y 51 respectivamente), sin embargo, esto puede ocurrir en cualquiera de los péptidos que participan en este proceso.



Fig. 48. Estructura molecular de SHH interaccionando con zinc y sulfato en el modelo de caricatura. Los residuos de lisina se encuentran en color amarillo y los de cisteína en color rojo. La estructura fue obtenida de DOI:10.2210/pdb1vhh/pdb.

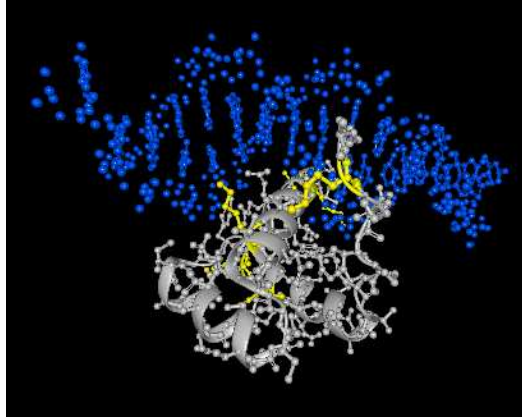


Fig. 49. Estructura molecular de MSX1 en el modelo de bolas y barras interaccionando con DNA de doble cadena en el modelo de bolas. Los residuos de lisina se encuentran en color amarillo observándose aquellos que se unen al DNA, mientras que este último se encuentra de color azul. La estructura fue obtenida de DOI:10.2210/pdb1ig7/pdb.

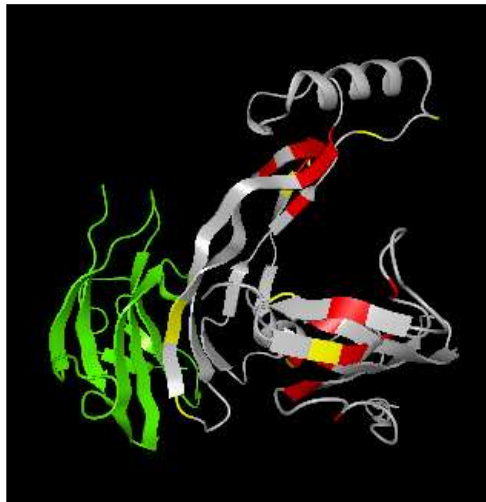


Fig. 50. Estructura molecular de BMP2 interaccionando con su ligando en el modelo de caricatura. Los residuos de lisina se encuentran en color amarillo y los de cisteína en color rojo, el ligando se encuentra de color verde. La estructura fue obtenida de DOI:10.2210/pdb2h64/pdb.

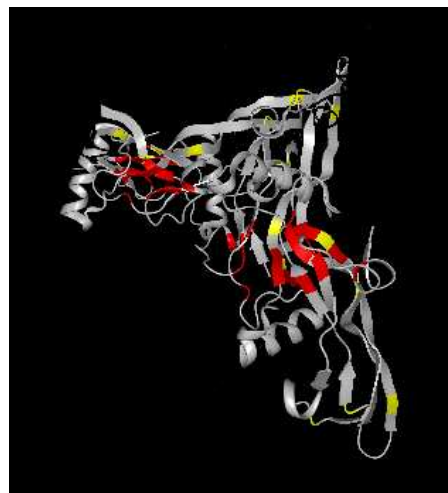


Fig. 51. Estructura molecular de TGFβ3 en el modelo de caricatura. Los residuos de lisina se encuentran en color amarillo y los de cisteína en color rojo. La estructura fue modificada de DOI:10.2210/pdb3eo1/pdb.

VI. Análisis de resultados

Se llevó a cabo la genotipificación tanto de los pacientes con L/PH como de sus madres de acuerdo a la variante *C677T* del gen *MTHFR*. El fenotipo de los pacientes reclutados para el presente trabajo fue prioritariamente el de LPHU, el cual como ya se mencionó anteriormente, es el más frecuente, contrario al LH que se presenta en el menor de los casos, de acuerdo a la clasificación utilizada. Lo anterior tiene una gran repercusión en la calidad de vida de los pacientes y económica para los padres, considerando la mayor frecuencia de los fenotipos más severos (respecto al LH).

Debido a que este padecimiento es multifactorial, se puede establecer que el fenotipo más severo (LPHB) es resultado, con un mayor impacto que en el LH, de la interacción de múltiples genes y el ambiente proporcionado por la madre, ya sea porque pueden estar involucrados una mayor cantidad de genes o aquellos que codifican para productos proteicos fundamentales en el desarrollo del labio y el paladar, así como al considerar la influencia del ambiente materno teniendo en cuenta, en este caso en particular, los niveles mayores de homocisteína que están asociados a la presencia del polimorfismo *C677T* del gen *MTHFR*, principalmente. También es importante considerar que el fenotipo menos severo se encuentra en menor proporción en el presente trabajo y en la población en general, debido posiblemente, a que es una variante con menor alteración del fenotipo normal y con menos implicaciones clínicas (en los casos menos severos), por lo que la cantidad de individuos que acuden a consulta es menor que en los otros dos fenotipos.

Como se puede observar en la figura 39, y de acuerdo a la tabla 13, la proporción de pacientes con sexo masculino con L/PH es mayor respecto a aquellos con el sexo femenino, lo cual es más evidente en el fenotipo más severo, en los que existe una mayor proporción de pacientes y madres con el genotipo homocigoto para la variante *C677T* que en las demás formas del padecimiento. Lo anterior, se puede deber a que individuos del sexo masculino tienden a tener en circulación niveles más altos de homocisteína que aquellos con el sexo femenino, en este caso, debido al posible efecto protector de los

niveles altos de estrógenos [Castro R, et al, 2004] que se presentan en el comienzo del desarrollo de los genitales externos femeninos y que ocurre en tiempo similar al desarrollo del labio y el paladar [Moore K.L, et al, 2009].

Es importante aclarar que las observaciones presentadas a continuación, referentes a la distribución de los distintos genotipos en la población estudiada, no son confiables, ya que los resultados obtenidos no fueron estadísticamente significativos por el tamaño de la muestra, además, de que posiblemente como consecuencia de lo anterior, no se pudo establecer si existe una asociación del genotipo y la patología. Sin embargo, se establecerá el análisis de los resultados obtenidos y lo que se esperaba encontrar.

En cuanto a los pacientes estudiados, el genotipo más frecuente fue el heterocigoto para la variante *C677T* seguido del homocigoto para la misma, lo cual concuerda con la población en general de la Ciudad de México, que será retomado más adelante. En el caso del labio hendido, únicamente se presentó en dos pacientes con genotipo *677CT* y *C677TT* cuyas madres fueron *677CT*, por lo que no se puede establecer ninguna deducción, ya que al ser el fenotipo menos severo, se esperaba que la mayoría de los pacientes y/o las madres fueran homocigotos para el alelo silvestre; por lo tanto, basándose en los resultados obtenidos, únicamente se puede establecer que los genotipos determinados forman parte de aquellos que son mas frecuentes en la población en general.

Retomando los resultados obtenidos en los pacientes, los genotipos *677CC* y *677TT* fueron más frecuentes en aquellos individuos con el LPHB respecto a aquellos con LPHU, lo cual es contradictorio basándose en la severidad del fenotipo. La razón de la observación anterior, se basa en que la frecuencia del genotipo homocigoto silvestre obtenida en estos pacientes, no concuerda con la mayoría de los estudios realizados en otros países, ya que incluso, se ha establecido que este genotipo tiene un efecto protector debido a que no se asocia a los efectos negativos provocados por el genotipo homocigoto para el alelo mutado. Por otro lado, el hecho de que la frecuencia del homocigoto mutante sea mayor en el fenotipo más severo, concuerda con los efectos

adversos que son producto de este genotipo (se retomarán más adelante), que es lo esperado.

Aunado a lo anterior, se puede observar que el genotipo heterocigoto es más frecuente en pacientes con LPHU, lo cual se puede deber a que ambas variables son las más frecuentes en la población estudiada. Lo anterior se puede sustentar con la distribución de los genotipos en estos pacientes, la cual es muy similar a la de la población en general.

De la misma forma que en los pacientes, las madres de éstos tuvieron una mayor frecuencia del genotipo heterocigoto para la variante estudiada. La distribución de este genotipo fue similar a la de los pacientes, coincidiendo también la distribución de los tres genotipos en aquellas madres con hijos con LPHU. Sin embargo, como se puede observar en las gráficas 42 y 43, la frecuencia del genotipo 677TT de las madres con hijos con LPHB es mayor que la observada en los hijos. Lo anterior puede confirmar la hipótesis de que existe mayor riesgo respecto a este padecimiento (y otras malformaciones asociadas) cuando la madre es homocigota para la variante mutada debido al ambiente que le proporciona al producto; lo anterior también se puede sustentar con el hecho de que no se determinaron madres homocigotas para el alelo silvestre de los hijos con LPHB, que como se mencionó anteriormente, incluso se asocia a un efecto de protección.

En los párrafos anteriores, se ha mencionado el efecto que puede provocar la presencia de este polimorfismo y su relación con el L/PH tanto en las madres como en los pacientes. Para esto, hay que considerar que en diversos estudios en los que se han incluido también madres y pacientes (sobretudo en aquellos que se enfocan en establecer la asociación de este polimorfismo en particular con malformaciones congénitas), se ha tratado de elucidar en cuál de los individuos el genotipo tiene mayor influencia sobre el fenotipo.

En el caso de los pacientes, se ha establecido que la influencia de este genotipo está relacionada principalmente con la alteración en los patrones de metilación del DNA (hipometilación) y con el aumento de los niveles de homocisteína, ambas asociadas a la disminución de folatos reducidos. En cuanto a la hipometilación del DNA, se asocia a la expresión de genes que

durante el desarrollo del labio y el paladar están estrictamente regulados, expresándose en momentos en los que no se requiere su producto proteico y que incluso puede provocar daños en el embrión; un ejemplo de lo anterior son los genes que codifican para proteínas de señalización para apoptosis, los cuales, al no ser inhibida su expresión, pueden provocar una destrucción anormal del tejido. Respecto a la homocisteína, como se especificó en el marco teórico, existen múltiples formas mediante las cuales la homocisteína produce sus efectos, ya sea por el estrés oxidante, la incorporación de la homocisteína y sus metabolitos en proteínas, el efecto clastógeno de sus metabolitos, el aumento de moléculas proinflamatorias, etcétera; los anteriores pueden causar su efecto ya sea en el DNA, los productos proteicos, y en células o tejidos que se estén desarrollando.

En cuanto a las madres, los efectos se asocian principalmente al estado nutricional de la misma, en especial al nivel de folatos, ya que como se estableció, tienen un efecto protector en aquellos individuos que tienen este polimorfismo al reducir los niveles de homocisteína y reestablecer los patrones de metilación (además de ser el sustrato para la metilación de la homocisteína) mediante la estabilización del complejo de la MTHFR con FAD evitando la pérdida de la actividad enzimática. Sin embargo, se ha demostrado que cuando se tiene niveles bajos de folatos y el genotipo 677TT, los niveles de homocisteína aumentan drásticamente al comparar con los sujetos con niveles adecuados de folatos y homocigotos para el alelo silvestre. Lo anterior conlleva a que dichos niveles altos de homocisteína provoquen los efectos de la homocisteína en el producto de gestación.

Para determinar lo anterior, se compararon los genotipos de las madres y los pacientes en cuanto al padecimiento en general (L/PH). La distribución de los genotipos no mostró una relación significativa, que se confirmó al comparar la frecuencia alélica que tampoco difiere significativamente en ambos grupos. Esto puede ser resultado de que no existe una posible asociación del polimorfismo con la patología.

Se realizó un estudio por binomios para establecer si existía una asociación entre el fenotipo y los genotipos de los pacientes y sus madres. Como ya se mencionó, y de acuerdo a la figura 45, existe una mayor prevalencia del

fenotipo más severo en el binomio $677TT/677TT$ a comparación de los otros fenotipos y que en los otros binomios, que se puede deber a la interacción de ambos genotipos y sus efectos asociados como la elevación de la homocisteína a niveles mayores que en aquellos binomios en los que sólo un individuo tiene el genotipo $677TT$ como en el binomio TT/CT . Basándose en lo anterior, se puede sugerir que en los pacientes estudiados, la interacción entre el genotipo de la madre y el paciente, es el factor que puede contribuir a la severidad del fenotipo, sin embargo, no se puede asegurar debido a la distribución de fenotipos del binomio CT/CC que mostró resultados similares. Lo anterior se puede confirmar con la presencia del fenotipo menos severo (LH) en el binomio CT/TT , en el que la presencia del alelo mutado en estado homocigoto no implica la presencia de los fenotipos más severos. En el binomio CT/CT se puede observar la distribución de los fenotipos de acuerdo a su frecuencia en la población estudiada (sin considerar el LH debido a que solo se está considerando una pareja que corresponde al 50% con éste fenotipo). Comparando los binomios TT/CT y CT/TT , se puede sugerir que cuando la madre es homocigota para el polimorfismo estudiado, existe un mayor efecto sobre el fenotipo, ya que en el segundo se encuentra una pareja que corresponde al fenotipo menos severo y no existe la presencia del fenotipo más severo a pesar de que el paciente es $677TT$, mientras que en el primer binomio (cuando la madre es $677TT$) está presente el fenotipo más severo. Respecto a los dos últimos binomios de la figura 45, únicamente se encuentran pacientes con LPHU, debido probablemente a que es el fenotipo más frecuente; sin embargo, se esperaba que el fenotipo menos severo se encontraría en el binomio CC/CC , debido a lo mencionado anteriormente. Por el contrario, el LH se encontró en los binomios que corresponden a los genotipos más frecuentes de acuerdo a la población estudiada. La distribución del LPHU fue similar a la observada en los distintos genotipos, siendo más frecuente en el binomio CT/CT , seguida del TT/TT , y siendo la menos frecuente en el binomio CC/CC , que como ya fue mencionado, corresponde a la distribución de este genotipo en la población general.

Como se mencionó anteriormente, no se observó una asociación del polimorfismo $C677T$ con el L/PH, ya que la frecuencia alélica tanto de las

madres como de los pacientes, fue muy similar a la de la población en general, teniendo en cuenta las consideraciones establecidas en los resultados. Para corroborar lo anterior se enfrentaron cada uno de los genotipos de las madres y los pacientes contra los genotipos de los controles. Sin embargo, la prueba de los Odds Ratio no descartó la falta de asociación, debido a que los valores introducidos no fueron estadísticamente significativos, debido al tamaño de la muestra, y debido a que todos los valores arrojados son cálculos estadísticos, no se puede establecer ninguna deducción.

En esta prueba, se esperaba tener un O.R. mayor a 1 en el caso de los genotipos homocigotos para la variante mutada en el caso de existir una asociación, así como también se podía esperar sobre todo en las madres, de acuerdo a los resultados anteriores, un efecto de protección en las madres homocigotas para el alelo silvestre. En el caso del fenotipo de LPHB de acuerdo a los resultados obtenidos en los binomios, se esperaba tener una asociación con el genotipo 677TT de la madre y un O.R. mayor que en el padecimiento en general, debido a que es el fenotipo más severo.

En las figuras 46 y 47 se puede observar que no existe diferencia significativa (de acuerdo a los O.R.) entre los genotipos de los pacientes y los controles, y los genotipos de las madres de los pacientes y los controles. Aunque cabe mencionar, que si hubiera existido una asociación del genotipo con este padecimiento, la presencia del genotipo 677CC de las madres al ser menos frecuente que en los controles (Fig. 47), se podría atribuir a un posible efecto protector en contra del padecimiento, considerando también que las frecuencias de este genotipo en los pacientes fueron muy similares a los controles.

De acuerdo a los resultados obtenidos de los meta-análisis realizados, los Odds Ratio (O.R.) obtenidos de todos los estudios considerados fueron mayores en las madres que en los pacientes, aunque la diferencia es muy pequeña como para considerarla significativa; no obstante, también es importante considerar la distribución de los O.R. en ambos diagramas de árbol, ya que en la mayoría de los estudios incluidos, se observa una mayor asociación del L/PH respecto al genotipo de la madre al comparar con el de los hijos, sugiriendo que tiene un mayor impacto. Posiblemente si se incluyeran

más estudios se observaría alguna diferencia significativa, sin embargo, los estudios incluidos fueron los disponibles. El diagrama de árbol de los O.R. obtenidos con los datos de los pacientes, muestra que en el estudio realizado en Alemania se determinó el menor O.R. que en los otros estudios, contrario a lo que se observa en Argentina (en los estudios considerados), posiblemente debido a las diferentes condiciones económicas y por lo tanto nutricionales, favoreciendo a los individuos de Alemania, sugiriendo además que el ambiente tiene la principal influencia. Lo anterior también se confirma en el diagrama de árbol correspondiente al meta-análisis de los O.R. obtenidos con los datos de las madres con hijos con L/PH, en el que por un lado se tiene a Inglaterra con el menor O.R. y a Tailandia con el mayor O.R., además de que en este caso se observa el efecto de presión selectiva, debido a que la prevalencia de homocigotos mutantes para este polimorfismo es muy baja (1.00%); esto concuerda con la susceptibilidad a este padecimiento cuando las madres tienen este genotipo, ya que en las poblaciones que presentan bajas frecuencias se aprecia mejor la influencia del genotipo para esta variante y en este caso su relación con el ambiente nutricional, que también fue confirmado al encontrar asociación de este genotipo en la población de India [Ali A, et al, 2009]. Los O.R. obtenidos en este trabajo también se incluyeron, sin embargo es necesario aumentar el tamaño de la muestra para que se pueda hacer una comparación significativa; sin embargo, considerando los resultados obtenidos se puede sugerir que el valor obtenido para el LP/H fue intermedio a los valores arrojados (tanto para las madres como para los pacientes), contrario a lo que se observó con el fenotipo considerado más severo, en el que al comparar con los O.R. obtenidos con los genotipos de las madres de los otros estudios fue de los más altos.

Como ya fue señalado en la sección de los resultados, es muy importante considerar las proteínas afectadas por la homocisteína y la homocisteína tiolactona, y que están involucradas en el desarrollo del labio y el paladar, teniendo en cuenta que en individuos con el polimorfismo *C677T* se han encontrado niveles mayores de homocisteína respecto a los observados en aquellos homocigotos para el alelo silvestre en población mexicana (sobre todo en aquellos con una deficiente dieta en folatos). Para el presente trabajo sólo

se consideraron cuatro de las proteínas principales involucradas en este proceso. Debido a que no se contó con otro sistema de análisis, se utilizó el software mencionado, en el cual se resaltaron los residuos de lisina y cisteína de acuerdo a como se indica en las figuras.

Es importante señalar que se muestran todos los residuos de estos aminoácidos, y la proteína de forma que se aprecien aquellos residuos que se encuentren más expuestos a tener contacto con otras moléculas, sin embargo, no se asegura que precisamente en esos residuos se incorporan la homocisteína o la homocisteína tiolactona ni que pueden alterar su estructura tridimensional y/o funcionalidad. Para esto, se requiere de un estudio más sofisticado en el que se determinen los sitios de unión de estos compuestos y la consecuencia estructural en las proteínas afectadas, lo cual se puede llevar a cabo por espectroscopía de masas comparando la proteína pura y los aductos formados de la misma al reaccionar con los compuestos mencionados. Por otro lado, para evaluar la funcionalidad de las proteínas se puede hacer ensayos en los que se demuestre su actividad (ya sea por ensayos enzimáticos o determinando la unión con sus ligandos).

Lo anterior puede ser más significativo en el caso del binomio de homocigotos para el alelo mutado, en el que el fenotipo es más severo debido a que los niveles de homocisteína son muy altos en comparación con los niveles normales.

Como se puede observar en la figura 48, existe una mayor cantidad de residuos de lisina que de cisteína, sin embargo, los primeros están más expuestos al medio, y considerando la posible pérdida de la actividad de SHH, la unión de la homocisteína y/o la homocisteína tiolactona puede provocar que no se fusionen las proyecciones palatinas debido a que esta proteína se encuentra en la lámina epitelial media cuando se lleva a cabo la fusión, además de ser una molécula primordial en la organogénesis.

MSX1 a pesar de no tener muchos residuos de lisina y ninguno de cisteína, como se puede apreciar en la figura 49, contiene residuos de lisina que interaccionan directamente con el DNA, los cuales al ser modificados seguramente provocarán que este factor de transcripción ya no interaccione con el DNA, lo cual es fundamental debido a que activa la expresión de *BMP2*, *BMP4* y *SHH* que son indispensables para la formación del labio y el paladar.

Una de las proteínas que están involucradas en la diferenciación celular y que se encuentra en el epitelio y mesénquima de las proyecciones palatinas, es la BMP2. Esta proteína como se puede observar en la figura 50, tiene una gran cantidad de residuos de cisteína principalmente, que al interactuar con la homocisteína u homocisteína tiolactona pueden provocar la alteración de la estructura e impedir la unión con sus ligandos de forma indirecta (ya que no se encuentran en el sitio de unión de acuerdo al ligando presentado). Sin embargo, como se muestra en la figura mencionada y de acuerdo a la interacción de esta proteína con su ligando, los residuos de lisina al ser modificados puede conllevar directamente a que no se lleve a cabo dicha interacción y no se lleve a cabo la señalización correspondiente.

Una de las proteínas más importantes en la fusión palatina es la TGF β 3, ya que cuando se inhibió la expresión del gen correspondiente en un modelo animal, se observó que la fusión no se llevaba a cabo. Por lo tanto, considerando que tienen una gran cantidad de residuos de lisina y cisteína, al aumentar los niveles de homocisteína plasmática es muy probable que se pierda la estructura y/o su funcionalidad por la formación de los aductos mencionados, teniendo como consecuencia la falta del cierre de las proyecciones palatinas.

Existen factores que no fueron considerados en el presente trabajo, debido a que se estableció que correspondían a datos clínicos, de acuerdo a lo estipulado por el Departamento de Genética del HIMFG. Uno de estos aspectos son las características heredofamiliares de los individuos incluidos en el estudio, del cual se espera que del 20 al 30% tengan antecedentes heredofamiliares positivos, de acuerdo a lo establecido en distintos estudios y a lo reportado en la referencia [Peña I.M, 2008]. Lo anterior, es indispensable en el asesoramiento genético, ya que además de considerar los factores nutricionales (como los niveles y consumo de folatos), el riesgo de recurrencia en aquellos individuos con el antecedente de un familiar afectado y 1 hijo afectado aumenta hasta cuatro veces el riesgo observado en la población en general, y 17 veces cuando se tiene la misma situación con alguno de los padres afectados. Si hubiera existido una asociación significativa entre el polimorfismo C677T y la patología en la población estudiada, posiblemente se

podría emplear la genotipificación de esta variante como herramienta para el asesoramiento genético.

Otro aspecto no considerado fue el consumo periconcepcional de ácido fólico, el cual para el proyecto mayor se evaluó mediante cuestionarios cuidadosamente diseñados. Como ya se mencionó, el consumo periconcepcional de este nutrimento ha disminuido el riesgo de tener hijos con malformaciones congénitas de acuerdo al riesgo observado cuando las madres no consumen esta vitamina, debido al efecto protector mencionado. Existen muchos estudios en los cuales se ha determinado lo anterior para el LP/H, en los que se ha establecido que el riesgo de las madres para tener hijos con este padecimiento en población caucásica aumenta hasta 6 veces cuando no existe la suplementación periconcepcional del ácido fólico y son homocigotas para el polimorfismo *C677T* [Van Rooji I, et al, 2003]; lo anterior también se observó cuando los pacientes eran homocigotos para la misma variante, sin embargo, el aumento del riesgo fue menor que el observado cuando las madres eran homocigotas. Por lo tanto, considerando la alta frecuencia del genotipo homocigoto para *677TT* respecto a las demás poblaciones mundiales, y a que muchos de los individuos (y sus madres) que acuden al HIMFG no tienen un estado nutricional adecuado, se podría esperar que tenga un gran impacto la presencia de este polimorfismo en las madres que no tienen niveles adecuados de folatos (debido a la falta de suplementación periconcepcional) sobre el riesgo de tener hijos con LP/H. Sin embargo, es importante aclarar que, para que se cumpla lo anterior, se debe confirmar primero si existe una asociación de este polimorfismo con la patología mencionada en la población estudiada, lo cual no se obtuvo.

Es importante considerar la influencia de los otros factores que pueden tener influencia en el riesgo de tener descendencia con L/PH como el consumo de multivitamínicos, alcohol, cigarro y fármacos, la edad materna, la exposición a teratógenos y el estado de salud principalmente. Ajustando estas variables, se puede establecer el impacto del consumo de ácido fólico y el polimorfismo *C677T*, lo cual se puede llevar a cabo mediante el empleo de cuestionarios cuidadosamente diseñados y de una prueba estadística que permita visualizar resultados confiables.

Basándose en que el L/PH es una enfermedad multifactorial en la que además del ambiente están involucrados múltiples genes, para establecer su etiología y las condiciones genéticas que proporcionan susceptibilidad a la misma, es importante considerar la posible asociación de polimorfismos y mutaciones encontradas en distintos genes cuyos productos proteicos participan directa o indirectamente en la etiología de la enfermedad. Respecto al polimorfismo en estudio del presente trabajo, se pueden tomar aquellas poblaciones en las que se ha tenido la mayor asociación con el L/PH considerando la influencia del ambiente (sobretudo de los folatos) y considerar aquellos polimorfismos en los que se han obtenido asociaciones significativas con el fenotipo.

Teniendo en cuenta el metabolismo de los folatos, la homocisteína y el polimorfismo *C677T*, se pueden estudiar genes que estén involucrados en el metabolismo de estos compuestos y determinar su asociación con el L/PH. Por ejemplo, considerando que este polimorfismo se ha asociado a la enfermedad debido, en gran parte, al aumento de los niveles de homocisteína plasmática en los homocigotos, se puede establecer la influencia de aquellos genes que codifican para productos que están implicados en el metabolismo de la homocisteína y sus derivados. En un caso en particular, basándose en que los aumentos de homocisteína se relacionan con el estrés oxidante y que la homocisteína es precursora del glutatión, podría verse un efecto compensatorio en el que el glutatión disminuye las especies oxidantes producidas por el metabolismo de la homocisteína. Sin embargo, si existen mutaciones deletéreas en los genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de los derivados del glutatión, podría observarse un efecto negativo mayor sobre el fenotipo. De esta manera, se pueden establecer múltiples asociaciones de muchos genes con la etiología de la enfermedad [Ali A, et al, 2009].

VII. Conclusiones

Se determinó, mediante la genotipificación por la técnica RFLP, que la prevalencia para los genotipos *CC*, *CT* y *TT* en los pacientes con L/PH fue de 18.52%, 48.15% y 33.33%, respectivamente, mientras que en las madres fue de 11.11%, 55.56% y 33.33%. La distribución de los distintos genotipos, así como de los binomios, no tuvo una relación estadísticamente significativa con el fenotipo debido al tamaño de la muestra. Finalmente, no se encontró una posible asociación de los distintos genotipos con el padecimiento al comparar las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas con las de la población en general, lo cual no se puede descartar debido a que no se utilizaron controles propios y a que el tamaño de la muestra fue menor a la significativa.

VIII. Bibliografía

1. Alam M.A, Husain S.A, Narang R, Chauhan S.S, Kabra M, Vasisht S. Association of polymorphism in the thermolabile 5, 10-methylene tetrahydrofolate reductase gene and hyperhomocysteinemia with coronary artery disease. *Mol. Cell. Biochem.* 310 (2008) 111-117.
2. Ali A, Singh SK, Raman R. *MTHFR 677TT* and *IRF6820GG* together with *MTHFR 677CT*, but not *MTHFR A1298C*, are risks for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in an Indian population. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* 13 (2009) 355-360.
3. Altomare I, Adler A, Aledort L.M. The 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase *C677T* mutation and risk of fetal loss: a case series and review of the literature. *Thrombosis Journal* 5 (2007) 17-21.
4. Arruda V. R. Prevalence of the Mutation *C677T* in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am. J. Med. Genet.* 78 (1998) 332-335.
5. Attri J, Dhawan V, Mahmood S, Pandhi P, Parwana HK, Nath R. Effect of vitamin C supplementation on oxidative DNA damage in an experimental model of lead-induced hypertension. *Ann. Nutr. Metab.* 47 (2003) 294–301.
6. Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death and Differ.* 11 (2004) S56-S64.
7. Ausubel F.M, Brent R, Kingston R.E, Moore D, Seidman J.G, Smith J.A, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol I. Massachusetts Genetal Hospital Harvard Medical School. Wiley Interscience (1991).
8. Bagley, P.J. and Selhub, J. Acommon mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (1998) 13217–13220.
9. Bailey L.B. y Gregory J.F. III Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J. Nutr.* 129 (1999), 919–922.

10. Bea F, Hudson FN, Neff-Laford H, White CC, Kavanagh TJ, Kreuzer J, Preusch MR, Blessing E, Katus HA, Rosenfeld ME. Homocysteine stimulates antioxidant response element mediated expression of glutamate-cysteine ligase in mouse macrophages. *Atherosclerosis* 203 (2009) 105-111.
11. Behrman R.E, Kliegman R.M, Jenson H.B. Nelson Tratado de Pediatría, versión en español de la 17ª edición, Elsevier Science (2006) 28-29.
12. Beiraghi S, Nath SK, Gaines M, Mandhyan DD, Hutchings D, Ratnamala U, McElreavey K, Bartoloni L, Antonarakis GS, Antonarakis SE, Radhakrishna U. Autosomal dominant nonsyndromic Cleft Lip and Palate: Significant Evidence of Linkage at 18q21.1. *Am. J. Hum. Genet.* 81. Report (2007), 180-188.
13. Bleich S, Degner D, Javaheripour K, Kurth C, Kornhuber J. Homocysteine and alcoholism. *J. Neural Transm. Suppl.* 60 (2000) 187–196.
14. Bollander-Gouaille C. Focus on homocysteine and the vitamins involved in its metabolism. 2nd ed. Paris, France: Springer-Verlag, (2002).
15. Bosco P, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, Romano A, Romano C, Guéant JL. In Sicily, methionine synthase (MTR) 2756 (A3G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 121 (2003) 219-224.
16. Bostom, A.G. and Culleton, B.F. Hyperhomocysteinemia in chronic renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10 (1999) 891–900.
17. Bostom G.A. y Lathrop L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: Prevalence, etiology and potential relationship to atherosclerotic outcomes. *Kidney Int.* 52 (1997) 10-20.
18. Botto L.D. y Yang, Q. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies: a HuGE Review. *Am. J. Epidemiol.* 151 (2000) 862-877.
19. Brouillette SW, Moore JS, McMahon AD. Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland

- Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet* 369 (2007) 107–114.
20. Castro R, Rivera I, Ravasco P, Camilo M. E, Jakobs C, Blom H. J, de Almeida I. T. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C-T and 1298A-C mutations are associated with DNA hypomethylation. (Letter) *J. Med. Genet.* 41 (2004) 454-458.
 21. Cavalca V, Cighetti G, Bamonti F, Loaldi A, Bortone L, Novembrino C. Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clin. Chem.* 47 (2001) 887-892.
 22. Caylak E, AYTEKIN M, Halifeoglu I. Antioxidant effects of methionine, α -lipoic acid, N-acetylcystine and homocysteine on lead-induced oxidative stress to erythrocytes in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 60 (2008) 289-294.
 23. Chambers J.C, Ireland H, Thompson E. Methylene tetrahydrofolate reductase 677 C->T mutation and coronary heart disease risk in UK Indian Asians. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (2000) 2448-2452.
 24. Chauveau P, Chadeaux B, Coudé M, Aupetit J, Hannedouche T, Kamoun P. y Jungers P. Hyperhomocysteinemia, a risk factor for atherosclerosis in chronic uremic patients. *Kidney Int.* 43, Supl. 1 (1993) S72-S77.
 25. Chen C.P, Chern S.R, Lee C.C, Town D.D. Isochromosome 18q in a fetus with congenital megacystis, intra-uterine growth retardation and cloacal dysgenesis sequence. *Prenat. Diagn.* 18 (1998) 1068–1074.
 26. Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, Lussier-Cacan S, Chen MF, Pai A, John SW, Smith RS, Bottiglieri T, Bagley P, Selhub J, Rudnicki MA, James SJ, Rozen R. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 433-443.
 27. CONAPO, Veinticinco años de transición epidemiológica en México, Publicaciones CONAPO (1999).
 28. Couto E, Barini R, Zaccaria R, Annicchino-Bizzacchi JM, Passini Junior R, Pereira BG, Silva JC, Pinto e Silva JL. Association of anticardiolipin antibody and C677T in methylenetetrahydrofolate reductase mutation in

- women with recurrent spontaneous abortions: a new path to thrombophilia? Sao Paulo Med. J. 123 (2005) 15-20.
29. Cox T.C. Taking it to the max: the genetic and developmental mechanisms coordinating midfacial morphogenesis and dysmorphology. Clin. Genet. 65 (2004) 163-176.
 30. Crott J. y Fenech M. Preliminary study of the genotoxic potential of homocysteine in human lymphocytes *in vitro*. Mutagenesis 16 (2001) 213-217.
 31. Dalal S, Parkin S. M, Homer-Vanniasinkam S, Nicolaou A. Effect of homocysteine on cytokine production by human endothelial cells and monocytes. Ann. Clin. Biochem. 40 (2003) 534-541.
 32. Dávalos IP, Olivares N, Castillo MT, Cantú JM, Ibarra B, Sandoval L, Morán MC, Gallegos MP, Chakraborty R, Rivas F. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. Ann. Genet. 43 (2000) 89-92.
 33. Davies J.F 2nd, Delcamp T.J, Prendergast N.J, Ashford V.A, Freisheim J.H, Kraut J. Crystal structures of recombinant human dihydrofolate reductase complexed with folate and 5-deazafolate. J. Biochem. 29 (1990) 9467-9479.
 34. de Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Kromhout D. Association between B vitamin intake and plasma homocysteine concentration in the general Dutch population aged 20–65 y. Am. J. Clin. Nutr. 73 (2001) 1027-1033.
 35. DeLeo F. R, Renee J, McCormick S, Nakamura M, Apicella M, Weiss J. P, Nauseef W. M. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. J. Clin. Invest. 101 (1998) 455-463.
 36. Di Giuseppe D, Frosali S, Priora R, Di Simplicio F.C, Buonocore G, Cellesi C. The effects of age and hyperhomocysteinemia on the redox forms of plasma thiols. J. Lab. Clin. Med. 144 (2004) 235-245.
 37. Donaldson K. O, y Keresztesy J. C. J. Biol. Chem. 237 (1962), 1298.
 38. D'Uva M, Di Micco P, Strina I, et al. Hyperhomocysteinemia in women with unexplained sterility or recurrent early pregnancy loss from Southern Italy: a preliminary report. Thromb. J. 11 (2007) 5–10.

39. Ensembl – Genome Browser. <http://www.ensembl.org> consultada el 07-01-2010.
40. Feissner R.F, Skalska J, Gaum W.E, Sheu S.S. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca²⁺ and ROS. *Front Biosci.* 1 (2009) 1197-1218.
41. Fenech M, Baghurst P, Luderer W, Turner J, Record S, Ceppi M, Bonassi S. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, b-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability—results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. *Carcinogenesis* 26 (2005) 991–999.
42. Fink K, Brink A, Vienken J, Heidland A, Stopper H. Homocysteine exerts genotoxic and antioxidative effects *in vitro*. *Toxicol. in Vitro* 21 (2007) 1402-1408.
43. Finnell RH, Shaw GM, Lammer EJ, Brandl KL, Carmichael SL, Rosenquist TH. Gene-nutrients interactions: importance of folates and retinoids during early embryogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 198 (2004) 75-85.
44. Folbergrová J, Haugvicová R, Mares P. Behavioral and metabolic changes in immature rats during seizures induced by homocysteic acid: the protective effect of NMDA and non-NMDA receptor antagonists. *Exp. Neurol.* 161 (2000) 336– 345.
45. Frosst P, Blom H.J, Milos R, Goyette P, Sheppard C.A, Mathews R.G, Boers G.J.H, van der Huevel L.P. y Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.* 10 (1995), 111-113.
46. Gaspar DA, Pavanello RC, Zatz M, Passos-Bueno MR, André M, Steman S, Wyszynski DF, Matioli SR. Role of the C677T polymorphism at the *MTHFR* gene on risk to nonsyndromic cleft lip with/without cleft palate: Results from a case-control study in Brazil. *Am. J. Med. Genet.* 87 (1999) 197–199.
47. Gómez R, Lara R. Incidencia de Labio y Paladar Hendido en México: 2003-2006. *Revista ADM* 45 (2008) 309-313.

48. Govindaiah V, Naushad SM, Prabhakara K, Krishna PC, Radha Rama Devi A. Association of parental hyperhomocysteinemia and C677T Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) polymorphism with recurrent pregnancy loss. *Clinical Biochemistry* 42 (2009) 380-386.
49. Goyette P, Frosst P, Rosenblatt D.S y Rozen, R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/genotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 56 (1995) 1052-1059.
50. Goyette P, Sumner J.S, Milos R, Duncan A.M, Rosenblatt D.S, Matthews R.G, Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat. Genet.* 7 (1994), 195-200.
51. Grunert RR, Braune A, Schnackenberg E, Schloot W, Krause HR. Genetic differences in enzymes of folic acid metabolism in patients with lip-jaw-palate clefts and their relatives. *Mund Kiefer Gesichtschir* 6 (2002) 131–133.
52. Guéant-Rodriguez RM, Guéant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP, Namour F, Chabi NW, Sanni A, Anello G, Bosco P, Romano C, Amouzou E, Arrieta HR, Sánchez BE, Romano A, Herbeth B, Guillard JC, Mutchinick OM. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am. J. Clin. Nutr.* 83 (2006) 701-707.
53. Guenther B. D, Sheppard C. A, Tran P, Rozen R, Matthews R. G, y Ludwig M. L. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat. Struct. Biol.* 6 (1999) 359-365.
54. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* 97 (2006) 1634–1658.
55. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press, New York (2007).
56. Hamid A, Wani N.A, Kaur J. New perspectives on folate transport in relation to alcoholism-induced folate malabsorption--association with

- epigenome stability and cancer development. FEBS J. 276(2009) 2175-2191.
57. Ifergan I, Assaraf Y.G. Molecular mechanisms of adaptation to folate deficiency. Vitam. Horm. 79 (2008) 99-143.
 58. Ingrosso D, Perna A.F. Epigenetics in hyperhomocysteinemic states: A special focus on uremia. Biochimica et Biophysica Acta 1790 (2009) 892-899.
 59. Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, Suda T. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. Nat. Med. 12 (2006) 446–451.
 60. Jakubowski H. Proofreading in vivo: editing of homocysteine by methionyl-tRNA synthetase in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. 87 (1990) 4504-4508.
 61. Jakubowski H. Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. FASEB J. 13 (1999) 2277-2283.
 62. Jones K.L, Smith D.W, Ullelaand C.N. Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. Lancet 9 (1973) 1267-1271.
 63. Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. Curr. Opin. in Genet. Dev. 15 (2005) 270-278.
 64. Kamen B.A. and Smith A.K. A review of folate receptor alpha cycling and 5-methyltetrahydrofolate accumulation with an emphasis on cell models in vitro. Adv. Drug. Deliv. Rev. 56 (2004) 1085-1097.
 65. Kang S, Wong P. W, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase: An inherited Risk Factor for Coronary Artery Disease. Am. J. Hum. Genet. 48 (1991), 536-545.
 66. Kang S.S, Wong P.W. y Malinow M.R. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. Ann. Rev. Nutr. 12 (1992) 279-298.
 67. Kuhn W, Hummel T, Woitalla D, Muller T. Plasma homocysteine and *MTHFR* C677T genotype in levodopa-treated patients with PD. Neurology 56 (2001) 281– 282.

68. Kumar K.S, Govindaiah V, Naushad S.E, Devi R.R, Jyothy A. Plasma homocysteine levels correlated to interactions between folate status and methylene tetrahydrofolate reductase gene mutation in women with unexplained recurrent pregnancy loss. *J. Obstet. Gynaecol.* 23(2003) 55–58.
69. Kushi LH, Lenart EB, Willett WC: Health implications of Mediterranean diets in light of contemporary knowledge. 1. Plant foods and dairy products. *Am. J. Clin. Nutr.* 61 (1995) suppl1407S-1415S.
70. Stern L.L, Mason J.B, Selhub J, Choi S.W. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the *C677T* polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 9 (2000) 849–853.
71. Lazarewicz J.W, Ziembowicz A, Matyja E, Stafiej A, Zieminska E. Homocysteine-evoked ⁴⁵Ca release in the rabbit hippocampus is mediated by both NMDA and group I metabotropic glutamate receptors: in vivo microdialysis study. *Neurochem. Res.* 28 (2003) 259–269.
72. Leggett RW. An age-specific kinetic model of lead metabolism in humans. *Environ. Health Perspect.* 101 (1993) 598–616.
73. Lewis S. J, Zammit S, Gunnell D, Smith G. D. A meta-analysis of the *MTHFR C677T* polymorphism and schizophrenia risk. *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiat. Genet.)* 135B (2005) 2-4.
74. Lewis SJ, Lawlor DA, Davey Smith G, Araya R, Timpson N, Day IN, Ebrahim S. The thermolabile variant of *MTHFR* is associated with depression in the British Women's Heart and Health Study and a meta-analysis. *Molec. Psychiat.* 11 (2006) 352-360.
75. Li D, Pickell L, Liu Y, Wu Q, Cohn JS, Rozen R. Maternal methylenetetrahydrofolate reductase deficiency and low dietary folate lead to adverse reproductive outcomes and congenital heart defects in mice. *Am. J. Clin. Nutr.* 82 (2005) 188-195.
76. Lidral AC, Moreno LM, Bullard SA. Genetic Factors and Orofacial Clefting. *Semin. Orthod.* 14 (2008) 103-114.
77. Lipton S.A, Kim W.K, Choi Y.B, Kumar S, D'Emilia D.M, Rayudu P.V, Arnelle D.R, Stamler J.S. Neurotoxicity associated with dual actions of

- homocysteine at the N-methyl-d-laspartate receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 (1997) 5923– 5928.
78. Little J, Gilmour M, Mossey PA, Fitzpatrick D, Cardy A, Clayton-Smith J, Hill A, Duthie SJ, Fryer AE, Molloy AM, Scott JM. Folate and clefts of the lip and palate-a U.K.- based case-control study: Part II: Biochemical and genetic analysis. Clef Palate Craniofac. J. 45 (2008) 428-438.
79. Lussier-Cacan S, Xhignesse M, Piolot A, Selhub J, Davignon J, Genest J Jr. Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits. Am. J. Clin. Nutr. 64 (1996) 587-593.
80. Marazita M.L, Murray J.C, Lidral A.C. Meta-analysis of 13 genome scans reveals multiple cleft lip/palate genes with novel loci on 9q21 and 2q32-35. Am. J. Hum. Genet. 75 (2004) 161-173.
81. Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Carinci P, Stabellini G, Bisceglia L, Gombos F, Tognon M. C677T variant form at the *MTHFR* gene and CL/P: A risk factor for mothers? Am. J. Med. Genet. 98 (2001) 357–360.
82. Matherly L.H. and Goldman D.I. Membrane transport of folates. Vitam. Horm. 66 (2003) 403-456.
83. Matté C, Mackedanz V, Stefanello FM, Scherer EB, Andreatza AC, Zanotto C, Moro AM, Garcia SC, Gonçalves CA, Erdtmann B, Salvador M, Wyse AT. Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: Prospective effect of folic acid. Neurochem. Int. 54 (2008) 7-13.
84. Matté C, Monteiro S.C, Calcagnotto T, Bavaresco C.S, Netto C.A, Wyse A.T.S. In vivo and in vitro effects of homocysteine on Na⁺,K⁺-ATPase activity in parietal, prefrontal and cingulate cortex of young rats. Int. J. Dev. Neurosci. 22 (2004) 185–190.
85. Matthews R.G. Methylenetetrahydrofolate Reductase: A Common Human Polymorphism and Its Biochemical Implications. Chem. Rec. 2 (2002) 4-12.
86. McNulty H, McKinley MC, Wilson B, McPartlin J, Strain JJ, Weir DG, Scott JM. Impaired functioning of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase is dependent on riboflavin status: implications for riboflavin requirements. Am. J. Clin. Nutr. 76 (2002) 436-441.

87. Medina M.A, Urdiales J.L. y Sanchoz M. Eur. J. Biochem. 268 (2001) 3871-3882.
88. Millán I. y De Alvaro F. Homocisteína y disfunción endotelial en pacientes con diabetes mellitus, insuficiencia renal crónica, diálisis y transplante. Nefrología XVIII, No. 3 (1998) 186-195.
89. Mills JL, Molloy AM, Parle-McDermott A, Troendle JF, Brody LC, Conley MR, Cox C, Pangilinan F, Orr DJ, Earley M, McKiernan E, Lynn EC, Doyle A, Scott JM, Kirke PN. Folate-Related Gene Polymorphisms as Risk Factors for Cleft Lip and Cleft Palate. Births Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol. 82 (2008) 636-643.
90. Moll A, et al. BALLView: an object-oriented molecular visualization and modeling framework. J. Comput. Aided Mol. Des. 19 (2005) 791-800.
91. Moore K.L, Persaud T. Embriología Clínica, 8a edición, Ed. Elsevier (2009) 185-196.
92. Morales J.J, Sánchez B, Verdejo J, Ponce de León S, Mutchinick O.M. La hiperhomocisteinemia como factor de riesgo en una población mexicana. Arch. Cardiol. Méx. 73 Supl. (2003) S103-S105.
93. Moran R.G. Roles of foylpoly- γ -glutamate synthetase in therapeutics with tetrahydrofolate antimetabolites: an overview. Semin. Oncol. 26 (1999) 24–32.
94. Mostowska A, Hozyasz KK, Jagodzinski PP. Maternal *MTR* genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population. Clin. Genet. 69 (2006) 512–517.
95. Mudd S. H, Homocystinuria associated with decreased Methylenetetrahydrofolate reductase activity. Biochem. Biophy. Res. Commu. 46 (1972), 905-912.
96. Mudd S. H, Inherited Disorders of Sulphur Metabolism, N. A. J. Carson and D. N. Raine, Eds., Churchill Livingstone, Edinburgh and New York, (1971), p. 204.
97. Mudd S.H. Disorders of trans-sulfuration. Metabolic basis of Inherited Diseases (1983) 522-529.
98. Muñoz JB, Lacasaña M, Cavazos RG, Borja-Aburto VH, Galavíz-Hernández C, Garduño CA. Methylenetetrahydrofolate reductase gene

- polymorphisms and the risk of anencephaly in Mexico. *Mol Hum Reprod.* 13 (2007) 419-24.
99. Muntjewerff J. W, Kahn R. S, Blom H. J, den Heijer M. Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase and risk of schizophrenia: a meta-analysis. *Molec. Psychiat.* 11 (2006) 143-149.
100. Mutchinick O, Lisker R, Babinsky V. Programa Mexicano de Registro y Vigilancia Epidemiológica de Malformaciones Congénitas Externas (RYVEMCE). *Rev. Salud Pública* 30 (1988) 88-100.
101. Mutchinick O.M, López M.A, Luna L, Waxman J, Babinsky V.E. High Prevalence of the Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase Variant in Mexico: A country with a Very High Prevalence of Neural Tube Defects. *Mol. Genet. Metab.* 68 (1999) 461-467.
102. Nelen W.L, Blom H.J, Steegers E.A, den Heijer M, Eskes T.K. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a metaanalysis. *Fertil. Steril.* 74(2000) 1196–1199.
103. Nelen W.L, Bulten J, Steegers E.A, Blom H.J, Hanselaar A.G, Eskes T.K. Maternal homocysteine and chorionic vascularization in recurrent early pregnancy loss. *Hum. Reprod.* 15(2000) 954–960.
104. Nilsson K, Gustafson L, Hultberg B. The plasma homocysteine concentration is better than that of serum methylmalonic acid as a marker for sociopsychological performance in a psychogeriatric population. *Clin. Chem.* 46 (2000) 691– 696.
105. Otero A, Pou-Ferrari R, Pons E, Lens D, E. DL, Dellepiane M. y cols. Trombofilia y pérdida recurrente de embarazo. *Rev. Med. Uruguay* 20 (2004) 106-113.
106. Pasternack L.B, Littlepage L.E, Laude D.A Jr, Appling D.R. ¹³C NMR analysis of the use of alternative donors to the tetrahydrofolatedependent one-carbon pools in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 326 (1996) 158–165.
107. Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, Sanchez-Céspedes M, Herman JG, Esteller M. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res.* 62 (2002) 4519-4524.

108. Pejchal R, Campbell E, Guenther B.D, Lennon B.W, Matthews R.G, Ludwig M.L. Structural perturbations in the Ala --> Val polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase: how binding of folates may protect against inactivation. *Biochemistry* 45 (2006) 4808-4818.
109. Peña I. M. Frecuencia del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en pacientes con labio hendido con y sin paladar hendido no sindrómicos. Tesis Especialidad (Especialidad en Genética Medica)-UNAM, Facultad de Medicina. México (2008) 47 p.
110. Piedrahita J.A, Oetama B, Bennett G.D, van Waes J, Kamen B.A, Richardson J, Lacey S.W, Anderson R.G, and Finnell R.H. Mice lacking the folic acid-binding protein Folbp1 are defective in early embryonic development. *Nat. Genet.* 23 (1999) 228-232.
111. Prescott N.J, Lees M.M, Winter R.M. Identification of susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a two stage genome scan of affected sib-pairs. *Hum. Genet.* 106 (2000) 345-350.
112. Prescott N.J, Malcolm S. Folate and the face: evaluating the evidence for the influence of folate genes on craniofacial development. *Cleft Palate Craniofac. J.* 39 (2002) 327-331.
113. Quere I, Bellet H, Hoffet M, Janbon C, Mares P, Gris J.C. A woman with five consecutive fetal deaths: case report and retrospective analysis of hyperhomocysteinemia prevalence in 100 consecutive women with recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 69(1998) 152–154.
114. Ramakrishnan S, Prasannan K.G. y Rajan R *Textbook of Biochemistry*, 3rd Edition, Orient Longman, Chennai (2001), P. 289.
115. Ramakrishnan S, Sulochana KN, Lakshmi S, Selvi R, Angayarkanni N. Biochemistry of homocysteine in health and diseases. *Indian J. Biochem. Biophys.* 43 (2006) 275-283.
116. Reed M.C, Nijhout H. F, Neuhouser M.L, Gregory III J.F y Shane B. A Mathematical Models Gives Insights into Nutritional and Genetic Aspects of Folate-Mediated One-Carbon Metabolism. *J. Nutr.* 136 (2006) 2653-2661.
117. Refsom H y Bratstrom L. Plasma Homocysteine and Cardiovascular Disease. *Atherosclerotic Cardiovascular Disease Hemostats and Endothelial Function, Lab. Invest.* 81 (1992) 183.

118. Ren A, Wang J. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil. Steril.* 86(2006) 1716–1722.
119. Richards J.B, Valdes A.M, Gardner J.P, Kato B.S, Siva A, Kimura M, Lu X, Brown M.J, Aviv A. y Spector T.D. Homocysteine levels and leucocyte telomere length. *Atherosclerosis* 200 (2008) 271-277.
120. Robertson B, Greaves M. Antiphospholipid syndrome: An evolving story. *Blood. Rev.* (2006).
121. Rodríguez M, Téllez N, Cerbón M.A, López M, Cervantes A. Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Revista de investigación clínica* 56 (2004) 56-71.
122. Roffman JL, Weiss AP, Purcell S, Caffalette CA, Freudenreich O, Henderson DC, Bottiglieri T, Wong DH, Halsted CH, Goff DC. Contribution of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) polymorphisms to negative symptoms in schizophrenia. *Biol. Psychiat.* 63 (2008) 42-48.
123. Rosenberg I.H. Folate absorption and transport. In: Cooper BA, Whitehead VM. Eds. *Chemistry and Biology of Pteridines: Pteridines and Folic Acid Derivatives*. Berlin, de Gruyter (1986) 587.
124. Rosenblatt D.S, Lue-Shing H, Arzoumanian A, Low-Nang L, Matiaszuk N. Methylenetetrahydrofolate reductase (MR) Deficiency: Thermolability of Residual MR activity, Methionine Synthase Activity, and Methylcobalamin Levels in Cultured Fibroblasts. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 47 (1992), 221-225.
125. Rosenblatt D.S. y Erbe R.W. Methylenetetrahydrofolate Reductase in Cultured Human Cells. II. Genetic and Biochemical Studies of Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency. *Pediat. Res.* 11 (1977), 1141-1143.
126. S. Clarke, K. Banfield. S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases, in: R Carmel, DW Jacobsen (Ed.), *Homocysteine in Health and Disease*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2001, 63–78.
127. S. Friso, S.W. Choi, D. Girelli, J.B. Mason, G.G. Dolnikowski, P.J. Bagley, O. Olivieri, P.F. Jacques, I.H. Rosenberg, R. Corrocher, J.

- Selhub. A common mutation in the 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 5606–5611.
128. Sachdev P.M. Homocysteine and brain atrophy (Review article). *Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29 (2005) 1152-1161.
129. Salazar M.D. and Ratnam M. The folate receptor: what does it promise in tissue-targeted therapeutics? *Cancer Metastasis Rev.* 26 (2007) 141-152.
130. Santos-Rebouças C.B, Pimentel M.M.G. Implications of abnormal epigenetic patterns for human diseases. *Eur. J. Hum. Genet.* 15 (2007) 10–17.
131. Sato N, Katsumata N, Kagami M. Clinical assessment and mutation analysis of Kallmann syndrome 1 (KAL1) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1, or KAL2) in five families and 18 sporadic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (2004) 1079-1088.
132. Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat. Genet.* 6 (1994) 348-356.
133. Schürks M, Zee RY, Buring JE, Kurth T. Interrelationships among the *MTHFR* 677C>T polymorphism, migraine and cardiovascular disease. *Neurology* 71 (2008) 505-513.
134. Secretaría de Salud. El Acido Fólico y la prevención de defectos al nacimiento. Folleto (2003). 1-31.
135. Shane B, Stokstad E.L.R. The interrelationships among folate, vitamin B12, and methionine metabolism. *Adv. Nutr. Res.* 5 (1983) 133–170.
136. Shane B. Folate chemistry and metabolism. In: Bailey LB, editor. *Folate in health and disease*. New York: Marcel Dekker (1995) 1–22.
137. Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, Todoroff K, Lammer EJ. Infant C677T mutation in *MTHFR*, maternal periconceptional vitamin use, and cleft lip. *Am. J. Med. Genet.* 80 (1998)196–198.
138. Shea T.B, Rogers E. Folate quenches oxidative damage in brains of apolipoprotein E-deficient mice: augmentation by vitamin. E. *Mol. Brain Res.* 108 (2002) 1 – 6.

139. Shotelersuk V, Ittiwut C, Siriwan P, Angspatt A. Maternal 677CT/1298AC genotype of the *MTHFR* gene as a risk factor for cleft lip. *J. Med. Genet.* 40 (2003) e64.
140. Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, Shane B, Roberts AC, Law GR, Rollinson S, Roman E, Cartwright RA, Morgan GJ. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96 (1999) 12810-12815.
141. Slama R, Bouyer J, Windham G, Fenster L, Werwatz A, Swan S.H. Influence of paternal age on the risk of spontaneous abortion. *Am. J. Epidemiol.* 161 (2005) 816–23.
142. Stanier P, Moore G.E. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum. Mol. Genet.* 13 (2004) R73-R81.
143. Stern L.L, Mason, J.B, Selhub J, Choi S.W. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9 (2000) 849–853.
144. Strobino B, Fox H.E, Kline J, Stein Z, Susser M, Warburton D. Characteristics of women with recurrent spontaneous abortions and women with favourable reproductive histories. *Am. J. Public Health* 76(1982) 986–991.
145. Stuhlinger M.C, Oka R.K, Graf E.E, Schmolzer I, Upson B.M, Kapoor O, Szuba A, Malinow M.R, Wascher T.C, Pachinger O and Cooke J.P. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 108 (2003) 933–938.
146. Sulochana KN, Amirthalakshmi S, Vasanthi SB, Tamilselvi R, Ramakrishnan S. Homocystinuria with congenital/developmental cataract. *Indian J. Pediat.* 67 (2000) 725-728.
147. Summer J.S. y Matthews R.G. Stereochemistry and mechanism of hydrogen transfer between NADPH and methyltetrahydrofolate in the reaction catalyzed by methylenetetrahydrofolate reductase from pig liver. *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 6949-6956.

148. Syvanen A.C, Accesing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. MacMillan Magazines LTD 2 (2001) 930-942.
149. Tolarova M.M. A common mutation in the *MTHFR* gene is a risk factor for nonsyndromic cleft and palate anomalies. Am. J. Hum. Genet. 63 (1998) A27.
150. Topal G, Brunet A, Millanvoye E, Boucher JL, Rendu F, Devynck MA, David-Dufilho M. Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of NO synthase activity through reduction of tetrahydrobioperin. Free Radic. Biol. Med. 36 (2004) 1532-1541.
151. Ueland P.M, Hustad S, Schneede J, Refsum H. y Vollset S.E. Biological and clinical implications of the *MTHFR C677T* polymorphism, Artículo de revisión. Trends in Pharmacol. Sci. 22 (2001) 196-201.
152. Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, Vollset SE. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. Am. J. Clin. Nutr. 72 (2000) 324–332.
153. Ulrey C.L, Liu L, Andrews L.G, Tollefsbol T.O. The impact of metabolism on DNA methylation. Hum. Mol. Genet. 14 (2005) R139–R147.
154. Van der Put N.M.J, Van Straaten H.W.M, Trijbels F.J.M. y Blom H.J. Minireview. Folate, Homocysteine and Neural Tube Defects: An Overview. Exp. Biol. Med. 226 (2001) 243-270.
155. Van Rooij IA, Vermeij-Keers C, Kluijtmans LA, Ocké MC, Zielhuis GA, Goorhuis-Brouwer SM, van der Biezen JJ, Kuijpers-Jagtman AM, Steegers-Theunissen RP. Does the interaction between Maternal Folate Intake and the Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms Affect the Risk of Cleft Lip with or without Cleft Palate? Am. J. Epidemiol. 157 (2003) 583-591.
156. Ventura E, Durant R, Jaussent A, Picot M, Morena M, Badiou S, Dupuy A, Jeandel C y Cristol J. Homocysteine and inflammation as main determinants of oxidative stress in enderly. Free Radic. Biol. Med. 46 (2008) 737-744.
157. Vinukonda G, Shaik Mohammad N, Md Nurul Jain J, Prasad Chintakindi K, Rama Devi Akella R. Genetic and environmental

- influences on total plasma homocysteine and coronary artery disease (CAD) risk among South Indians. *Clin. Chim. Acta* 405 (2009) 127-131.
158. Virgos C, Martorell L, Simó J.M, Valero J, Figuera L, Joven J, Labad A, y Vilella E. Plasma homocysteine and the methylenetetrahydrofolate reductase *C677T* gene variant: lack of association with schizophrenia. *Neuroreport*. 10 (1999) 2035-2038.
159. Wald D.S, Law M, Morris J.K. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 325 (2002) 1202.
160. Werler MM, Shapiro S, Mitchel AA. Periconceptional folic acid exposure and exposure and risk of ocurrent neural tube defects. *J. Am. Med. Assoc.* 269 (1993) 1257-1261.
161. Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc. Nat. Acad. Sci* 98 (2001) 4004-4009.
162. Wollack J.B, Makori B, Ahlawat S, Koneru R, Picinich S.C, Smith A, Goldman I.D, Qiu A, Cole P.D, Glod J. Characterization of folate uptake by choroid plexus epithelial cells in a rat primary culture model. *J. Neurochem.* 104 (2008) 1494-1503.
163. Wouters M.G, Boers G.H, Blom H.J, et al. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril* 60(1993) 820–825.
164. Wronska-Nofer T, Nofer JR, Stetkiewicz J, Wierzbicka M, Bolinska H, Fobker M, Schulte H, Assmann G, von Eckardstein A.. Evidence for oxidative stress at elevated plasma thiol levels in chronic exposure to carbon disulfide (CS₂) and coronary heart disease. *Nutr. Metab. and Cardiovasc. Dis.* 17 (2007) 546-553.
165. Wyszynski D.F, Duffy D.L, Beaty T.H. Maternal cigarette smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Cleft Palate Craniofac. J.* 34 (1997) 206-210.
166. Xu D, Neville R, Finkel T. Homocysteine accelerates endothelial cell senescence. *FEBS. Lett.* 470 (2000) 20–24.

167. Yamada K, Strahler JR, Andrews PC, Matthews RG. Regulation of human methylenetetrahydrofolate reductase by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005) 10454-10459.
168. Yoshiura K-i, Machida J, Daack-Hirsch S. Characterization of a novel gene disrupted by a balanced chromosomal translocation t(2;19)(q11.2;q13.3) in a family with cleft lip and palate. *Genomics* 54 (1998) 231-240.
169. Zappacosta B, Mordente A, Persichilli S, Giardina B, De Sole P. Effect of homocysteine on polymorphonuclear leukocyte activity and luminol-dependent chemiluminescence. *Luminescence* 15 (2000) 257–260.
170. Zetterberg H. Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2 (2004) 7.
171. Zhao R, Min S.H, Qiu A, Sakaris A, Goldberg G.L, Sandoval C, Malatack J.J, Rosenblatt D.S, and Goldman I.D. The spectrum of mutations in the PCFT gene, coding for an intestinal folate transporter, that are the basis for hereditary folate malabsorption. *Blood* 110 (2007) 1147-1152.
172. Zhao R, Russell R.G, Wang Y, Liu L, Gao F, Kneitz B, Edelmann W, and Goldman I.D. Rescue of embryonic lethality in reduced folate carrier-deficient mice by maternal folic acid supplementation reveals early neonatal failure of hematopoietic organs. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 10224-10228.
173. Zhu JH, Chen JZ, Wang XX, Xie XD, Sun J, Zhang FR. Homocysteine accelerates senescence and reduces proliferation of endothelial progenitor cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 40 (2006) 648–652.
174. Zhu WG, Li S, Lin LQ, Yan H, Fu T, Zhu JH. Vascular oxidative stress increases dendritic cell adhesion and transmigration induced by homocysteine. *Cell. Immunol.* 254 (2009) 110-116.
175. Zlotogora J. Syndactyly, ectodermal dysplasia, and cleft lip/palate. *J. Med. Genet.* 31 (1994) 957-959.
176. Zubieta-Ruiz B, Sánchez-Márquez Pedro, Castillo R.A. Enfermedades genéticas y defectos al nacimiento. Impacto en la morbilidad y mortalidad pediátrica. *Acta Pediatr. Mex.* 30(2009) 220-225.

177. Zuccherro T.M, Cooper M.E, Maher B.S. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 769-780.
178. Zúñiga-Noriega JR, Velazco-Campos Mdel R, Aguirre-Rodríguez A, Villarreal LM, Garza-González E, Maldonado-Garza HJ, Bosques-Padilla FJ. C677T polymorphism of the *MTHFR* gene and the risk of developing distal gastric cancer in a Mexican population. *Rev. Gastroenterol. Mex.* 72 (2007) 355-358.

IX. Anexos.

9.1. Reactivos.

- Solución de lisis para glóbulos rojos: cloruro de amonio, ácido etilén diamino tetraacético y bicarbonato de sodio (Qiagen).
- Solución de lisis celular: Tris (hidroximetil) aminometano, ácido etilén diamino tetraacético (Qiagen).
- Solución para precipitar proteínas: acetato de amonio (Qiagen).
- Isopropanol de grado molecular.
- Etanol de grado molecular.
- Buffer TBE: Tris-boratos-EDTA (Qiagen).
- Bromuro de etidio. Mutágeno y cancerígeno. Se debe tener precaución de no tener contacto directo (vía respiratoria, oral, ocular y dérmica).
- Marcador de 50 y 100 pb: agua, glicerol y buffer de carga (Fermentas).
- Buffer de carga: 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% azul de bromofenol, 0.03% cianol xileno, 60% glicerol, 60 mM EDTA (Fermentas).
- Los reactivos para la PCR (Invitrogen) y la restricción (Fermentas) se especifican en el procedimiento.

9.2. Equipos y otros materiales.

- Cámara para electroforesis (Deltech).
- Fuente de poder (Apparatus Corporation EC 105)
- Fotodocumentador (Kodak, Gel Logic 1500).
- Speed Vac (Thermo Savant ISS110).
- Termociclador (Techne, TC-412).
- Microcentrífuga (Eppendorf, 5415 C W/Rotor 14000 RPM).

9.3. Tablas anexas.

Tabla 18. Distribución de Chi Cuadrado χ^2 . P = Probabilidad de encontrar un valor mayor o igual que el chi cuadrado tabulado; v = Grados de libertad (g.l.). Obtenido de http://www.cema.edu.ar/~rst/Simulacion_de_Sistemas/Teoria/tablachicuadrado.pdf

v/p	0,001	0,0025	0,005	0,01	0,025	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5
1	10,8274	9,1404	7,8794	6,6349	5,0239	3,8415	2,7055	2,0722	1,6424	1,3233	1,0742	0,8735	0,7083	0,5707	0,4549
2	13,8150	11,9827	10,5965	9,2104	7,3778	5,9915	4,6052	3,7942	3,2189	2,7726	2,4079	2,0996	1,8326	1,5970	1,3863
3	16,2660	14,3202	12,8381	11,3449	9,3484	7,8147	6,2514	5,3170	4,6416	4,1083	3,6649	3,2831	2,9462	2,6430	2,3660
4	18,4662	16,4238	14,8602	13,2767	11,1433	9,4877	7,7794	6,7449	5,9886	5,3853	4,8784	4,4377	4,0446	3,6871	3,3567
5	20,5147	18,3854	16,7496	15,0863	12,8325	11,0705	9,2363	8,1152	7,2893	6,6257	6,0644	5,5731	5,1319	4,7278	4,3515
6	22,4575	20,2491	18,5475	16,8119	14,4494	12,5916	10,6446	9,4461	8,5581	7,8408	7,2311	6,6948	6,2108	5,7652	5,3481
7	24,3213	22,0402	20,2777	18,4753	16,0128	14,0671	12,0170	10,7479	9,8032	9,0371	8,3834	7,8061	7,2832	6,8000	6,3458
8	26,1239	23,7742	21,9549	20,0902	17,5345	15,5073	13,3616	12,0271	11,0301	10,2189	9,5245	8,9094	8,3505	7,8325	7,3441
9	27,8767	25,4625	23,5893	21,6660	19,0228	16,9190	14,6837	13,2880	12,2421	11,3887	10,6564	10,0060	9,4136	8,8632	8,3428
10	29,5879	27,1119	25,1881	23,2093	20,4832	18,3070	16,9872	14,5339	13,4420	12,5489	11,7807	11,0971	10,4732	9,8922	9,3418
11	31,2635	28,7291	26,7569	24,7250	21,9200	19,6752	17,2750	15,7671	14,6314	13,7007	12,8987	12,1836	11,5298	10,9199	10,3410
12	32,9092	30,3182	28,2997	26,2170	23,3367	21,0261	18,5493	16,9893	15,8120	14,8454	14,0111	13,2661	12,5838	11,9463	11,3403
13	34,5274	31,8830	29,8193	27,6882	24,7356	22,3620	19,8119	18,2020	16,9848	15,9839	15,1187	14,3451	13,6356	12,9717	12,3398
14	36,1239	33,4262	31,3194	29,1412	26,1189	23,6848	21,0641	19,4062	18,1508	17,1169	16,2221	15,4209	14,6853	13,9961	13,3393
15	37,6978	34,9494	32,8015	30,5780	27,4884	24,9958	22,3071	20,6030	19,3107	18,2451	17,3217	16,4940	15,7332	15,0197	14,3389
16	39,2518	36,4555	34,2671	31,9999	28,8453	26,2962	23,5418	21,7931	20,4651	19,3689	18,4179	17,5646	16,7795	16,0425	15,3385
17	40,7911	37,9462	35,7184	33,4087	30,1910	27,5871	24,7690	22,9770	21,6146	20,4887	19,5110	18,6330	17,8244	17,0646	16,3382
18	42,3119	39,4220	37,1564	34,8052	31,5264	28,8693	25,9894	24,1555	22,7595	21,6049	20,6014	19,6993	18,8679	18,0860	17,3379
19	43,8194	40,8847	38,5821	36,1908	32,8523	30,1435	27,2036	25,3289	23,9004	22,7178	21,6891	20,7638	19,9102	19,1069	18,3376
20	45,3142	42,3358	39,9969	37,5663	34,1696	31,4104	28,4120	26,4976	25,0375	23,8277	22,7745	21,8265	20,9514	20,1272	19,3374
21	46,7963	43,7749	41,4009	38,9322	35,4789	32,6706	29,6151	27,6620	26,1711	24,9348	23,8578	22,8876	21,9915	21,1470	20,3372
22	48,2676	45,2041	42,7957	40,2894	36,7807	33,9245	30,8133	28,8224	27,3015	26,0393	24,9390	23,9473	23,0307	22,1663	21,3370
23	49,7276	46,6231	44,1814	41,6383	38,0756	35,1725	32,0069	29,9792	28,4288	27,1413	26,0184	25,0055	24,0689	23,1852	22,3369
24	51,1790	48,0336	45,5584	42,9798	39,3641	36,4150	33,1962	31,1325	29,5533	28,2412	27,0960	26,0625	25,1064	24,2037	23,3367
25	52,6187	49,4351	46,9280	44,3140	40,6465	37,6525	34,3816	32,2825	30,6752	29,3388	28,1719	27,1143	26,1430	25,2218	24,3366
26	54,0511	50,8291	48,2898	45,6416	41,9231	38,8851	35,5632	33,4295	31,7946	30,4346	29,2463	28,1740	27,1789	26,2395	25,3365
27	55,4751	52,2152	49,6450	46,9628	43,1945	40,1133	36,7412	34,5736	32,9117	31,5284	30,3193	29,2246	28,2141	27,2569	26,3363
28	56,8918	53,5939	50,9936	48,2782	44,4608	41,3372	37,9159	35,7150	34,0266	32,6205	31,3909	30,2791	29,2486	28,2740	27,3362
29	58,3006	54,9662	52,3355	49,5878	45,7223	42,5569	39,0875	36,8538	35,1394	33,7109	32,4612	31,3348	30,2825	29,2908	28,3361

v/p	0,55	0,6	0,65	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	0,975	0,99	0,995	0,9975	0,999
1	0,3573	0,2750	0,2059	0,1485	0,1015	0,0642	0,0358	0,0158	0,0039	0,0010	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000
2	1,1957	1,0217	0,8616	0,7133	0,5754	0,4463	0,3250	0,2107	0,1026	0,0506	0,0201	0,0100	0,0050	0,0020
3	2,1095	1,8692	1,6416	1,4237	1,2125	1,0052	0,7978	0,5844	0,3518	0,2158	0,1148	0,0717	0,0449	0,0243
4	3,0469	2,7528	2,4701	2,1947	1,9226	1,6488	1,3665	1,0636	0,7107	0,4844	0,2971	0,2070	0,1449	0,0908
5	3,9959	3,6555	3,3251	2,9999	2,6746	2,3425	1,9938	1,6103	1,1455	0,8312	0,5543	0,4118	0,3075	0,2102
6	4,9519	4,5702	4,1973	3,8276	3,4546	3,0701	2,6613	2,2041	1,6354	1,2373	0,8721	0,6757	0,5266	0,3810
7	5,9125	5,4932	5,0816	4,6713	4,2549	3,8223	3,3583	2,8331	2,1673	1,6899	1,2390	0,9893	0,7945	0,5985
8	6,8766	6,4226	5,9753	5,5274	5,0706	4,5936	4,0782	3,4895	2,7326	2,1797	1,6465	1,3444	1,1042	0,8571
9	7,8434	7,3570	6,8763	6,3933	5,8988	5,3801	4,8165	4,1682	3,3251	2,7004	2,0879	1,7349	1,4501	1,1519
10	8,8124	8,2955	7,7832	7,2672	6,7372	6,1791	5,5701	4,8652	3,9403	3,2470	2,5582	2,1558	1,8274	1,4787
11	9,7831	9,2373	8,6952	8,1479	7,5841	6,9887	6,3364	5,5778	4,5748	3,8157	3,0535	2,6032	2,2321	1,8338
12	10,7553	10,1820	9,6115	9,0343	8,4384	7,8073	7,1138	6,3038	5,2260	4,4038	3,5706	3,0738	2,6612	2,2141
13	11,7288	11,1291	10,5315	9,9257	9,2991	8,6339	7,9008	7,0415	5,8919	5,0087	4,1069	3,5650	3,1118	2,6172
14	12,7034	12,0785	11,4548	10,8215	10,1653	9,4673	8,6963	7,7895	6,5706	5,6287	4,6604	4,0747	3,5820	3,0407
15	13,6790	13,0298	12,3809	11,7212	11,0365	10,3070	9,4993	8,5468	7,2609	6,2621	5,2294	4,6009	4,0697	3,4825
16	14,6555	13,9827	13,3096	12,6243	11,9122	11,1521	10,3090	9,3122	7,9616	6,9077	5,8122	5,1422	4,5734	3,9417
17	15,6328	14,9373	14,2406	13,5307	12,7919	12,0023	11,1249	10,0852	8,6718	7,5642	6,4077	5,6973	5,0916	4,4162
18	16,6108	15,8932	15,1738	14,4399	13,6753	12,8570	11,9462	10,8649	9,3904	8,2307	7,0149	6,2648	5,6234	4,9048
19	17,5894	16,8504	16,1089	15,3517	14,5620	13,7158	12,7727	11,6509	10,1170	8,9065	7,6327	6,8439	6,1673	5,4067
20	18,5687	17,8088	17,0458	16,2659	15,4518	14,5784	13,6039	12,4426	10,8508	9,5908	8,2604	7,4338	6,7228	5,9210
21	19,5485	18,7683	17,9843	17,1823	16,3444	15,4446	14,4393	13,2396	11,5913	10,2829	8,8972	8,0336	7,2889	6,4467
22	20,5288	19,7288	18,9243	18,1007	17,2396	16,3140	15,2787	14,0415	12,3380	10,9823	9,5425	8,6427	7,8648	6,9829
23	21,5095	20,6902	19,8657	19,0211	18,1373	17,1865	16,1219	14,8480	13,0905	11,6885	10,1957	9,2604	8,4503	7,5291
24	22,4908	21,6525	20,8084	19,9432	19,0373	18,0618	16,9686	15,6587	13,8484	12,4011	10,8563	9,8862	9,0441	8,0847
25	23,4724	22,6156	21,7524	20,8670	19,9393	18,9397	17,8184	16,4734	14,6114	13,1197	11,5240	10,5196	9,6462	8,6494
26	24,4544	23,5794	22,6975	21,7924	20,8434	19,8202	18,6714	17,2919	15,3792	13,8439	12,1982	11,1602	10,2561	9,2222
27	25,4367	24,5440	23,6437	22,7192	21,7494	20,7030	19,5272	18,1139	16,1514	14,5734	12,8785	11,8077	10,8733	9,8029
28	26,4195	25,5092	24,5909	23,6475	22,6572	21,5880	20,3857	18,9392	16,9279	15,3079	13,5647	12,4613	11,4973	10,3907
29	27,4025	26,4751	25,5391	24,5770	23,5666	22,4751	21,2468	19,7677	17,7084	16,0471	14,2564	13,1211	12,1278	10,9861