

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**Facultad de Medicina  
Maestría en Ciencias Médicas  
Sede:  
Instituto Nacional de Perinatología  
“Isidro Espinosa de los Reyes”**

**“DETERMINACIÓN DE HOMOCISTEÍNA EN  
RECIÉN NACIDOS DE TÉRMINO Y SU ASOCIACIÓN  
CON EL POLIMORFISMO C677T DEL GEN DE LA  
METILEN-TETRAHIDROFOLATO REDUCTASA  
(MTHFR)”.**

**T e s i s**

**Que para obtener el título de  
Maestra en Ciencias Médicas  
PRESENTA:**

**DRA. LEYLA MARIA ARROYO CABRALES**

---

**VoBo ASESOR: DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS  
COVARRUBIAS**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

Facultad de Medicina  
Maestría en Ciencias Médicas  
Sede:  
Instituto Nacional de Perinatología  
“Isidro Espinosa de los Reyes”

“DETERMINACIÓN DE HOMOCISTEÍNA  
EN RECIÉN NACIDOS DE TÉRMINO Y SU  
ASOCIACIÓN CON EL POLIMORFISMO  
C677T DEL GEN DE LA METILEN-  
TETRAHIDROFOLATO REDUCTASA  
(MTHFR)”.

## T e s i s

Que para obtener el título de  
Maestra en Ciencias Médicas

PRESENTA:

**DRA. LEYLA MARIA ARROYO CABRALES**

**ASESOR: DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS  
COVARRUBIAS**



## INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>CAPITULO I: Marco Teórico y Conceptual.</b>	
1.1 Introducción	4
1.2 Antecedentes Bibliográficos	5
1.3 Planteamiento del problema	11
1.4 Justificación	12
1.5 Hipótesis	13
1.6 Objetivos	14
<b>CAPITULO II: Material y Métodos.</b>	
2.1 Diseño	15
2.2 Universo	16
2.3 Unidades de observación.	16
2.4 Muestra y cálculo del tamaño muestral	16
2.5 Criterios de inclusión	17
2.6 Criterios de exclusión	17
2.7 Criterios de eliminación	17
2.8 Metodología	18
2.9 Definición de variables	26
2.10 Análisis estadístico	27
2.11 Aspectos éticos	28
<b>CAPITULO III: Resultados.</b>	<b>29</b>
<b>CAPITULO IV: Discusión.</b>	<b>31</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>34</b>
<b>Anexo 1. Carta de Autorización.</b>	<b>38</b>
<b>Anexo 2. Hoja de Recolección de Datos.</b>	<b>39</b>
<b>Cuadro I. Frecuencias genotípicas y alélicas.</b>	<b>40</b>
<b>Cuadro II. Características generales de la población.</b>	<b>41</b>
<b>Cuadro III. Niveles de homocisteína en grupos.</b>	<b>42</b>
<b>Figura 1. Producción de homocisteína.</b>	<b>43</b>
<b>Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.</b>	<b>44</b>
<b>Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 4%.</b>	<b>45</b>

## **“DETERMINACIÓN DE HOMOCISTEÍNA EN RECIÉN NACIDOS A TÉRMINO Y SU ASOCIACIÓN CON EL POLIMORFISMO C677T DEL GEN DE LA METILEN-TETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (MTHFR)”.**

### **RESUMEN.**

Estudio de asociación de las concentraciones de homocisteína en sangre de recién nacidos de término con o sin suplementación de ácido fólico con el polimorfismo C677T del gen de la metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Se investigó una muestra consecutiva de recién nacidos a término sin antecedentes de complicaciones durante el embarazo, evaluando muestras en sangre del cordón umbilical de los recién nacidos, las cuales fueron procesadas en el Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”

### **Objetivo:**

Establecer la asociación entre los valores de homocisteína y el polimorfismo C677T del gen de la MTHFR en recién nacidos a término en una muestra de recién nacidos mexicanos.

### **Diseño:**

Estudio transversal, prolectivo y analítico con muestra consecutiva conformado por todos los recién nacidos entre el 1° de Enero al 31 de Diciembre de 2004 en el Instituto Nacional de Perinatología que cumplieron los criterios de selección.

### **Resultados:**

Se incluyeron 119 recién nacidos, de los cuales 13 se eliminaron por existir problemas técnicos con las muestras, quedando un total de 106 pacientes incluidos en el estudio. La población se analizó de acuerdo a la presencia del polimorfismo, se hicieron tres grupos: homocigotos sin polimorfismo (CC) 19 pacientes (17.9%), heterocigotos (CT) 53 pacientes (50%) y homocigotos con polimorfismo (TT) 34 pacientes (32%). Las frecuencias alélicas fueron de C 91 (43%) y de T 121 (57%). Los niveles de homocisteína en sangre fueron de: 5.47 (1.88-10.78, D.S. 2.36)  $\mu\text{mol/L}$  en homocigotos sin polimorfismo; 6.56 (2.32-19.96, D.S. 3.78)  $\mu\text{mol/L}$  en heterocigotos y 6.47 (1.99-16.61, D.S. 3.83)  $\mu\text{mol/L}$  en

homocigotos con polimorfismo. Se calcularon frecuencias absolutas y relativas, medidas de resumen y dispersión para las diversas variables de comparación entre grupos; se realizó una Prueba de Kruskal-Wallis para determinar diferencias o no en las concentraciones de homocisteína, peso de los recién nacidos, ácido fólico ingerido, sin haberse encontrado diferencias estadísticamente significativas.

**Discusión:**

El estudio demostró una elevada frecuencia del genotipo de la MTHFR en heterocigotos que coincide con lo reportado en la literatura para población mexicana.

Nuestros datos no permiten establecer una asociación significativa del polimorfismo C677T del gen de la MTHFR y las concentraciones de homocisteína; así como tampoco diferencia en homocisteína con relación al antecedente de administración de ácido fólico.

Los resultados indican una alta prevalencia de la mutación, en recién nacidos de término eutróficos mexicanos, sin relación en cuanto a los niveles de homocisteína.

**Conclusiones:**

Reconociendo el alto riesgo de mujeres embarazadas para alteraciones vasculares y defectos congénitos, se hace importante establecer un posterior seguimiento neonatal y comportamiento clínico en relación a niveles de homocisteína y del polimorfismo de la mutación C677T de la MTHFR para establecer en un futuro una posible relación con morbilidad perinatal. La intención es generar un estudio predictivo y preventivo de los casos de homocigotos a través de la dieta o la suplementación con ácido fólico que los proteja durante el desarrollo.

## **CAPITULO I: MARCO TEORICO Y CONCEPTUAL.**

### **1.1 INTRODUCCION.**

La hiperhomocisteinemia se ha considerado un factor de riesgo para afecciones cardiovasculares, neoplasias, patologías neuropsiquiátricas y malformaciones congénitas, como los defectos del tubo neural.<sup>1</sup> Se conoce que las mutaciones en los genes que codifican para las enzimas de las vías metabólicas de la homocisteína pueden ocasionar hiperhomocisteinemia; entre estas mutaciones se encuentra la de C677T del gen de la metileno-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR).

Se ha reportado una alta prevalencia de la mutación C677T del gen de la MTHFR, en estudios realizados en diferentes poblaciones en México.<sup>2,3</sup>

Las diferentes versiones de una secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) en una localización cromosómica específica (locus) se denominan alelos, cuando los alelos aparecen en más del 1% de los cromosomas de la población general, constituyen lo que se conoce como polimorfismo genético. En cambio, los alelos con frecuencias menores al 1% son variantes raras.<sup>4</sup>

En recién nacidos de término, no se han determinado los niveles de homocisteína y su posible asociación con el polimorfismo C677T del gen de la MTHFR, por lo que fue de nuestro interés realizar este estudio para establecer en un futuro una posible relación con morbilidad neonatal.

## 1.2 ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.

La homocisteína es un aminoácido sulfúrico cuyo metabolismo inicia en la intersección de dos vías: la remetilación a metionina, que requiere folato y vitamina B12 y la transulfuración a cistationina, la que requiere serina y piridoxal-5'-fosfato. Las dos vías son coordinadas por S-adenosilmetionina, que actúa como un inhibidor alostérico de la reacción de la metileno-tetrahidrofolato reductasa y como un activador de la cistationa  $\beta$ -sintetasa.<sup>5</sup>

Los niveles de homocisteína en plasma se mantienen en límites bajos por la función de tres enzimas, que requieren vitaminas como cofactores. El folato es un cofactor para dos enzimas: metionina sintetasa y 5,10 MTHFR. Con el uso de la vitamina B<sub>12</sub> como el cofactor reactivo y 5-metiltetrahidrofolato como el grupo metilo donador, la metionina sintetasa cataliza la remetilación de homocisteína a metionina. La enzima MTHFR es necesaria para convertir la 5,10-metilen-tetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato. La tercera enzima, cistationina  $\beta$ -sintetasa, que requiere vitamina B<sub>6</sub> como un cofactor, agrega serina a la homocisteína para convertirla en cistationina, predominantemente en órganos catabólicos tales como el hígado.<sup>6</sup> (Figura 1).

El metabolismo de la homocisteína también es influenciado por variantes génicas de las enzimas, en especial la variante termolábil C677T de MTHFR, que causa reducción en la actividad enzimática.<sup>7</sup> Del 5 al 20% de la población normal es homocigota para esta variante, en ella se produce elevación rápida de las concentraciones de homocisteína en plasma y concentraciones de folato disminuídas en comparación con los heterocigotos o la población sin la mutación.<sup>8-10</sup>

La homocisteína es un aminoácido que contiene grupos tiol. Es producida por desmetilación intracelular de metionina y exportada al plasma, en donde circula principalmente en forma oxidada, unida a proteínas del plasma como un disulfuro



mixto de proteínas y homocisteína con albúmina, en forma de disulfuro de homocisteína y en pequeñas cantidades en forma reducida. La homocisteína total representa la suma de todas las formas de homocisteína encontradas en plasma o suero (libre y en forma oxidada).

En 1995, Frosst y cols<sup>11</sup> describieron una mutación del gen de la metilentratrahidrofolato reductasa (MTHFR) consistente en una sustitución de citosina por timina en el nucleótido 677 que cambia la alanina por valina en la posición 222 de la secuencia del aminoácido. Personas con el genotipo heterocigoto CT u homocigoto TT en el nucleótido 677, tienen de 30% a 40% y de 60% a 70% respectivamente disminuida la actividad de la enzima MTHFR, respectivamente. Portadores de TT también tienen moderada hiperhomocisteinemia.<sup>12,13</sup>

En años recientes diversos grupos han propuesto que los niveles elevados de homocisteína en plasma son un factor de riesgo para enfermedad cerebro vascular periférica y enfermedad coronaria<sup>14</sup> y durante el embarazo quizá están asociados con alteraciones en la función vascular de la placenta, la cual puede generar preeclampsia, abortos y otras complicaciones del embarazo.<sup>15-</sup>  
<sup>17</sup> También se han observado niveles elevados de homocisteína en plasma materno y en líquido amniótico durante embarazos complicados con fetos afectados con defectos del tubo neural.<sup>18,19</sup>

No es clara la forma en que la variación genética contribuye a la presencia de defectos de tubo neural; pero si se ha observado en diferentes estudios la asociación entre la presencia de tales defectos y el uso de ácido fólico así como de anomalías en el mecanismo de la homocisteína entre mujeres con embarazo previo afectado, donde se indicó examinar la variación genética de los genes relacionados con folato. Las formas más comunes de defectos de tubo neural son: espina bífida, anencefalia y encefalocele; otras como craneoraquisquis e iniencefalia ocurren más raramente.

Se ha demostrado la interrelación entre el genotipo de la MTHFR y el estado nutricional de los folatos. Cuando las concentraciones de folato eran altas, los niveles plasmáticos de homocisteína eran bajos y no existía relación con el genotipo de la MTHFR. Sin embargo cuando la concentración de folatos era baja, los niveles plasmáticos de homocisteína eran más altos en los homocigotos de la mutación C677T que en aquellos con genotipo normal, con esto se puede concluir que la expresión fenotípica de los genotipos de la MTHFR es dependiente de la disponibilidad de folatos.

El gen de la 5,10 MTHFR está localizado en el cromosoma 1 en la región p36. La secuencia de DNA complementaria es de 2.2 kilobases de largo y consta de 11 exones. El corte alternativo ocurre tanto en humanos como en ratones. En humanos, el producto mayor del gen de la MTHFR es una proteína catalíticamente activa de 77-kilodaltones, sin embargo una pequeña isoforma de aproximadamente 70 kilodaltones se ha observado en algunos tejidos. MTHFR cataliza la conversión de 5,10 metilen-tetrahidrofolato en 5-metiltetrahidrofolato, la cual es la forma circulante mayor del folato.<sup>20</sup>

El ácido fólico y MTHFR están envueltos en una vía bioquímica compleja. El folato, en su forma 5-metil, participa en la transferencia de un carbón solo que ocurre como parte de la síntesis de nucleótidos: la síntesis del S-adenosil-metionina: la remetilación de homocisteína a metionina; y la metilación de DNA, proteínas, neurotransmisores y fosfolípidos. La actividad normal de la MTHFR quizá ayude a mantener un fondo de folato circulante y metionina y posiblemente previene la elevación de la homocisteína.<sup>20</sup>

Este estudio se refiere a una mutación frecuente en el gen que codifica para la enzima MTHFR, C677T, la cual ha sido asociada con anomalías congénitas, enfermedades cardiovasculares y anomalías de coagulación.

El alelo C677T se refiere a una mutación puntual en la posición 677 del gen que codifica para la enzima MTHFR que consiste en el cambio del nucleótido citosina por el nucleótido timina; esta mutación resulta en la substitución del amino ácido de alanina por valina en la posición 222 de la enzima. El alelo C677T es llamado termolábil, debido a que la actividad de la enzima esta disminuida a 37°C o más. De esta manera, la actividad de MTHFR entre homocigotos C677T es 50 a 60% menor a 37°C y aproximadamente 65% más baja a 46°C comparada con controles. Los heterocigotos están en un rango intermedio.

Las personas que son homocigoto para el alelo C677T tienden a tener incrementados los niveles de homocisteína en sangre si su ingesta de folato es insuficiente, pero niveles normales si su ingesta de folato es adecuada.

Sin embargo, aumentar la ingesta de ácido fólico compensa la reducción de la actividad de la MTHFR, generada por la inestabilidad por termolabilidad y da como resultado concentraciones normales de homocisteína.<sup>21,22</sup>

La frecuencia poblacional del alelo C677T muestra variaciones étnicas y regionales. La frecuencia alélica es más alta en Italia y entre los Hispanos que viven en California y más baja entre los negros americanos y en algunas áreas de África Sub-Sahara. La frecuencia de homocigotos C677T muestra variabilidad similar.<sup>23</sup>

Mutchinik<sup>2</sup> reportó en un estudio que la mutación del gen C677T de la MTHFR y la presencia de homocigotos para esta mutación tiene una muy alta prevalencia en la población mexicana, siendo la más alta reportada, para una frecuencia en el gen para el alelo mutado de 0.586 y prevalencia para el homocigoto de 34.8%. De acuerdo a los hallazgos en dicho estudio, casi uno de cada tres individuos en la población mexicana tiene la variante termolábil de la enzima,<sup>2</sup> por lo que es considerado un polimorfismo.

Rozen y cols<sup>24</sup> reportan una menor proporción de homocigotos C677T entre los recién nacidos femeninos que entre los masculinos; sin embargo no existen otros estudios que reporten dicha diferencia.

La fisiopatogenia del daño provocado por la mutación C677T del gen de la MTHFR y la hiperhomocisteinemia ha sido relacionada con daño vascular. Desde 1969 McCully<sup>25</sup> la postuló como responsable de aterosclerosis. Las primeras investigaciones sobre la importancia de la alteración fueron descritas en 1976 relacionadas con problemas de coronariopatías.<sup>26</sup>

Los mecanismos de alteración de vasos sanguíneos han logrado determinar que la hiperhomocisteinemia actúa directamente en las paredes de los vasos sanguíneos ocasionando daño endotelial. Esto provoca fibrosis vascular y alteraciones funcionales endoteliales. Las células endoteliales se descaman por lo tanto se expone la capa subendotelial a la activación de la trombogénesis. La mutación C677T del gen de la MTHFR provoca disminución de la actividad de esta enzima alterando el metabolismo de los folatos y el adecuado funcionamiento del metabolismo de la homocisteína, lo cual origina hiperhomocisteinemia.

Se han descrito múltiples asociaciones entre patologías obstétricas y la mutación C677T del gen de la MTHFR, así como con hiperhomocisteinemia. Entre estas patologías se pueden mencionar la enfermedad hipertensiva inducida por el embarazo, desprendimiento prematuro de placenta normoinserta, defectos de tubo neural, restricción en el crecimiento intrauterino y pérdida gestacional recurrente.<sup>5</sup>

El polimorfismo C677T de MTHFR esta ampliamente distribuido en todo el mundo, existiendo en muchas poblaciones y grupos étnicos estudiados. Marcadores de heterogeneidad en frecuencias alélicas y prevalencia de homocigoto TT es un hallazgo común entre poblaciones.<sup>2</sup> La comparación

hecha entre estas poblaciones (negros, amerindios, caucásicos y asiáticos) y la población mexicana estudiada en los Estados Unidos mostró diferencia estadística significativa, sugiriendo que la alta prevalencia en la población mexicana de la mutación de C677T y el genotipo homocigoto TT quizá represente un marcador étnico genético característico de algunas poblaciones amerindias.<sup>2</sup>

En 2002, dos metaanálisis muestran que los individuos con el genotipo MTHFR 677 TT tienen un riesgo elevado de enfermedad coronaria cardiaca (CHD), particularmente en los que tienen estado con folato bajo, sugiriendo que las fallas en el metabolismo del folato resultan en niveles altos de homocisteína que esta causalmente relacionados con el incremento de riesgo para CHD.<sup>27,28</sup>

También se ha descrito por Jaminson y cols,<sup>29</sup> que pacientes con enfermedad renal terminal que fueron homocigotos T en el nucleótido 677 tuvieron mayor mortalidad que los de otros genotipos.

### **1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Se ha reconocido una alta prevalencia (uno de cada tres individuos<sup>2</sup>) en México de la mutación C677T del gen de la MTHFR que interviene en el metabolismo de la homocisteína y el ácido fólico asociada principalmente a defectos congénitos, alteraciones vasculares y pérdidas fetales. Los estudios realizados hasta el momento han sido en mujeres embarazadas; por lo anterior se considera importante conocer si existe una asociación entre la presencia del polimorfismo C677T del gen de la MTHFR y los niveles séricos de homocisteína en recién nacidos a término.

Con los antecedentes anteriores nos planteamos la siguiente pregunta:

¿Existe una asociación entre la presencia del polimorfismo C677T del gen de la MTHFR y los niveles séricos de homocisteína en recién nacidos a término?

#### **1.4 JUSTIFICACION.**

Se tiene poca información de los valores de homocisteína en recién nacidos a término y en especial en niños mexicanos no existe información. Se ha reconocido una alta prevalencia del polimorfismo del gen C677T en la población mexicana que interviene en el metabolismo del ácido fólico y la homocisteína, asociada principalmente a defectos congénitos, alteraciones vasculares y pérdidas fetales.

En México la mayoría de los estudios realizados hasta el momento han sido en mujeres embarazadas, por lo anterior se considera importante conocer si existe una asociación entre los niveles séricos de homocisteína en recién nacidos sanos mexicanos y presencia de la mutación C677T del gen de la MTHFR.

## **1.5 HIPOTESIS.**

H: Los niveles de homocisteína no se encuentran asociados a la presencia del polimorfismo MTHFR C677T en recién nacidos a término.

Ha: Los niveles de homocisteína se encuentran asociados a la presencia del polimorfismo MTHFR C677T.



## **1.6 OBJETIVOS.**

### **OBJETIVO GENERAL:**

Establecer la asociación entre los valores de homocisteína y el polimorfismo C677T del gen de la MTHFR en recién nacidos a término en una muestra de pacientes mexicanos..

### **OBJETIVOS SECUNDARIOS:**

Conocer la frecuencia del polimorfismo en una muestra de recién nacidos mexicanos.

Conocer los valores séricos de homocisteína en una muestra de pacientes recién nacidos mexicanos.

## **CAPITULO II: MATERIAL Y METODOS**

### **2.1 DISEÑO.**

Tipo de estudio:

- \* Por la participación del investigador: Descriptivo
- \* Por la temporalidad del estudio: Tansversal
- \* Por la temporalidad de los datos. Prolectivo
- \* Por análisis de los datos: Analítico

## **2.2 UNIVERSO.**

El universo estuvo conformado por todos los recién nacidos entre el 1° de Enero al 31 de Diciembre de 2004 en el Instituto Nacional de Perinatología .

## **2.3 UNIDADES DE OBSERVACIÓN.**

Los recién nacidos a término entre el 1° de Enero al 31 de Diciembre de 2004 en el Instituto Nacional de Perinatología, que cumplieron con los criterios de selección y en los cuales se obtuvo el consentimiento informado.

## **2.4 MUESTRA Y CALCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL.**

No probabilístico.

Casos consecutivos de acuerdo a la temporalidad del estudio.

## **2.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.**

1. Recién nacidos a término nacidos en la unidad tocoquirúrgica del Instituto Nacional de Perinatología.
2. Sin malformaciones congénitas.
3. Productos de embarazos no complicados.
4. Con consentimiento informado.

## **2.6 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.**

1. Recién nacidos hijos de madres con preeclampsia-eclampsia, diabetes meliitus o diabetes gestacional, hipertiroidismo o hipotiroidismo o alguna otra enfermedad.

## **1.7 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.**

1. Recién nacidos en quiénes posteriormente al nacimiento se diagnosticó alguna malformación congénita.
2. Recién nacidos en quiénes alguna de las muestras de sangre no se analizó.

## **1.8 METODOLOGIA.**

El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” del 1º de enero al 31 de diciembre de 2004. De acuerdo a los criterios de selección se solicitó la firma de la Carta de Consentimiento de Participación Voluntaria. Se colectaron las muestras de sangre de cordón umbilical de recién nacidos que cumplieron los criterios de selección y previa firma del consentimiento. Se tomaron dos tubos: uno con tapón morado con anticoagulante (edta) de 3 ml y otro con tapón rojo sin heparina de 5 ml, por residentes de neonatología. Las muestras se procesaron antes de las 24 Hs. Se enviaron al Laboratorio de Biomédica del 3er piso de la Torre de Investigación, donde se procesaron en el sistema IMx<sup>®</sup> de Abbott diagnostics para determinación de las concentraciones de homocisteína.

### **Determinación de las concentraciones de homocisteína:**

Los niveles de homocisteína se cuantificaron a través del inmunoensayo de polarización fluorescente (FPIA). El ensayo IMx<sup>®</sup> de homocisteína (ABBOTT, Diagnostic división) determina en forma cuantitativa la L-Homocisteína (HCY) total en suero o plasma humano a través del analizador IMx<sup>®</sup>. El inmunoensayo de polarización fluorescente (FPIA) combina dos tecnologías para determinar la concentración analítica: la unión competitiva a las proteínas y la polarización fluorescente. La substancia a analizar proveniente de la muestras (L-homocisteína) compite con la substancia a analizar ligada al trazador por los puntos de unión de los anticuerpos específicos.

Los reactivos IMx<sup>®</sup> homocisteína y la muestra se dispensan en el cartucho de muestra FPIA en el orden siguiente:

- El sistema sonda/electrodo dispensa la muestra, la solución de pretratamiento, las enzimas y el tampón de dilución FPIA en el pocillo de predilución del cartucho de muestra.

- La solución de pretratamiento reduce la homocisteína presente en el suero a otra forma química, la homocisteína.
- Las enzimas transforman la homocisteína en S-adenosil-L-homocisteína (SAH).
- Una alícuota de la mezcla de predilución, el anticuerpo y el tampón de dilución FPIA, se dispensan en la cubeta y el sistema óptico FPIA mide la intensidad de fondo.
- La SAH y el trazador marcado con fluoresceína compiten por los sitios de unión de las moléculas del anticuerpo monoclonal.
- La intensidad de la luz polarizada fluorescente se mide con el sistema óptico FPIA.

#### **Preparación de la muestra:**

- Se utilizaron muestras de suero ó plasma (colectadas con EDTA tripotásico o heparina de litio).
- Debido a que la síntesis de la homocisteína sigue realizándose en los eritrocitos tras la recolección de las muestras, es importante centrifugar y separar las células del suero ó del plasma. Las muestras se pudieron almacenar a 4°C hasta 6 Hrs antes de la separación por centrifugación.
- El volumen de muestra mínimo necesario que se requirió es de 50ul.
- Los resultados se reportan en  $\mu\text{mol/l}$ , los valores de referencia varían de laboratorio a laboratorio, edad, sexo, zona geográfica y factores genéticos, aunque en la mayoría se aceptan valores entre 5 y 15  $\mu\text{mol/l}$

#### **Determinación de la concentración de homocisteína.**

Las HCY unida (formas oxidadas) se reducen a homocisteína libre, utilizando ditriotreitól (DTT). La HCY total libre se convierte en S-adenosil-L-homocisteína

(SAH) utilizando la enzima SAH hidrolasa y un exceso de adenosina. Una alícuota de la mezcla de predilución, los anticuerpos y el tampón de dilución FPIA nº 1, se dispensan en la cubeta y el sistema óptico FPIA mide la intensidad del fondo.

El Trazador (S-adenosil-L-cisteína marcada con fluoresceína en tampón fosfato con estabilizante proteínico), el tampón de dilución FPIA nº 1 y una segunda alícuota de la mezcla de predilución, se transfieren a la cubeta. La S-adenosil-L-homocisteína (SAH) y el trazador marcado con fluoresceína compiten por los sitios de unión de las moléculas del anticuerpo monoclonal. La intensidad de la luz polarizada fluorescente se mide con el sistema óptico FPIA.

### **Identificación del polimorfismo de la mutación C677T:**

Se realizó el proceso de extracción de DNA por medio del kit Wizard Genomic DNA Purification de Promega, al cual le siguió la técnica de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction, PCR; Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) que permite la genotipificación de una mutación o polimorfismo conocido.

Los productos amplificados (PCR) y digeridos (RFLP) con enzimas de restricción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa.

### **Extracción y purificación del DNA genómico.**

Un aspecto fundamental en el análisis molecular de las muestras es la obtención de DNA en cantidades razonables y de alta pureza. Existen varias metodologías que permiten su obtención partiendo de diferentes fuentes; en este estudio, se realizó la extracción de DNA, en todos los recién nacidos incluidos en el estudio, a partir de leucocitos obtenidos de sangre periférica, mediante el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), de acuerdo a las condiciones del proveedor.

### **Aislamiento del DNA genómico a partir de sangre de cordón umbilical.**

Obtención de la muestra.

1. Extracción en tubo Vacutainer (EDTA) 3 ml de sangre de cordón.
2. Homogenizar suavemente por inversión.

3. Almacenar a temperatura ambiente y procesar lo más rápido posible.

#### **Lisis celular y nuclear.**

1. A un tubo estéril, con capacidad de 1.5 ml adicionar 0.9 ml de solución de lisis celular.
2. Transferir los 300  $\mu$ l de sangre, mezclar por inversión e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Invertir 5 a 6 veces durante la incubación.
3. Centrifugar a 16,000 x g por 2 min. Remover y desechar el sobrenadante sin perturbar el pellet blanco, dejando de 10 a 20  $\mu$ l de líquido residual.
4. Mezclar en vortex para resuspender los leucocitos, 10 a 20 seg.
5. Adicionar 300  $\mu$ l de la solución de lisis nuclear y pipetear varias veces para lisar los leucocitos, la solución se pondrá muy viscosa. Ocasionalmente se requiere incubar a 37°C por una hora, cuando se observan grumos celulares.

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

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

#### **Precipitación de proteínas.**

1. Adicionar 100  $\mu$ l de la solución de precipitación de proteínas.
2. Mezclar vigorosamente (Vortex) por 20 segundos.
3. Centrifugar a 16 000 x g por 3 min.

Se observaran las proteínas precipitadas en un pellet café oscuro.



### **Precipitación del DNA.**

1. Transferir el sobrenadante a un tubo estéril de 1.5 ml que contenga 300 µl de isopropanol.
2. Mezclar la muestra por inversión suave hasta que el DNA forme un conglomerado.
3. Centrifugar a 16 000 x g por 3 min. El ADN se visualiza como un botón blanco.
4. Decantar el sobrenadante y agregar 300 µl de etanol al 70%. Invertir el tubo suavemente para lavar el botón de DNA.
5. Centrifugar a 16 000 x g por 1 min. Retirar cuidadosamente el etanol. El botón puede perderse si el tubo se agita al retirar el etanol.
6. Secar el tubo en papel absorbente y dejar secar la muestra a temperatura ambiente por 10-15 min.

### **Hidratación del DNA**

1. Adicionar 100 µl de la solución de hidratación.
2. Dejar re-hidratándose toda la noche a temperatura ambiente. Alternativamente, calentar a 65° C por una hora. Mezclar periódicamente para dispersar el DNA.
3. Almacenar de 2 a 8° C.

Se valora la integridad y concentración del DNA mediante dos procesos; Electroforesis en gel de agarosa al 1% y Espectrofotometría ( $\lambda$  280 nm).

### **Tipificación del polimorfismo genético**

#### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La PCR es una técnica descrita en 1991, por Mullis de la corporación CETUR. Permite la amplificación de segmentos específicos de DNA de manera

exponencial, utilizando la propiedad del DNA de poder desnaturalizarse, renaturalizarse y replicarse. Los segmentos a amplificar se delimitan con oligonucleótidos cortos (primers). Se utiliza la enzima termoestable Taq polimerasa (obtenida del microorganismo *Thermophilus aquaticus*) para replicar los fragmentos de interés. La PCR realiza tres ciclos fundamentales:

- 1) **Desnaturalización** (94-100°C), en la que las cadenas del DNA se separan para generar un molde de hebra simple.
- 2) **Alineamiento** (45-60°C), utilizando condiciones de hibridación que garanticen que los primers se unirán solamente a secuencias complementarias (blanco) y no a secuencias inespecíficas.
- 3) **Extensión o amplificación** (Replicación de DNA) (alrededor de 72°C). La Taq polimerasa replica el fragmento del gen.

Estos 3 ciclos se repiten de 25 a 35 veces, las hebras sintetizadas sirven como molde para los siguientes ciclos, por lo que la replicación del fragmento del gen de interés, es una forma exponencial.

Adicionar en un tubo de reacción de 0.2 ml:

- El volumen equivalente a 500 ng de DNA genómico.
- Buffer 10X (5µl)
- Dimetil-sulfoxido (DMSO) (2.5 µl)
- MgCl<sub>2</sub> 50mM (1µl)
- Desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's) 2.5mM (1µl)
- Oligonucleótido F\* 200mM (1µl)
- Oligonucleótido R\* 200mM (1µl)
- 0.75U de Taq polimerasa (1unidad=0.3 µl)
- Aforar con agua bidestilada a un volumen final de 50 µL

<b>Primers</b>
*5´ GCA GGG AGC TTT GAG GCT GAC-3´
*5´ AGG ACG GTG CGG TGA GAT G-3´

Se programaron 35 ciclos de amplificación en el termociclador (Eppendorf, Mastecycler gradient):

Desnaturalización	92°C	60s
Alineación	60°C	30s
Extensión	72°C	30s
Extensión final	72°C	7min

Se amplificó la porción del gen donde se localizó la mutación, eso se determinó a través de un blast en Pubmed, donde se analizó la secuencia a amplificar y también se corroboró por secuenciación (datos no mostrados).

**Los productos de PCR son sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% con objeto de confirmar la presencia de los fragmentos amplificados.**

**Digestión con la enzima de restricción.**

**Digestión de los productos amplificados con la enzima de restricción *Hinfl*.**

La enzima de restricción *Hinfl*, es purificada de *Haemophilus aegyptius*, esta enzima reconoce la secuencia 5'-GG / CC-3'.

**Análisis del polimorfismo del gen .**

1. Adicionar en un tubo de 2mL

a. De la reacción de PCR 20 µl.

- b. Enzima *Hinfl* (0.03  $\mu$ l)
- c. Buffer específico de la enzima (2.5  $\mu$ l)
- d. Agua (2.47  $\mu$ l)

Para que la enzima empiece a digerir los fragmentos de DNA requiere condiciones de temperatura adecuadas, por lo tanto, después de adicionar a cada tubo lo arriba mencionado las muestras se colocan en un baño a 37° C por dos horas. Concluido el tiempo de digestión los productos de esta se someten a electroforesis en gel de agarosa al 4% con objeto de observar la presencia de los fragmentos digeridos. El fragmento original de la reacción de PCR mide 198 bp, cuando la enzima digiere genera dos fragmentos uno de 175 pb y otro de 23 pb, este último generalmente no se observa. Con este patrón de bandas sobre el gel se tipifican las muestras en homocigotos sin sitio de corte (AA), en heterocigotos (AG) y homocigotos con sitio de corte (GG).

Para confirmar que los amplicones corresponden a la región de interés, se realizó la secuenciación automatizada de DNA al momento de la estandarización de la técnica.

De acuerdo con la presencia del polimorfismo se hicieron tres grupos: homocigotos sin polimorfismo (CC), heterocigoto (TC) y homocigotos con polimorfismo (TT).

(Figuras 2 y 3).

## 2.9 DEFINICION DE VARIABLES.

1. Ácido fólico: es una forma de folato, vitamina. Variable cuantitativa continua.
2. Homocisteína: es un ácido amino sulfúrico. Variable cuantitativa continua.
3. Polimorfismo del gen C677T de la metiltetrahidroxifolato: Variable cualitativa nominal, dicotómica: si existe o no existe.
4. Sexo: género designado como femenino o masculino. Variable cualitativa nominal, dicotómica.
5. Peso: es la unidad en gramos que se registra al valorar la masa corporal. Variable cuantitativa continua.
6. Edad gestacional: determinación del tiempo de duración de la gestación, número obtenido a través de la fecha de la última menstruación en caso de ser conocida y confiable; o bien por valoración física al momento del nacimiento (Valoración de Capurro). Variable cuantitativa continua.
7. Patología materna: condición materna presente durante el embarazo como preeclampsia-eclampsia, diabetes mellitus o gestacional, hipertiroidismo, etc. Variable cualitativa nominal, dicotómica: sí presente, no ausente.

### **Variable predictora:**

Polimorfismo C677T del gen de la MTHFR.

### **Variable de desenlace:**

Homocisteinemia

## 2.10 ANALISIS ESTADISTICO.

Se describió la población demográfica.

Se obtuvieron las medidas de tendencia central y de dispersión:

- 1) Las variables cuantitativas continuas (homocisteína, peso, talla, edad gestacional): promedio y desviación estándar.
- 2) Las variables ordinales (Apgar, Silverman): mediana.
- 3) Las variables cualitativas nominales (sexo, vía de nacimiento): frecuencias, tasas o porcentajes.

Para analizar las diferencias entre los grupos CC, CT y TT se realizó una Prueba de Kruskal-Wallis, por tener una distribución anormal, con una Curtosis de 0.695 y un Sesgo de 0.936.

## **2.11 ASPECTOS ETICOS.**

La investigación se considero sin riesgo para los pacientes.

Se solicito autorización por escrito, se anexa carta de participación voluntaria (anexo1).

### **CAPITULO III: RESULTADOS**

Se incluyeron 119 recién nacidos, de los cuales 13 se eliminaron por existir problemas técnicos con las muestras, quedando un total de 106 que fueron incluidos en el análisis. La presencia del polimorfismo se presentó con la siguiente distribución: homocigotos sin polimorfismo (silvestres CC) 19 pacientes (17.9%), heterocigotos (CT) 53 pacientes (50%) y homocigotos con polimorfismo (mutados TT) 34 pacientes (32%). Las frecuencias alélicas fueron de C 91 (43%) y T 121 (57%). Las frecuencias genotípicas y alélicas se muestran en el cuadro I.

Las características generales de la población estudiada se describen en el cuadro II.

El promedio de la edad materna fue de 26.7 años (14 - 44  $\pm$  8.2). Las madres recibieron suplemento de ácido fólico en 83 casos (78.3%) siendo el mes de inicio del suplemento desde 8 meses pregestacionales hasta el 7° mes de embarazo, y el mes en que se suspendió el suplemento fue desde el inicio del embarazo hasta el término del mismo, en promedio a los 6.2  $\pm$  3.7 meses. La suplementación que recibieron fue de 400 a 5000  $\mu$ gr con un promedio de 818  $\pm$  1174  $\mu$ gr. La vía de nacimiento fue en 38 pacientes (35.8%) eutocia, en 2 (1.9%) distocia y cesárea en 66 (62.3%).

Los recién nacidos correspondieron al sexo femenino en el 54.7%. (n=58) y al sexo masculino 45.3% (n=48). La media del Apgar al minuto fue 8 (7-9) y a los 5 minutos 9 (8-10), del Silverman-Anderson 2 (1-3). 95 de los recién nacidos (89.6%) fueron eutróficos. 7 hipotróficos (6.6%) y 4 hipertróficos (3.8%).

Los niveles de homocisteína se muestran en el cuadro III.



Se realizó una Prueba de Kruskal-Wallis para comparar entre los tres grupos si existía o no diferencia entre los niveles de homocisteína, el peso de los recién nacidos, la cantidad de ácido fólico ingerido y no hubo diferencias significativas. Con el programa Sigma Stat se realizó una prueba de poder con el propósito de observar si incrementando la muestra se podrían observar diferencias y el estudio mostró un poder del 95%.

## CAPITULO IV: DISCUSION

En este estudio se encontró una mayor frecuencia de heterocigotos C677T de la MTHFR que coincide con lo reportado por González-Herrera en población indígena mexicana.<sup>30</sup> La frecuencia alélica para este polimorfismo corresponde a 57%, similar a la encontrada en estudios realizados previamente en población mexicana, esta frecuencia es muy elevada considerando que en una población africana y afro-americana se reportan cifras de 10%.<sup>31</sup> También coincide con la incidencia reportada por Mutchinick<sup>2</sup> quién encontró una prevalencia del genotipo TT de 34.8% con una frecuencia alélica de 0.58%

Los niveles de homocisteína fueron más elevados que los reportados por Hongsprabhas y cols<sup>32</sup> que fueron de  $3.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$  en recién nacidos pretérmino y  $6.1 \pm 1.3 \mu\text{M}$  de término; sin embargo estos estudios no lo relacionan con la presencia del polimorfismo.

Los resultados obtenidos en el presente estudio fueron similares a los reportados por Minet JC en Alemania, en población sajona en 60 recién nacidos, quienes reportaron niveles de  $10.4 \pm 3.4 \mu\text{M/l}$ .<sup>33</sup>

El estudio no mostró significancia en cuanto a la presencia del polimorfismo y los niveles de homocisteína; así como tampoco diferencia de los niveles de homocisteína con relación al antecedente de administración de ácido fólico.

Existen otros polimorfismos que intervienen en el metabolismo del ácido fólico, como MTHFR 1298, MTR 275, MTRR 27566, MTRR 66 y SHMT1 1420, por lo que la presencia del MTHFR C677T no obligadamente es el “único responsable” de la hiperhomocisteinemia. Tampoco la ingesta de ácido fólico ha mostrado un cambio en los niveles de homocisteína.

Los resultados indican una alta prevalencia de la mutación C677T, en recién nacidos de término eutróficos mexicanos, sin relación a los niveles de homocisteína.

La suplementación de ácido fólico se estableció como Norma Oficial Mexicana desde 1992, para la prevención de defectos del tubo neural, indicándose previa a la concepción tres meses y durante el primer trimestre postconcepcional.<sup>34</sup> Llama la atención que en este grupo de estudio, el suplemento se dio en la mayoría de los casos tardíamente, probablemente se debe a un control prenatal de inicio posterior y al desconocimiento por parte de las pacientes de la necesidad de dicho suplemento previo a la concepción. Por otro lado las dosis administradas no siempre fueron las recomendadas de 400 µcg/día; por lo que se considera que el personal que atiende a las pacientes durante el control prenatal requiere de conocer la importancia de una dosis adecuada y del tiempo que debe de prescribirse. Aquellas mujeres con antecedentes de embarazos previos afectados con defectos de tubo neural se recomienda una dosis de 4 mg de ácido fólico al día preconcepcionalmente, para reducir el riesgo de recurrencia.

Reconociendo el alto riesgo de mujeres embarazadas para alteraciones vasculares y defectos congénitos, se hace importante establecer un posterior seguimiento neonatal y comportamiento clínico en relación a niveles de homocisteína y del polimorfismo de la mutación C677T de la MTHFR para establecer en un futuro una posible relación con morbilidad neonatal. La intención es generar un estudio predictivo y preventivo de los casos de homocigotos a través de la dieta o la suplementación con ácido fólico que los proteja durante el desarrollo.

Por otro lado es importante el comentario de O'Callaghan,<sup>35</sup> quién menciona que después de un estudio a 3680 pacientes por dos años con ácido fólico y vitaminas, disminuyeron los niveles de homocisteína, pero no el rango de eventos vasculares a futuro. Al igual que la Heart Outcome Prevention Evaluation trató

5,522 pacientes con enfermedad vascular o diabetes con una combinación de ácido fólico, vitamina B 12 y vitamina B6 o placebo por 5 años. Hubo diferencia significativa en los niveles de homocisteína; pero no hubo significancia de en la composición y puntos del infarto del miocardio, choque o muerte por enfermedad cardiovascular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA.

1. Martínez LE, Delgado I, Valdez R, Ortíz R, Rojas A, Limón C et al. Folate levels and NS, N10-metylenetetrahydrofolate reductase genotype (MTHFR) in mothers of offspring with neural tube defects: a case-control study. *Arch Med res* 2001; 32:277-82.
2. Mutchinick OM, López MA, Luna L, Waxman J, Babinsky VE, RYVEMCE Collaborative Group. High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Molecular Genetics and Metabolism* 1999; 96: 481-7.
3. 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. Génét.* 2000; 43: 89-92.
4. Nussbaum RL, Mc Innes RR, Willard HF. Thompson & Thompson: *Genética en Medicina*. 5ª Ed. Barcelona: Masson; 2004.
5. Selhub JSJ. Homocysteine Metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999; 19: 217-46.
6. Molloy AM, Mills JL, McPartlin J, Kirke PN, FPMHI, Scott JM, Daly S. Maternal and fetal plasma homocysteine concentrations at birth: The influence of folate, vitamin B<sub>12</sub>, and the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase 677C → T variant. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 499-503.
7. Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 986-90.
8. Harmon DL, Woodside JV, Yarnell JW, McMaster D, Young IS, McCrum EE et al. The common "thermolabile" variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinaemia. *Q J Med* 1996; 89: 571-7.

9. Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PWF, Rosenberg IH. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 1999; 340: 1449-54.
10. Molloy AM, Daly S, Mills JL, Kirke PN, Whitehead AS, Ramsbottom D et al. Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. *Lancet* 1997; 349: 1591-3.
11. Frosst P, Blom HJ, Milos R et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylene-tetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-3.
12. Goyette P, Christensen B, Rosenblatt DS, Rozen R. Severe and mild mutations in cis for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, and description of five novel mutations in MTHFR. *Am J Hum Genet* 1996, 59: 1268-75.
13. Perry DJ. Hyperhomocysteinaemia. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999; 12: 451-77.
14. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1149-55.
15. Powers RW, Dunbar MS, Gallaher M, Roberts J. The 677 C-T methylenetetrahydrofolate reductase mutation does not predict increased maternal homocysteine during pregnancy. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 762-6.
16. Picciano MF. Is homocysteine a biomarker for identifying women at risk of complications and adverse pregnancy outcomes?. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 857-8.
17. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessing HK et al. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 962-8.

18. Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, Scott JM. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 1995; 345: 149-51.
19. Bjørke-Monsen AL, Ueland PM, Schneede J, Vollset SE, Refsum H. Elevated plasma total homocysteine and C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with spina bifida. *QJ Med* 1997; 90: 593-6.
20. Ubbink JB, van der Merwe A, Delport R et al. The Effect of a Subnormal a Subnormal Vitamin B-6 Status on Homocysteine Metabolism. *J Clin Invest* 1996; 98: 177-84.
21. Raslova K, Bederova A, Gasparovic J, Blazicek P, Smolkova B. Effect of diet and 677C→T 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase genotypes on plasma homocysteine concentrations in Slovak adolescent population. *Physiol Res* 2000; 49: 651-8.
22. Guinotte CL, Burns MG, Axume JA, Hata H, Urrutia TF, Alamilla A et al. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T variant modulates folate status response to controlled folate intakes in young women. *J Nutr* 2003; 133: 1272-80.
23. Botto L, Yang Q. 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: A Huge Review. *Am J of Epidemiol* 2000; 151: 862-77.
24. Rozen R, Fraser FC, Shaw G. Decreased proportion of the female newborn infants homocygous for the 677 C→T mutation in methylenetetrahydrofolate reductasa. *Am J Med Genet* 1999; 83: 142-3.
25. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: Implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 11-28.
26. Wilcken DEL, Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest* 1976; 57: 1051-1079.
27. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Bloom HJ, Kok FJ., Schouten EG, MTHFR Studies Collaboration Group. MTHFR 677 C→T polymorphism and risk of f coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA* 2002; 288: 2023-31.

28. van Beynum IM, den Heijer M, Bloom HJ, Kapusta L. The MTHFR 677 C→T polymorphism and the risk of congenital heart defects: a literature review and meta-analysis. *QJM* 2007; 100: 743-53.
29. Jaminson RL, Shin MC, Humphries DE, Guarino PD et al. Effect of the MTHFR C677T and A 1298 C polymorphism on survival in patients with advanced CKD and ESRD: A prospective study. *Am J Kidney Dis* 2009; 53: 779-89.
30. González-Herrera L, García-Escalante, Castillo-Zapata, Canto J. Frequency of the thermolabile variant C677T in the MTHFR gene and lack of association with neural tube defects in the state of Yucatán, Mexico. *Clin Genet* 2002; 62: 394-8.
31. Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation, *Am J Hum Genet* 1998; 64: 1045-55.
32. Hongsphabhas P, Saboohi F, Aranda JV, Bardn CL, Kovacs LB, Papageorgiou AN. Plasma homocysteine concentration of preterm infants. *Biol Neonate* 1999; 76: 65-71.
33. Minet JC, Bissé E, Aebischer CP, Beil A, Wieland H, Lüschtg J. Assessment of vitamin B-12, folate, and vitamin B-6 status and relation to sulfur amino acid metabolism in neonates. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 751-7.
34. Norma Oficial Mexicana 034-SSA 2-200.
35. O'Callaghan. Homocysteine – Is it the end of the line?. *Br J Cardiol* 2007; 14:69-70.



## ANEXO 1

### CARTA DE CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACION VOLUNTARIA

En el Instituto Nacional de Perinatología se está llevando a cabo un estudio denominado: **“Determinación de homocisteína en recién nacidos de término y su asociación con el polimorfismo C677T del gen de la metileno-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR)”**, los investigadores principales son: el **Dr. Ricardo Juan García Cavazos**, la **Dra. Leyla María Arroyo Cabrales** y el **Dr. Sergio Alberto Cuevas Covarrubias**.

El estudio pretende determinar la concentración de homocisteína y una mutación genética en recién nacidos de término tomando muestras de sangre de cordón umbilical, la toma de muestras se llevará a cabo sin tener contacto con su recién nacido.

POTENCIALES RIESGOS: El trabajo de investigación no implica riesgos adicionales.

POTENCIALES BENEFICIOS: Conocer los niveles de homocisteína y la presencia o no de la mutación genética.

Declaro que estoy de acuerdo en participar en este estudio cuyos objetivos, procedimientos, beneficios y daños potenciales se me han explicado detalladamente, asimismo he tenido la libertad de hacer las preguntas necesarias para aclarar mis dudas. Los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta que al momento de firmar la presente no hubiese expresado o surja durante el desarrollo de la investigación. Se me ha manifestado que puedo retirar mi consentimiento de participar en cualquier momento sin que esto signifique que la atención médica que se me proporciona se vea afectada por este hecho.

Se me ha informado que el participar en este estudio no repercutirá en el costo de la atención médica que se me deba brindar y que toda información que se otorgue sobre mi identidad y participación será confidencial, excepto cuando yo lo autorice.

Para los fines que se estime conveniente firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos conservando una copia del documento.

México D.F., a \_\_de \_\_\_\_\_ del 2005.

AUTORIZACIÓN:

Nombre \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

TESTIGOS:

Nombre \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

## ANEXO 2

### HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

Nombre: \_\_\_\_\_

**Registro:** \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_

Hora de Nacimiento: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_

Peso: \_\_\_\_\_g

Talla: \_\_\_\_\_cm

**Edad Gestacional:** \_\_\_\_\_semanas      **Clasificación de acuerdo a**  
**peso:** \_\_\_\_\_

**Vía de nacimiento:** \_\_\_\_\_      **Apgar: 1x'** \_\_\_\_\_ **5'** \_\_\_\_\_      **Silverman:** \_\_\_\_\_

**Embarazo complicado:**    **si** \_\_\_\_\_ **no** \_\_\_\_\_ **especifique** \_\_\_\_\_

**Edad materna:** \_\_\_\_\_años      **Patología materna:**    **si** \_\_\_\_\_    **no** \_\_\_\_\_  
**especifique** \_\_\_\_\_

**Suplementación con ácido fólico:**    **dosis** \_\_\_\_\_    **inicio** \_\_\_\_\_  
**término** \_\_\_\_\_

Fecha y hora de recolección de muestra: \_\_/\_\_/\_\_    \_\_\_\_\_Hs

Niveles séricos: Homocisteína: \_\_\_\_\_μmol/L

Presencia del Polimorfismo: \_\_\_\_\_

Servicio: \_\_\_\_\_

Fecha de alta: \_\_/\_\_/\_\_

## CUADROS

**CUADRO I. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALELICAS.**

	Frecuencia genotípica (%)			Frecuencia alélica (%)	
	CC	CT	TT	C	T
<b>Población n=106</b>	<b>19 (17.9)</b>	<b>53 (50)</b>	<b>34 (32)</b>	<b>91 (43)</b>	<b>121 (57)</b>

**CC: Homocigotos silvestres.**

**CT: Heterocigotos.**

**TT: Homocigotos mutados.**

**C: Alelo silvestre.**

**T: Alelo mutado.**

**CUADRO II. Características generales de la población.**

<b>Variable</b>	<b>Mínima</b>	<b>Máxima</b>	<b>X</b>	<b>D.S.</b>
<b>Peso (g)</b>	<b>1700</b>	<b>4610</b>	<b>3035</b>	<b>443</b>
<b>Talla (cm)</b>	<b>42</b>	<b>54</b>	<b>49.38</b>	<b>1.93</b>
<b>PC (cm)</b>	<b>30.5</b>	<b>40.5</b>	<b>35</b>	<b>1.5</b>
<b>EG (semanas)</b>	<b>37.0</b>	<b>41.2</b>	<b>38.6</b>	<b>1.1</b>

x: media

D.S.: Desviación estándar.

g: gramos.

cm: centímetros.

PC: perímetro cefálico

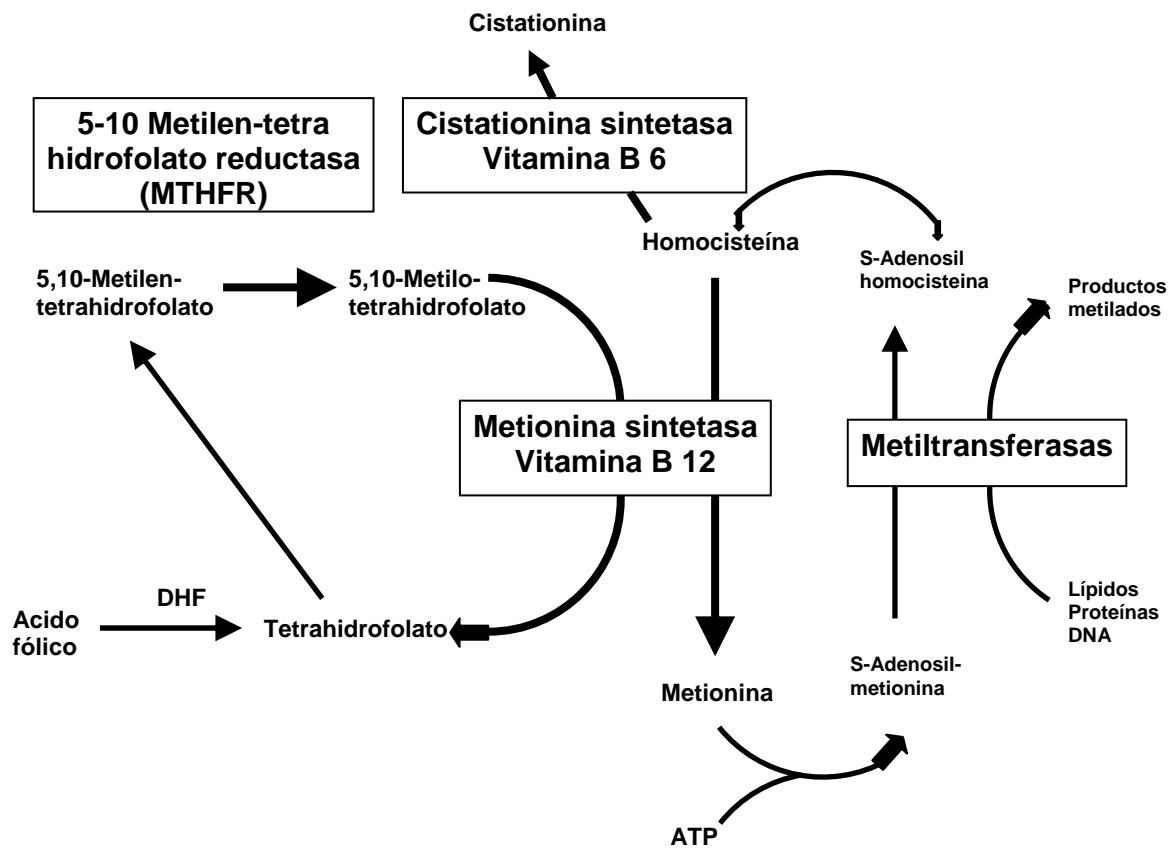
EG: edad gestacional

**CUADRO III. Niveles de homocisteína en los grupos.**

<b>Grupo/n=106 Homocisteína (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	<b>frecuencia</b>	<b>X</b>	<b>D.S.</b>	<b>mínima</b>	<b>máxima</b>
<b>Homocigotos silvestres CC</b>	<b>19</b>	<b>5.47</b>	<b>2.36</b>	<b>1.88</b>	<b>10.78</b>
<b>Heterocigotos CT</b>	<b>53</b>	<b>6.56</b>	<b>3.78</b>	<b>2.32</b>	<b>19.96</b>
<b>Homocigotos mutados TT</b>	<b>34</b>	<b>6.47</b>	<b>3.83</b>	<b>1.99</b>	<b>16.61</b>
<b>Total</b>	<b>106</b>	<b>6.34</b>	<b>3.58</b>	<b>1.88</b>	<b>19.96</b>

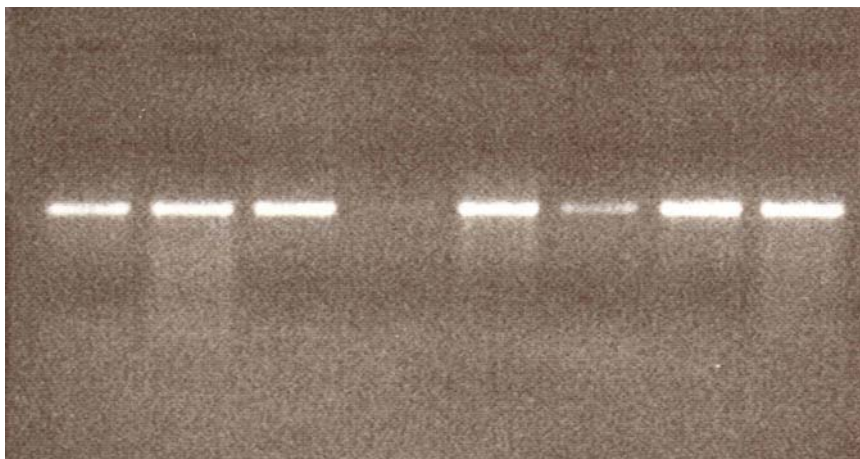
## FIGURAS

Figura 1. La producción de homocisteína en el metabolismo de la metionina y la implicación de la MTHFR. Las líneas oscuras representan los puntos en los cuales los defectos genéticos en la enzima o en la biosíntesis de cofactores se conoce causan elevación de la homocisteína.

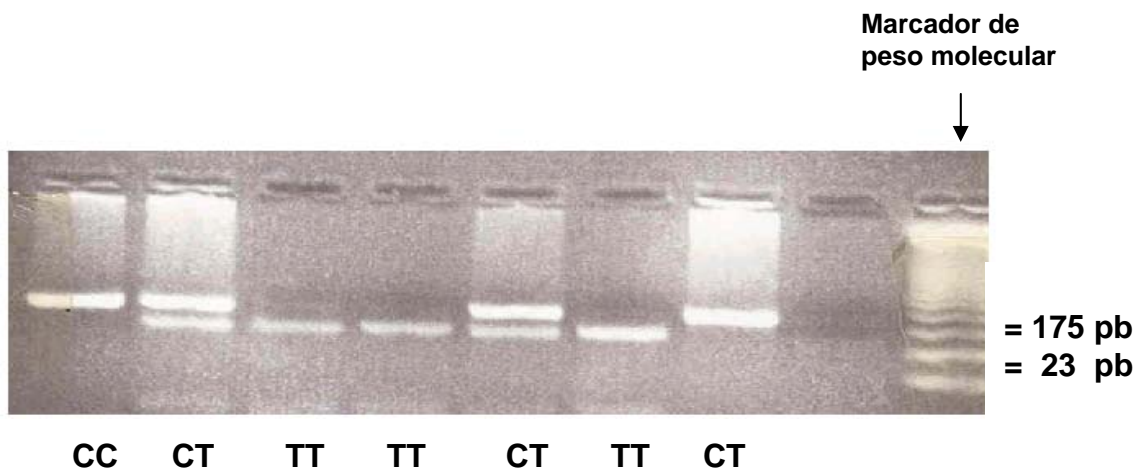


**Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de DNA de muestras de recién nacidos. Imagen representativa para evaluar presencia e integridad de DNA.**

Carril: 1 2 3 4 5 6 7 8



**Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 4%, en donde se indican las bandas que reflejan la digestión del producto de PCR (198 pares de bases) y su posterior tipificación.**



**CC: Homocigoto silvestre**

**CT: Heterocigoto**

**TT: Homocigoto mutado**

**pb: Pares de bases**