

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**Instituto Nacional de Perinatología
“Isidro Espinosa de los Reyes”
Subdirección de Ginecología y Obstetricia**

**Identificación de la Mutación C677T y A1298C
del Gen 5,10-Metilentetrahidrofolato reductasa
en Pacientes con Espina Bífida Oculta y
Trastornos de la Micción**

T E S I S

**Que para obtener el título de:
Especialista en Urología Ginecológica**

P R E S E N T A

Dr. Primo Roberto Martínez Chavarria

Dra. Esther Silvia Rodríguez Colorado
Profesor titular del curso en especialización

Dr. Ricardo García Cavazos
Director de Enseñanza



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.

El éxito no se logra con la suerte
Es el resultado de un esfuerzo constante

Oscar Salazar

RECONOCIMIENTOS

A Dios todopoderoso por su iluminación y sabiduría

A mi esposa Dinora por su comprensión y paciencia

A mi Hija Gaby por ser mi inspiración y principal motivación para superarme

A mis padres por su apoyo incondicional

A mis hermanos por tener credibilidad en mi desempeño académico y profesional

A mis maestros en El Salvador y al Instituto Salvadoreño del Seguro Social por ser parte de mi formación

Al INPerIER y a mis maestros Dra. Silvia Rodríguez, Dr. Carlos Ramírez y Dra. Laura Escobar por su enseñanza sin límite y su amistad

Al personal de la Clínica de Urología Ginecológica: Consuelo Hernández, Lourdes, Rosa Maria y Emelia

A mis tutores por impulsar con esmero este proyecto

A los pacientes por ser el principal recurso de mi aprendizaje

A la memoria del Dr. Manuel Antonio Castaneda Aguilar (QEPD)

INDICE

Introducción.....	6
Prefacio.....	8
Prologo.....	9
Resumen.....	10
Capitulo 1: Marco Teórico Conceptual.....	11
a) Síntesis del Proyecto.....	11
b) Planteamiento del Problema.....	11
c) Antecedentes Bibliográficos.....	12
d) Justificación.....	18
e) Objetivos e Hipótesis.....	19
Capitulo 2: Material y Métodos.....	20
Capitulo 3: Definición y Operacionalización de Variables.....	21
Capitulo 4: Organización de recursos.....	22
Resultados.....	24
Discusión.....	27
Conclusiones.....	30
Recomendaciones.....	31
Anexos.....	32
Complementos.....	37
Referencias bibliográficas.....	42

INTRODUCCIÓN

La vejiga hiperactiva es un trastorno de vaciamiento del tracto urinario inferior que se caracteriza por frecuencia, nocturia, urgencia con o sin incontinencia, afecta a un 60% de las pacientes que acuden a la Clínica de Urología Ginecológica del Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes". Esta enfermedad afecta a muchas mujeres alrededor del mundo creando un impacto en la calidad de vida siendo afectadas la actividad física, sexual, ocupacional, psicológica, social, doméstica e importantes consecuencias socioeconómicas. Sus síntomas pueden presentarse como consecuencia de varias disfunciones del tracto urinario bajo incluyendo obstrucción de salida, infecciones del tracto urinario bajo y déficit neurológicos. Esta alteración de la fase de llenado se denomina urodinamicamente detrusor hiperactivo. Existen muchas modalidades diagnósticas y terapéuticas, pero la falta de estandarización y sistematización dificulta la interpretación del seguimiento y resultados para obtener consenso en estudios multicéntricos o metanálisis. La historia Clínica es la más importante herramienta diagnóstica esta es suficiente para encontrar vejiga hiperactiva, si se acompaña de el examen físico, exámenes de laboratorio y gabinete, urodinamia, cistoscopia, cuestionarios de calidad de vida, diario vesical, con facilidad se confirma nuestra sospecha clínica.

El espectro terapéutico proporciona diferentes alternativas, el uso de fármacos como los anticolinérgicos se consideran la primera línea terapéutica, sin embargo, estos tienen demasiados efectos adversos que dificultan la adherencia al tratamiento y propician el abandono temprano, muchas pacientes presentan recaídas a corto y largo plazo. Otra alternativa la ofrecen terapia de estimulación eléctrica, ejercicios del piso pélvico, re-entrenamiento vesical, etc. sin los efectos adversos de los fármacos.

Tenemos base en la bibliografía previa para pensar que existe un vínculo con el desarrollo del tubo neural y que sus alteraciones embrionarias pueden dar como resultado la espina bifida oculta a nivel lumbosacro, dando apareamiento a trastornos neurológicos como la vejiga hiperactiva. México un lugar importante a nivel mundial en incidencia de defectos del tubo neural, pudiendo estar condicionado por factores ambientales (alimentación, contaminantes, fármacos, etc.) alterando considerablemente el desarrollo de las estructuras que posteriormente formaran el sistema nervioso central dando alteraciones mayores como meningocele, mielomeningocele, anencefalia, etc.

Así, la espina bifida oculta es una condición Clínica que puede pasar desapercibida durante la niñez y la infancia, manifestándose hasta en la vida adulta como consecuencia de traumatismo, el embarazo, el parto, enfermedades crónicas degenerativas o por el mismo proceso evolutivo.

El factor genético ha despertado interés principalmente a nivel de las enzimas que participan en el metabolismo de el ácido fólico, la 5,10-metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Esta presenta varios polimorfismos, de ellos el C677T y el A1298C son los asociados con espina bifida oculta específicamente. Hay estudios previos en México que reportan una gran prevalencia de estas mutaciones en población abierta, nos interesa revisar esa incidencia en pacientes con síntomas de vejiga hiperactiva y espina bifida oculta.

Los métodos diagnósticos benefician más a la imagen de resonancia magnética y estudios de rayos x, se definen como el estándar de oro para diagnóstico de alteraciones óseas de espina bifida oculta, nosotros utilizaremos estudios radiológicos por su disponibilidad en el Instituto.

PREFACIO

En la clínica de Urología Ginecológica del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”, la consulta de trastornos de vaciamiento como la vejiga hiperactiva es muy frecuente. En nuestra residencia es parte de nuestra formación aportar conocimientos a la docencia, asistencia y a la investigación clínica. La clínica nació a principios de los 90's ya en 1999 se obtiene reconocimiento universitario por la “Universidad Nacional Autónoma de México” y presentar un trabajo de investigación es parte de los requisitos de graduación en la subespecialidad de urología ginecológica.

Desde hace 2 o 3 años surgió la idea en conjunto con el departamento de genética de realizar un protocolo que ayudaría a encontrar una relación entre la vejiga hiperactiva, espina bífida oculta y algunas mutaciones de la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) relacionadas como las variantes C677T y A1298C.

En México se esta estudiando con mucho interés los defectos del tubo neural y sus relaciones con diferentes entidades clínicas, para nosotros es importante encontrar alguna asociación con vejiga hiperactiva y espina bífida oculta.

Esta área de investigación la consideramos muy importante ya que la cantidad de pacientes de la consulta diaria cada vez se incrementa y estamos conscientes de las repercusiones que esto tiene en la vida diaria de las pacientes. Desafortunadamente la falta de sistematización y estandarización dificulta la medición de las intervenciones clínicas en beneficio de las pacientes; existe buen espectro diagnóstico y terapéutico pero aun así, falta investigar la influencia genética en el desarrollo de espina bífida oculta y vejiga hiperactiva. Son muchas las personas interesadas en estudiar las influencias multifactoriales de estas enfermedades ojala en el futuro encontremos las respuestas a nuestras inquietudes de investigación clínica.

Actualmente realizamos un estudio piloto y es el que les queremos presentar a continuación esperamos que sea de mayor utilidad y de su agrado.

Martínez PR

PROLOGO

La Urología Ginecológica como disciplina es una entidad relativamente nueva en el mundo de la medicina moderna, de tal manera que hay mucho por hacer en el área de investigación para fortalecer a nuestra práctica clínica diaria. Es por ello que la clínica de Urología Ginecológica de el Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" actualmente se ha interesado en investigar parte de la etiología de la vejiga hiperactiva.

Esta enfermedad es causa frecuente de consulta diaria y aunque el diagnóstico es relativamente fácil, la efectividad limitada del tratamiento por la gran cantidad de efectos adversos condiciona la mayor queja de nuestras pacientes, poca adherencia y abandono de los tratamientos. Sabemos que en poco o nada podríamos cambiar nuestras pautas de tratamiento pero la medicina moderna nos exige que partamos de encontrar el origen de las enfermedades, a esto no escapa la vejiga hiperactiva. Existen al momento novedosas alternativas de manejo una de ellas incluye a la medicina genómica, la cual nos da la oportunidad de intervenir desde las ventanas del desarrollo intrauterino del ser humano hasta el ambiente extrauterino. El desarrollo de nuestras sociedades desencadena factores de contaminación ambiental, que condicionan trastornos del desarrollo que son difíciles de diagnosticar en estadios tempranos ya que pueden pasar inadvertidos para el clínico por la falta de manifestaciones, la mujer particularmente su condición gestante y parturienta, podría hacer notorio los daños de la columna nerviosa lumbosacra.

La mutación de la enzima 5,10 metilenterahidrofolato reductasa (MTHFR) presenta varias mutaciones en sus interacciones con los folatos, tanto así que son muchas las enfermedades relacionadas como el cáncer de colon, enfermedades cardíacas, pérdida gestacional recurrente, pre eclampsia, etc. Creemos que nuestro ayudaría a consolidar resultados de trabajos previos que demuestran una alta prevalencia de su mutación en grupos específicos poblacionales, esto orientaría en efecto que hay condiciones ambientales relacionadas al apareamiento de defectos del tubo neural como la espina bifida oculta, y manifestaciones clínicas de vejiga hiperactiva que es nuestro trabajo de investigación.

Martínez PR.

RESUMEN

OBJETIVO: Encontrar asociación entre el diagnóstico de vejiga hiperactiva, espina bífida oculta y las mutaciones C677T y A1298C de la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) mediante estudio del DNA.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se realizó un estudio transversal durante los meses de diciembre del 2005 a marzo del 2006, se incluyeron 32 pacientes con diagnóstico de vejiga hiperactiva a quienes se les tomó rayos X de columna lumbar y sacra para el hallazgo de espina bifida oculta. Se tomó 4 ml de sangre periférica para estudio del DNA Genómico por el método de Miller y Gunstintich. El análisis se realizó mediante el programa Excel Windows XP y tablas de distribución de frecuencias.

RESULTADOS: El mayor porcentaje de disrafia lo encontramos de S2 a S5 en 94%, disrafia L5 a S5 6%. Otros hallazgos que consideramos importantes son: escoliosis en 64.5%, asimetría de cadera 29% y lordosis 22.5%. Para el polimorfismo C677T se encontró: Genotipos CT 43.75%, TT 34.37%, CC 21.87%; alelo normal 43.73% alelo mutado 56.25%. Para A1298C: Genotipos AC 21.87%, AA 71.87%, CC 6.25%; alelo normal 82.81%, alelo mutado 17.18%.

CONCLUSIONES: La espina bifida oculta a nivel de S2-S5 se encontró en 94% de pacientes con diagnóstico de vejiga hiperactiva, otros defectos óseos podrían estar relacionados. La presencia del polimorfismo C677T heterocigoto se encuentra en 43.73% de pacientes con frecuencia del alelo mutado de 56.25%, no se encuentra relación con la mutación A1298C ni entre ambos genotipos.

PALABRAS CLAVE: vejiga hiperactiva, espina bifida oculta, polimorfismo, DNA, 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa.

CAPITULO 1: MARCO TEÓRICO

SÍNTESIS DEL PROYECTO

Este estudio observacional, transversal y analítico se realiza en la clínica de urología ginecológica y en el departamento de genética, del Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes", en el cual evaluamos la posible asociación de los polimorfismos C677T y A1298C del gen de la enzima 5,10 metilendetrahidrofolato reductasa (MTHFR) con defectos del tubo neural, específicamente la presencia de espina bífida oculta, en donde puede existir una predisposición genética y/o ambiental para los trastornos urinarios, que son motivo frecuente de consulta en la clínica urología ginecológica. Este trastorno se diagnostica clínicamente y a través de estudios de gabinete y rayos X; radiografías antero-posterior y lateral de columna lumbosacra, buscando hallazgos radiológicos que sugieran la presencia de Espina Bífida Oculta (separación de centros de osificación vertebral o falta de fusión de los elementos posteriores de la columna lumbar y sacra). En este estudio se incluirán todas las pacientes que acuden con sintomatología urinaria de tipo neurológico; la mayoría, en el diagnóstico de vejiga hiperactiva o detrusor hiperactivo en todas sus variables, según la sintomatología clínica o diagnóstico urodinámico.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro de la Clínica de Urología Ginecológica, los trastornos urinarios de origen neurológico, se diagnostican en aproximadamente 25% de las pacientes, esto como un hecho incidental en los estudios de imagenología, que pedimos como complemento diagnóstico en casos en que se tiene la sospecha de etiología neurológica, y se teme la posibilidad de reflujo Vesicoureteral y daño renal consecuente. Hemos encontrado hasta en 60% de estas mujeres, una asociación con espina bífida oculta a nivel sacro lo que sugiere origen neurológico del problema; durante el interrogatorio encontramos que existe el antecedente familiar en hermanas o madres de trastornos urinarios similares, por lo que es importante y trascendente complementar y detectar este problema, conocer la tendencia familiar y la posibilidad de un factor genético, para la prevención de estas anomalías en futuras generaciones (programación del desarrollo) y prevenir, el daño renal a largo plazo en las que ya lo padecen.

También tiene participación el medio ambiente y la predisposición genética. Se ha relacionado a este problema la presencia de las mutaciones C677T y A1298C de la enzima MTHFR con la expresión clínica de espina bífida oculta. Estudios previos en población mexicana describen esta asociación en pacientes con defectos del tubo neural y refiere un 20% más que en la población general.

Además, en estudios urodinámicos que se realizan en la clínica de urología ginecológica, el 60% de los diagnósticos finales corresponden a vejiga hiperactiva, las cuales manejamos con terapia conductual o intervenciones en el estilo de vida, como cuidar de la cantidad y tipo de líquidos ingeridos, vaciamiento vesical con horario, esto parece mejorar el control voluntario central y periférico a esa zona del tracto urinario inferior; ejercicios del piso pélvico, con el objetivo de mejorar la inervación, irrigación y fuerza muscular; además utilizamos fármacos con efecto anticolinérgico, electroestimulación y biorretroalimentación con resultados satisfactorios para la mayoría de las pacientes. Todas estas formas de tratamiento, solas o en combinación, las utilizamos con las pacientes con recurrencia de su sintomatología, lo que sugiere la presencia o intervención de un factor neurológico a determinar, que podría ser la asociación con espina bífida oculta, que a nuestro juicio y con apoyo de la literatura, podrían manifestarse solo en la vida adulta o posterior al parto, desarrollando todas las manifestaciones del problema.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La espina bífida es una malformación congénita que se enmarca en una serie de defectos de cierre del tubo neural, desorden que se desarrolla e incluye varias enfermedades del sistema nervioso central, es secundario a una diferenciación anormal de las estructuras dorsales y craneoencefálicas. Es la malformación congénita del sistema nervioso central más frecuente, afecta a más de 1000 infantes de todos los nacimientos en los Estados Unidos anualmente, esto es 8% de las malformaciones al nacimiento y son el segundo diagnóstico por autopsia (8,9). Esta Malformación se ha encontrado en 8.8% de las autopsias realizadas en los Estados Unidos a toda la población, 45.5% de las cuales incluye anomalías de la espina cordal o médula espinal tales como meningoencefalocele, meningocele, mielomeningocele, raquisquis craneo espinal y espina bífida oculta. La incidencia de la espina bífida oculta varía de 1-50% debido probablemente a que disminuye la prevalencia a medida que se incrementa la edad, o como resultado de una nueva formación o calcificación ósea o como parte de un proceso crónico degenerativo. Boone y colaboradores han reportado una incidencia hasta de 17% de espina bífida oculta en adultos asintomáticos, en niños enuréticos la incidencia de espina bífida oculta llega a ser del 38%. El defecto del tubo neural más común, es el disrafismo espinal el cual puede ser abierto o cerrado como la espina bífida oculta (5). En México, los defectos del tubo neural (DTN), constituyen un importante problema de salud pública, las estadísticas indican una incidencia elevada y si bien no se conoce con certeza el número de casos, se calcula que pueden ocurrir en 4 de cada 1000 recién nacidos vivos. A nivel mundial México ocupa el segundo lugar en incidencia de estos defectos, superado únicamente por China del Norte (1)

Entre los 18 y 28 días post ovulación, el tubo neural se cierra a lo largo de 5 sitios separados y la falla en algunos de esos sitios genera la mayoría de los defectos. Lo que compete a la columna espinal la disrupción del neuroporo

caudal ocurre antes del día 26, en la espina bífida oculta, la piel y las vértebras son anormales pero la médula espinal se conserva intacta (9).

Se desconoce la fisiopatología exacta de los DTN, pero se sugiere una participación importante del metabolismo del folato, de tal forma que una ingesta inadecuada, así como los defectos en su absorción y la disrupción de actividades intracelulares originadas por defectos genéticos que afecten a las enzimas involucradas en el metabolismo del ácido fólico, participan de forma importante en la génesis de DTN. La evidencia de un componente genético comienza en observaciones familiares de Torriello y Higgins (1985) y de la relación entre el ácido fólico y la prevención de los defectos de tubo neural, esto ha enfocado la atención en los genes involucrados en el metabolismo del folato, el medio ambiente, la dieta, etc.

La metionina de la dieta no es suficiente para proveer de todos los grupos metilo necesarios para las reacciones de metilación celulares, por lo cual es indispensable de la síntesis de novo de metionina, que es dependiente de la vía biosintética del folato. El metabolismo del folato se asocia a dos importantes ciclos metabólicos, el primero involucra la producción de purinas y timidina para la síntesis de ADN, el segundo se relaciona con la provisión de grupos metilo para la síntesis de S-adenosilmetionina (SAM), que es el principal donador biológico utilizado en todas las reacciones de transferencia de grupos metilo de diversos procesos metabólicos tales como; regulación de la expresión génica a través de metilación de ADN, mecanismos de regulación y señalización celular a través de metilación de proteínas, neurotransmisores y fosfolípidos. La metilación de ADN en sitios específicos regula la expresión génica y ejerce un papel crítico en procesos del desarrollo fetal (fig. 1). Una enzima polimorfa codificada por las variantes C677T y A1298C del gen MTHFR puede reducir la disponibilidad de grupos metilos de novo. De tal modo que la provisión inadecuada de folato puede generar hipometilación de ADN e inestabilidad genómica.

El gen MTHFR está localizado en el cromosoma 1p36.3. Consta de 11 exones, con extensión de 102pb a 432pb y 10 intrones. La variante del gen MTHFR 677C→T es uno de los determinantes genéticos más importantes de los niveles de folato y homocisteína, produce el reemplazo del aminoácido valina por alanina en el codón 222. La homocigocidad para el alelo 677T (mutado) resulta en la expresión de una enzima termolábil, con una disminución en su actividad de cerca del 70%. La prevalencia de la mutación C677T del gen MTHFR varía ampliamente en diferentes grupos étnicos, en caucásicos, chinos y japoneses la frecuencia del alelo T es entre 30 y 40%, mientras que en la población negra de Sudáfrica y afro americanos es menor del 5%.

Otro polimorfismo frecuente en el gen MTHFR es la transición 1298 A > C, la cual resulta en la sustitución de glutamato por alanina, presuntamente dentro del dominio regulatorio de la MTHFR. Se ha reportado que la homocigocidad del alelo 1298C (mutado) induce una disminución en la actividad enzimática, sin embargo no es de la misma magnitud que la homocigocidad del alelo 677T.

De acuerdo a algunos estudios, los individuos heterocigotos compuestos para los alelos 677T y 1298C, los cuales presentan un genotipo C677T / A1298C, tienen una reducción en la actividad in vitro de la MTHFR del 40 – 50% y un perfil bioquímico similar al observado en individuos con homocigocidad para el alelo 677T, con incremento en los niveles de homocisteína y disminución de los niveles de folato (23).

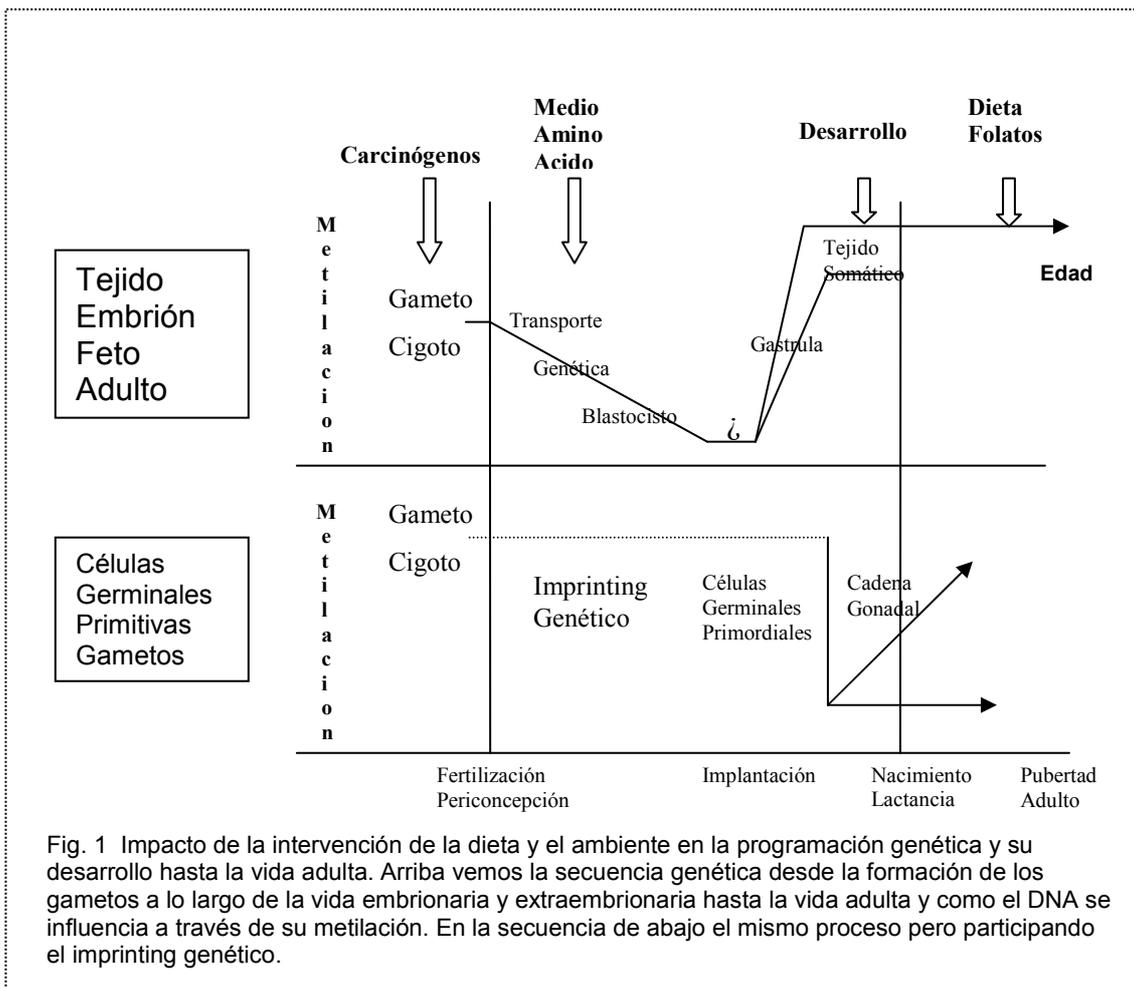


Fig. 1 Impacto de la intervención de la dieta y el ambiente en la programación genética y su desarrollo hasta la vida adulta. Arriba vemos la secuencia genética desde la formación de los gametos a lo largo de la vida embrionaria y extraembrionaria hasta la vida adulta y como el DNA se influencia a través de su metilación. En la secuencia de abajo el mismo proceso pero participando el imprinting genético.

A la fecha, además de los 2 polimorfismos ya descritos, los cuales disminuyen la actividad enzimática, se han identificado más de 20 mutaciones en el gen MTHFR, que causan deficiencia enzimática severa. Algunos otros cambios descritos son poco frecuentes, presentes en solo algunas familias con un cuadro clínico que incluye; retardo psicomotor, debilidad muscular proximal, marcha inestable, patología vascular (trombosis vascular) y homocistinuria.

La prevalencia del polimorfismo varía dependiendo de la población estudiada, se ha encontrado con mayor frecuencia en población italiana (44%); en hispanos de California (42%) y en 34% en población Japonesa (24).

En población mexicana el polimorfismo C677T es más frecuente que en otras poblaciones, con una presencia en población mestiza del 44 al 50%.

La MTHFR es una enzima clave en el metabolismo de la homocisteína, cataliza la conversión de 5,10-metilenetetrahidrofolato en 5-metiltetrahidrofolato (5-MTF) que es la forma circulante predominante de folato. El 5-MTF participa en la remetilación de la homocisteína, proceso dependiente de vitamina B12, donando un grupo metilo para la síntesis de metionina, reacción catalizada por la enzima metionina sintetasa, que utiliza vitamina B₁₂ como cofactor (Fig. 2).

La metionina es metabolizada por la enzima metionina adenosiltransferasa a S-adenosil metionina, la cual actúa como donador de grupos metilo, por medio de enzimas metil transferasas, en procesos de metilación de DNA, proteínas, neurotransmisores y fosfolípidos. El producto de esta reacción genera S-adenosil homocisteína, que es metabolizada por la enzima adenosilhomo-cisteinasa, que elimina adenosina y forma homocisteína.



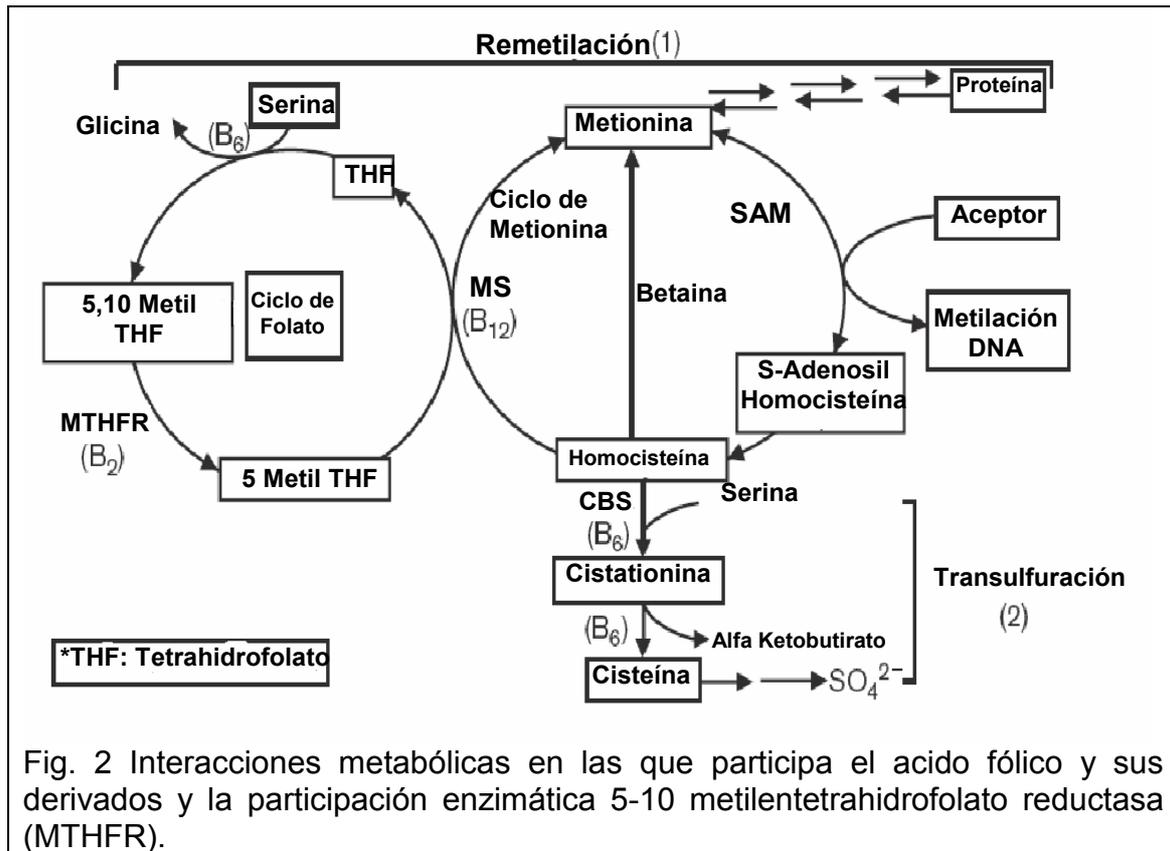


Fig. 2 Interacciones metabólicas en las que participa el ácido fólico y sus derivados y la participación enzimática 5-10 metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).

Aunque el diagnóstico de disrafia espinal oculta puede ser obvio a una edad joven, el diagnóstico exacto, frecuentemente puede ser difícil de realizarlo tempranamente, debido a retraso en la aparición de los síntomas, o falla en la apreciación clínica de hallazgos físicos y/o radiográficos significativos. Se utiliza para el diagnóstico de los defectos del tubo neural, el ultrasonido en el segundo trimestre del embarazo, el cual con la utilización de imagen en 3 D y 4 D, nos da la oportunidad de mejor resolución; alfetoproteína sérica materna, acetilcolinesterasa; imagen de resonancia magnética y estudios de rayos X siendo estos últimos el “estándar de oro” para detección de estos defectos posterior al nacimiento (7,8).

La clasificación de disrafia espinal oculta (espina Bífida oculta), ha sido basada en la apariencia radiológica de la espina baja (Agenesia sacra y Hemisacro total o subtotal), así como también la clasificación fisiopatológica que incluye Seno dermal congénito, Lipomielomeningocele, Raíces nerviosas aberrantes o bandas fibrosas y Filum Terminal anormal, todas ellas distintas formas de desarrollo de espina Bífida oculta; por lo tanto, esta clasificación tiene escasa relación al tipo de disfunción vesical que puede presentarse en la paciente.

En cuanto tratamiento, este se basa en un manejo multidisciplinario que involucra la neurocirugía, nefrourología y ortopedia. Esta enfermedad produce

cambios neurológicos como la vejiga neurogénica (síntomas de frecuencia urinaria con o sin incontinencia, poliuria, nocturia), caracterizada por disfunción del esfínter (el esfínter urinario se contrae al mismo tiempo que lo hace el músculo detrusor durante la fase de vaciado vesical o micción), representado por incontinencia urinaria y complicaciones en el tracto urinario superior por el reflujo que se produce debido al aumento en la presión intravesical. El tratamiento en este tipo de pacientes se limita a conservar la función renal, obtener una continencia socialmente aceptable y mejorar la calidad de vida (5).

Hoy en día la mayor parte del tratamiento se limita a cateterismo vesical intermitente, drogas anticolinérgicas y régimen de antibióticos, logrando obtener continencia durante el día y mantener presiones bajas del músculo detrusor; sin embargo, también se recomienda disminuir la ingesta de líquidos por la tarde, vaciamiento vesical antes de acostarse o cateterismo y uso de pañales pero este soporte terapéutico tiene un éxito limitado en la incontinencia urinaria de origen neurológico. Concomitantemente, hemos encontrado en pacientes con espina bífida, vejiga hiperactiva neurogénica e hiperactividad que puede ser considerada una alteración orgánica y funcional, para lo cual los fármacos anticolinérgicos son de mucha ayuda, a pesar de sus efectos colaterales. Khoury y colaboradores, reportan que la laminectomía con división del filum Terminal independientemente que el cono medular este normal o bajo en la mielografía, la incontinencia urinaria se resuelve hasta en 72% de sus pacientes.

En general lo que intentamos es mejorar la calidad de vida concediendo una integración progresiva a la vida social o de trabajo, logrando la continencia, previniendo infecciones del tracto urinario y preservando la función renal (11,13). El tiempo en que se manifiesta los síntomas depende del grado de afectación o nivel de afectación, en el sistema nervioso central en casos de afectación menor puede manifestarse hasta la edad adulta (10).

Para la prevención de estos DTN ya existe información publicada de suplementación de folatos y vitamina B12 durante el periodo reproductivo de la mujer, en estados unidos por ejemplo, cerca de la mitad de todos los embarazos no son planificados y de estos embarazos no planificados una tercera parte no reciben cuidados prenatales durante el primer trimestre; recomendándose de esta manera para la prevención primaria la ingesta de 0.4 mg al día de ácido fólico. Para pacientes con historia previa de recién nacido con defecto del tubo neural se recomienda ingerir 0.4 mg al día entre cada embarazo o periodo ínter genésico y 4 mg al día diariamente el último mes previo a la concepción y a lo largo de todo el primer trimestre (9). Una mujer puede estar considerada expuesta si ha tomado una droga dos meses o más después del último periodo menstrual.

En los estados unidos comienzan en 1992 a dar suplementos de ácido fólico, en 1996 la FDA aprobó la fortificación de los alimentos fijándose como meta que para el 2010 al menos 80% mujeres en edad reproductiva tengan acceso a este tipo de alimentación; además se plantean como meta que los niveles de folato en células rojas sea de 220 ng/ml en mujeres no embarazadas en edades de 15-44 años (9).

El suplemento periconcepcional de ácido fólico y la fortificación de los alimentos, a reducido en 19% los defectos del tubo neural al nacimiento en el periodo de 1996 a 1999, y se ha mencionado que de esta forma es más fácil de utilizar para el ser humano que los folatos incluidos en los alimentos de la ingesta diaria, países como Canadá, Chile, Puerto Rico, Australia, China también han implementado estos programas.

JUSTIFICACIÓN

Los trastornos de vaciamiento vesical en la mujer, que podrían tener un origen neurológico son frecuentes en la consulta de urología ginecológica del Instituto Nacional de Perinatología. Actualmente se ha incrementado el interés en esta área de investigación, debido a la elevada incidencia de malformaciones congénitas en México, y se intenta incrementar la ingesta de ácido fólico en la dieta de mujeres en el periodo periconcepcional; por lo tanto para nosotros, es importante implementar medidas preventivas para disminuir la incidencia de DTN. Nuestro alcance en el tratamiento de síntomas de tracto urinario bajo como la vejiga hiperactiva es muy limitado, y esto conlleva, a un aislamiento social de la paciente con implicaciones en su calidad de vida, ya que son pacientes que presentan aumento de la frecuencia urinaria diurna o nocturna afectando su desempeño laboral y social, siendo inclusive causa de despidos laborales, etc. Es conocida la naturaleza multifactorial de los DTN incluida la espina Bífida oculta, la mayor implicación aunque no muy comprendida, se atribuye a la deficiencia en el metabolismo del ácido fólico el cual es influenciado por factores genéticos o ambientales, los cuales pueden ser modificados y buscar el mejor beneficio para la población. Los polimorfismos mayormente asociados a espina bífida oculta incluyen a C677T y A1298C. Actualmente no conocemos la prevalencia de estos polimorfismos en México, aunque ya hay estudios los cuales reportan una proporción en los diferentes genotipos para la mutación C677T de la MTHFR de 17.6 y 21.5% para CC, 47.6 y 52.3% para CT y 34.8 y 26.2% para TT; también se ha encontrado un 22% del genotipo A1298C, genotipos muy relacionados con DTN. Hay otro que confirma el origen multifactorial. Es el interés de este protocolo encontrar asociación entre las pacientes con sintomatología de vejiga hiperactiva, influencia genética y/o ambiental y espina Bífida oculta comprobado a través de estudios clínicos (urodinámicos, diario vesical, cuestionario de calidad de vida, etc.), determinación de mutaciones C677T y A1298C de la enzima MTHFR y estudios de imagen (radiografías de columna lumbar y sacra), respectivamente; esto pudiera ayudar a implementar

lineamientos preventivos, de diagnóstico y tratamiento encaminadas a mejorar la calidad de vida.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivos

1. Investigar la mutación del gen de la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (C677T y A1298C) en pacientes con espina bífida oculta.
2. Determinar la asociación entre trastorno urinario de origen neurológico tipo vejiga hiperactiva con espina bífida oculta.
3. Encontrar relación entre vejiga hiperactiva, espina bífida oculta y la mutación C677T y A1298C de la enzima 5,10- metilentetrahidrofolato reductasa.

Hipótesis

- Las pacientes con diagnóstico de espina bífida oculta tienen la mutación del gen de la enzima MTHFR termolábil con una frecuencia 20% mayor que en la población general.
- Los trastornos urinarios de origen neurológico se asocian con espina bífida oculta.

CAPITULO 2: MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio piloto transversal que incluyó a 32 pacientes de todas las que acuden a la clínica de urología ginecológica del Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" con sintomatología de tipo neurológico o vejiga hiperactiva según el concepto de la sociedad internacional de continencia. Durante dos meses se les invitó a participar y durante diciembre 2005 y marzo 2006 se les tomó la muestra sanguínea, todas llenaron consentimiento informado por escrito. Los criterios de inclusión fueron: diagnóstico de trastorno urinario de origen neurológico tipo vejiga hiperactiva (frecuencia, urgencia con o sin incontinencia), aceptar participar en el protocolo y llenar su consentimiento informado. Los criterios de no inclusión: diabetes mellitus, antecedente de evento cerebro vascular, trastorno urinario de tipo neurológico de origen central, antecedente de traumatismo de columna vertebral y antecedente de cirugía de columna vertebral. Se les realizó historia clínica completa, exámen uroneurológico, diario vesical, cuestionario estándar de calidad de vida por escrito, urocultivo, uretrocistoscopia y urodinamia multicanal. Los rayos X de columna lumbosacra antero posterior y lateral se tomó como método diagnóstico considerando la separación de los centros de osificación vertebral o falta de fusión de los elementos posteriores de la columna lumbosacra como hallazgos de espina bifida oculta; la extracción del DNA genómico se realizó a partir de una muestra de sangre periférica por el método de Miller y Gunstintich. El estudio del polimorfismo C677T se realizó por medio de la amplificación de un segmento de 198 pb, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El segmento incluye el exón 4, el cual contiene un sitio de reconocimiento para la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa, producto de un cambio de C por T en el codón 677, que convierte una adenina por valina. Para el Polimorfismo A1298C tomamos en cuenta que esta mutación se reconoce para la enzima MbolI. El genotipo 1298CC da 4 fragmentos 84,31, 30 y 18 pb, mientras que el genotipo 1298AA da 5 fragmentos 56, 31, 30 y 18 pb. La electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% se utilizó para el polimorfismo C677T y al 20% para el A1298C. El análisis estadístico se realizó a través de tablas de distribución de frecuencias y el programa Excel Windows XP.

CAPITULO 3: DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

DEFINICIÓN CONCEPTUAL

Trastornos urinarios de origen neurológico incluyen:

Detrusor Hiperactivo Neurogénico: Es la observación urodinámica caracterizada por contracciones involuntarias del detrusor durante la fase de llenado, con una condición neurológica relevante (15).

Discinergia Detrusor Esfínter: Contracción del detrusor al mismo tiempo de contracción involuntaria de la uretra y/o músculo estriado peri uretral.

Vejiga Hiperactiva: Es la manifestación clínica de urgencia y frecuencia con o sin incontinencia urinaria. Urgencia urinaria es el deseo de micción difícil de diferir y aumento de frecuencia urinaria mayor a 8 veces en el día y más de 2 veces durante la noche.

VARIABLE PREDICTORA:

Espina bífida oculta: Es el defecto de fusión ósea de la espina lumbosacra, identificado mediante estudio radiológico y que involucra una falla de fusión del arco posterior en uno o más niveles, usualmente en la región lumbosacra (16).

VARIABLE DE DESENLACE:

Gen de la metilentetrahidrofolato reductasa

El gen de MTHFR está localizado en el cromosoma 1p36.3 y está compuesto de 11 exones, (102pb a 432pb) y 10 intrones (250pb a 1.5 kb, con una excepción de 4.2kb). La secuencia del DNAC consiste de 2.2 kb. El corte y empalme alternativo del gen da una proteína de 77KDa con actividad catalítica, además de una Isoforma pequeña de 70 KDa que solo se observa en algunos tejidos. Interviene en el metabolismo del tetrafolato para donar un grupo metilo a la homocisteína.

CAPITULO 4: ORGANIZACIÓN DE RECURSOS

1. Recursos humanos y materiales.

Recursos humanos:
Médicos adscritos y residentes
Personal de enfermería

Recursos materiales:
Libreta de recolección de datos
Tubos de recolección de muestra sanguínea
Estudio de rayos X columna lumbosacra

2. Capacitación de personal.

Capacitación de personal:
No es necesario
Adiestramiento de personal:
No es necesario

3. Financiamiento

Interno

FUNCIÓN ESPECÍFICA

Dr. Ricardo García Cavazos

Propuesta integral del objetivo del estudio y apoyo logístico.

Dr. Primo Roberto Martínez Chavarría

- 1.- Selección de pacientes
- 2.- Recolección, análisis y procesamiento de datos
- 3.- Solicitud de estudios.

Dr. José Alfredo Sierra Ramírez

Procesamiento de la muestra de sangre periférica para la determinación del gen MTHFR.

Dr. Raymundo Guzmán Rodríguez (Radiólogo)

Toma y lectura de rayos X de columna lumbosacra para el diagnóstico de espina Bífida Oculta.

Dra. Esther Silvia Rodríguez Colorado

- 1.-Revisión de Protocolos de investigación.

2.-Revisión y supervisión de Recolección, Procesamiento y análisis de datos.

Enf. Consuelo Hernández

1- Colaboración en toma de muestras sanguíneas.

RESULTADOS

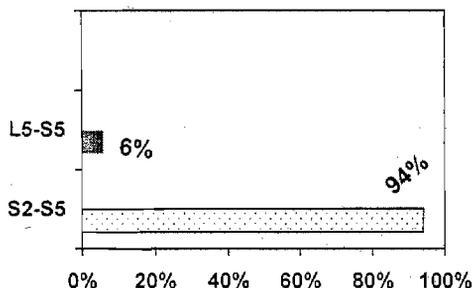
El promedio de edad fue de 47 años con un rango de 20 a 69 años, gravidez promedio de 4 embarazos, paridad en promedio de 3.

El mayor porcentaje de disrrafia lo encontramos en el nivel de S2 a S5 en 29 pacientes con un porcentaje de 94%, disrrafia L5 a S5 en 2 pacientes con un porcentaje de 6% (Fig. 1). Otros hallazgos de lesión importantes que encontramos fueron: escoliosis en 20 pacientes con porcentaje de 64.5%, asimetría de cadera en 9 pacientes con porcentaje de 29%, lordosis en 7 pacientes con porcentaje de 22.5%; espondilolistesis, lumbarización de S1 y sacralización de L5 se encontraron en un pacientes cada uno con porcentaje de 22.5% (tabla 1).

Tabla 1. Nivel de lesión espina bifida oculta.

Diagnostico de Lesión	Número	Porcentaje
Disrrafia S2-S5	29	94%
Disrrafia L5-S5	2	6%
Escoliosis	20	64.5%
Asimetría de Cadera	9	29%
Lordosis	7	22.5%
Espondilolistesis	1	3.22%
Sacralización L5	1	3.22%
Lumbarización S1	1	3.22%
Total	31	100%

Fig.1 Grado de lesión de espina bifida oculta



Para el polimorfismo C677T se encontró la siguiente distribución genotípica: heterocigoto CT 43.75%, Homocigoto mutado TT 34.37% y Homocigoto normal CC 21.87%; para la variante A1298C encontramos la siguiente distribución genotípica: heterocigoto AC 21.87%, homocigoto normal AA 71.87% y homocigoto mutado CC 6.25% (tabla 2). La frecuencia alélica para las variantes fueron: C677T alelo normal C de 43.73% y para el alelo mutado T de 56.25%; para el polimorfismo A1298C frecuencia alelo normal A de 82.81% y alelo mutado C de 17.18% (tabla 3). La relación entre los dos polimorfismos al comparar los genotipos heterocigotos (CT/AC) se encuentra en 12.5% valor muy bajo si tomamos en cuenta la prevalencia 43.75% del genotipo heterocigoto para C677T. Si este heterocigoto se combina con el homocigoto normal de A1298C (CT/AA) encontramos 31.25% de la población estudiada; si el homocigoto normal para C677T lo combinamos con el homocigoto mutado de A1298C (CC/CC) encontramos un porcentaje de 31.12% (tabla 4).

Tabla 2. Distribución de genotipos

Polimorfismo	Genotipo	Número	Porcentaje
C677T	CT	14	43.75%
	TT	11	34.37%
	CC	7	21.87%
A1298C	AC	7	21.87%
	CC	2	6.25%
	AA	23	71.87%
Totales		32	100%

Tabla 3. Distribución de alelos.

Polimorfismo	Alelo	Número	Frecuencia
C677T	T	36	0.5625
	C	28	0.4373
A1298C	A	53	0.8281
	C	11	0.1718
Totales		64	

Tabla 4. Relaciones entre los polimorfismos C677T y A1298C

C677T	A1298C	Número	Porcentaje
CT n:14	AC	4	12.5
	CC	0	0
	AA	10	31.25
TT n:11	AC	1	3.12
	CC	1	3.12
	AA	9	28.12
CC n:7	AC	2	6.25
	CC	1	31.12
	AA	4	12.5

DISCUSIÓN

Desde que en 1994 se clonó el gen de la enzima 5,10- metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) ya se describen 18 mutaciones de las cuales dos se relacionan con espina bifida oculta (13). La proporción de pacientes que acude a la clínica de Urología Ginecológica del Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" con diagnóstico de vejiga hiperactiva es muy numerosa al igual que en la población mundial, y las alteraciones en la mutación de la MTHFR demuestran una frecuencia genotípica muy marcada con la variante C677T y predominio del genotipo heterocigoto en 43.75% de las pacientes. El polimorfismo de la A1298C parece no tener relación en pacientes con espina bifida oculta y síntomas de vejiga hiperactiva, ya que al realizar la combinación de genotipos entre los polimorfismos los valores resultan no significativos.

Estos datos se acercan a conclusiones de estudios previos en donde se ha encontrado alta prevalencia de la mutación C677T asociado al riesgo de desarrollo de defectos del tubo neural (DTN). En un metanálisis de países europeos se ha encontrado 9.2% para el genotipo homocigoto y 16.4% de este mismo en casos de DTN, esta prevalencia varía según la población estudiada. Nuestros resultados se comparan con trabajos previos de población mexicana en donde se encontró una proporción genotípica de 17.6% para CC, 47.6% para CT y 43.8% para TT; su frecuencia alélica fue de 0.586 para el alelo T y 0.414 para el alelo C lo cual confirma la alta frecuencia del alelo mutado, parecido a nuestros resultados (13). Sin embargo, esto correlaciona también con estudios previos que demuestran una alta prevalencia de este polimorfismo en mujeres mexicanas en edad reproductiva con frecuencia genotípica de 21.5% para CC, 52.3% para CT y 26.2% para TT; a su vez son similares con el hallazgo de elevados niveles de homocisteína que avalan la fisiología del metabolismo del ácido fólico y sus derivados en la génesis de alteraciones estructurales como la espina bifida oculta (14).

En la variante A1298C una frecuencia de 0.82 para el alelo A (Alelo normal) y 0.17 para el alelo C (Alelo mutado) de nuestro estudio indica la probabilidad muy escasa de expresión fenotípica anormal, además su frecuencia genotípica nos da predominio del genotipo homocigoto normal AA de 71.87% y del genotipo mutado CC de 6.25%, el genotipo heterocigoto solo llega a 21.87%. En estudios previos se ha encontrado una proporción de 22% para esta mutación asociado a influencias ambientales y dietéticas (14). Al comparar los genotipos entre las dos variantes mutacionales no encontramos asociación y podemos decir que la presencia de la mutación A1298C al parecer no potencializa los efectos de la variante C677T como lo aseguran algunos autores (Tabla 4).

El diagnóstico de espina bifida oculta realizado con estudios de rayos X simple demuestra diversos grados de lesión ósea. En primer lugar, vemos que

la disrrafia espinal (falta de fusión del arco posterior de los cuerpos vertebrales) relacionada con las raíces sacras S2-S4 e involucradas en llevar la información nerviosa a órganos como la vejiga, recto, etc. se encontró en 94%, en cambio otros autores refieren una incidencia de espina bifida oculta de 17% en pacientes asintomáticos y hasta 38% en niños enuréticos (5); en segundo lugar, llama la atención la presencia de escoliosis en 64% y asimetría de cadera en 29% de nuestra serie. Parece ser que la alteración en el eje de sustentación podría condicionar en conjunto con las lesiones disrráficas, disfunción en las estructuras del piso pélvico como la vejiga hiperactiva, prolapso de órganos pélvicos e incontinencia anal. Sin embargo es necesario realizar estudios controlados para establecer una mejor asociación.

Este defecto del desarrollo del tubo neural la espina bifida oculta, ha sido asociado a la presencia de vejiga hiperactiva, disfunción clínica caracterizada por la presencia de frecuencia, urgencia con o sin incontinencia (15). Nuestro trabajo pudiera sugerirnos que la falta de fusión de los arcos vertebrales posteriores de la columna lumbar y sacra, pueden pasar asintomáticas en las primeras etapas de la vida del ser humano pero con el paso del tiempo y el apareamiento de enfermedades crónico degenerativas y el evento del embarazo y el parto en la mujer desencadenarían manifestaciones clínicas de vejiga hiperactiva en la edad adulta como lo confirman trabajos previos (4).

Se ha comprobado que la metilación del DNA y el factor epigenético, altera la regulación de la expresión genética y estos patrones de metilación también se han asociado con cáncer, aterosclerosis, pérdida gestacional recurrente, defectos cardiacos al igual que con espina bifida oculta; sin embargo, resulta difícil encontrar una causa específica del origen y por ello apoyamos la teoría "influencia multifactorial" en la génesis de estos defectos (19).

Otros autores han demostrado que la vitamina B12 participa en buena manera y es determinante en la elevación de la homocisteína. Por ello se prefiere dar suplementos a la población en donde hay una incidencia elevada de estos polimorfismos; ya se demostró que el ácido fólico y sus derivados pueden disminuir entre 50 a 70% la incidencia de DTN en general, aunque al momento no se ha encontrado la dosis ideal de folatos ya que su biodisponibilidad a través de todas sus reacciones químicas, fisiológicas y genéticas que involucran el metabolismo y la absorción del ácido fólico son muy complejas (17). La población con un estilo de vida vegetariano presentan deficiencia de vitamina B12 en 58% de los casos y elevación de los niveles de homocisteína en 48%. La participación alterada del metabolismo del ácido fólico y el DNA por la vía de la metilación, además de causar anemia megaloblástica también involucra otros padecimientos como el cáncer de colon y los defectos del tubo neural, esto se logra a través de el condicionamiento genético de estos polimorfismos combinado con deficiencias vitamínicas que

estimulan la expresión fenotípica de DTN en este grupo vulnerable de pacientes (20,21).

Recientemente también se ha involucrado a otros moduladores que interfieren en el metabolismo del ácido fólico muy asociado con las patologías anteriormente mencionadas, este modulador es el betaine (22).

A manera de conclusión podríamos decir que encontramos asociación con la mutación C677T en el genotipo heterocigoto en 43.75% de las pacientes con vejiga hiperactiva y espina bifida oculta y una frecuencia del alelo mutado de 56% similar que en estudios previos, apoyando nuestra hipótesis. No se encontró relación con la variante A1298C ya que su prevalencia de 71.88 de genotipo normal AA condiciona un valor para el alelo mutado C muy bajo (17%) y tampoco parece potenciar los efectos de la mutación C677T. Sin embargo, a pesar de ser un trabajo preliminar parece ser la tendencia que vamos a encontrar en estudios similares, estamos concientes que es necesario realizar estudios controlados y aleatorizados para establecer conclusiones más sólidas en el futuro. La espina bifida oculta consideramos que si tiene asociación con vejiga hiperactiva o trastornos miccionales ya que prácticamente en todas las pacientes encontramos algún grado de lesión, pero también se necesita otros estudios que lo confirmen. Los rayos X simple es una buena herramienta diagnóstica para espina bifida oculta y se considera parte del “estándar de oro” junto con la resonancia magnética, aunque estos resultados dependen del equipo utilizado y la experiencia en la interpretación de los resultados por el médico radiólogo, nosotros lo recomendamos por su disponibilidad, interpretación y fácil acceso para las pacientes.

CONCLUSIONES

- 1- La presencia de la mutación C677T de la enzima 5,10-metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) se ha encontrado en una proporción de 43.75% para el genotipo heterocigoto en pacientes con diagnóstico de vejiga hiperactiva y espina bifida oculta.
- 2- La presencia de la mutación C677T de la enzima 5,10-MTHFR tiene una frecuencia del alelo mutado de 56% y de alelo normal de 43%.
- 3- La presencia de la mutación A1298C de la enzima 5,10-MTHFR no se ha relacionado con la presencia de vejiga hiperactiva y espina bifida oculta encontrando una proporción de genotipo normal de 71.87%.
- 4- La frecuencia del alelo mutado del polimorfismo A1298C es del 17.18% y del alelo normal de 82%.
- 5- La presencia de la mutación C677T no es potenciada por la presencia de la mutación A1298C para su efecto en el metabolismo del ácido fólico y causar defectos estructurales como la espina bifida oculta.
- 6- El estudio de rayos X simple es una buena herramienta diagnóstica para espina bifida oculta aunque depende de aspectos técnicos y calidad del equipo utilizado.
- 7- Existe alta proporción de pacientes con síntomas de vejiga hiperactiva con hallazgos de lesión ósea a nivel lumbosacro que podrían estar relacionados con manifestaciones de disfunción del piso pélvico en general.
- 8- Es necesario estudios controlados y aleatorizados con mayor serie de casos para fortalecer estas conclusiones.

RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios controlados y aleatorizados con mayor serie de casos para fortalecer asociación entre vejiga hiperactiva, espina bifida oculta y presencia de la mutación C677T y de la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa.
2. La población que padece de vejiga hiperactiva a nivel del Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" y a nivel mundial oscila entre 40 al 60 % de las que consultan a centros especializados y merece una atención especial por personal capacitado multidisciplinario.
3. Esta enfermedad pasa desapercibida en muchas pacientes por creer que es parte del proceso evolutivo, es necesario tomar en cuenta que afecta su calidad de vida en el aspecto físico, sexual, emocional, social, económico, etc.
4. Deben implementarse programas especiales para la prevención primaria, secundaria y terciaria en pacientes con antecedentes de defectos del tubo neural.
5. El estudio de rayos X simple es un método diagnóstico disponible en muchos centros de salud y se considera parte del "estándar de oro" para espina bifida oculta y defectos del tubo neural en general.
6. Facilitar el acceso a los servicio de salud para pacientes con manifestaciones clínicas de vejiga hiperactiva, especialmente si presentan espina bifida oculta.
7. La espina bifida oculta debería estudiarse su relación con las demás disfunciones del piso pélvico como la incontinencia anal y prolapso de órganos pélvicos.
8. Fomentar esta área de investigación con personal idóneo y comprometido con los defectos del tubo neural y vejiga hiperactiva.

ANEXOS

Anexo 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Instituto Nacional de Perinatología
Dirección de Investigación
Protocolo de Investigación

Título del Protocolo

Identificación de la mutación C677T y A1298C del gen metilentetrahidrofolato reductasa en pacientes con espina bifida oculta y trastornos de la micción.

Investigador Principal: Dr. Ricardo García Cavazos
Dr. Primo Roberto Martínez Chavarria
Dra. Esther Silvia Rodríguez Colorado
Dr. José Alfredo Sierra Ramírez

Teléfonos INPer: 55209900 extensión 516

La información que a continuación le presentamos describe un estudio de investigación que estamos llevando a cabo en la clínica de urología ginecológica de este instituto. La vejiga hiperactiva es una enfermedad bastante frecuente en nuestra clínica y entre los factores involucrados se encuentra la espina bifida oculta que significa que existe una alteración en la formación de los huesos de la columna vertebral. Además se encuentra un componente genético que estamos investigando a través de una enzima llamada MTHFR (metiltetrahidrofolato reductasa) la cual participa en el metabolismo del folato ampliamente investigado. El estudio intenta encontrar relación entre estos factores esperando explicar un origen de su enfermedad. Nos gustaría contar con su participación y si usted lo desea le recordamos que tiene derecho a que le proporcionemos toda la información necesaria que se resume en lo siguiente:

- a) El propósito del estudio es encontrar una explicación más clara del origen de su enfermedad.
- b) El estudio durara 6 meses a partir de esta fecha a menos que posteriormente consideremos alargarlo para obtener mejores resultados.
- c) Se le extraerá 4 ml de sangre para verificación de presencia del gen Metiltetrahidrofolatoreductasa en sus variantes ya que esto podría estar involucrado en la causa de su enfermedad.
- d) No le causara molestia alguna a excepción del momento en que obtengamos la muestra sanguínea.
- e) El principal beneficio seria esclarecer el diagnostico de su enfermedad y factores relacionados a mi padecimiento actual.

- f) Puede preguntar cualquier duda que tenga acerca de su participación.
- g) Puede retirarse en el momento que considere necesario sin perjuicio alguno de su atención en este instituto.
- h) Se le entregara una copia con firma y fecha de esta carta.
- i) Su participación debe ser completamente voluntaria.

Introducción

El presente estudio que se realizara en esta clínica tendrá como duración 6 meses y los objetivos que perseguimos es encontrar alguna relación entre la vejiga hiperactiva, el componente genético y la espina bifida oculta, enfermedad muy frecuente en nuestra consulta diaria y relacionada con la incidencia de anomalías congénitas en mujeres mexicanas.

Procedimientos

En el momento que usted decida participar se le tomará una muestra sanguínea de 4 ml esto solo será una vez, se llenará una hoja de recolección de datos generales y a menos que se le necesite de nuevo se le llamará por teléfono y se vera en que momento es mas factible su presencia, cualquier duda puede llamar a los teléfonos que proporcionamos al inicio de esta carta. Los gastos este examen corren por cuenta del instituto.

También como parte del estudio se le realizará una radiografía de columna lumbar con el objetivo de verificar que todos los huesos de la columna estén completos ya que esto podría estar causando sus síntomas, en este estudio los gastos corren por cuenta de la paciente.

Riesgos

El riesgo al extraer la muestra sanguínea es mínimo, dolor, enrojecimiento, infección en el sitio de punción.

Tratamientos alternos

Por el momento deberá continuar con el tratamiento propuesto por el medico de su consulta.

Beneficios

Este estudio le servirá para esclarecer o complementar su diagnostico actual.

Compensación

No recibirá compensación alguna por su participación

Confidencialidad

También debe saber que su identificación, los resultados de las pruebas son de estricta confidencialidad y solo se revelaran por autorización escrita de usted de lo contrario esa información solo quedará en los archivos de la clínica de Urología ginecológica.

Participación voluntaria/ Retiro

Esta participación debe ser totalmente voluntaria y puede retirarse en el momento que usted considere necesario sin ningún efecto en su atención en este instituto, sus datos solo nos servirán si son completados en su totalidad.

Responsabilidad de la paciente

Es su responsabilidad que toda la información que proporciona sea completa y precisa, puntualidad en sus citas, así como notificar inmediatamente alguna molestia que le resulte de su participación.

Finalmente usted tiene derecho a realizar cualquier pregunta que considere necesaria y alguna duda que tenga en la que sea necesaria la intervención del comité de ética, lo puede solicitar para aclarar responsabilidades y derechos de ustedes los participantes.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____ por este medio notifico que he leído ampliamente la información que se me ha proporcionado, y los investigadores han esclarecido mis dudas acerca de participar en el protocolo de investigación científica, que se realizara en la clínica de urología ginecológica del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los reyes titulado **Identificación de la mutación C677T y A1298C del gen metilentetrahidrofolato reductasa en pacientes con espina bifida occulta y trastornos de la micción**, para lo cual doy mi consentimiento de forma voluntaria. Me ha quedado claro mis derechos y obligaciones de participar en este estudio, el propósito del estudio, los riesgos, los beneficios para lo cual autorizo para que se me realicen los análisis que sean necesarios de mi participación. También me han explicado que podré retirarme cuando lo desee sin que esto perjudique la calidad de mi atención en este instituto, además se han comprometido a entregarme los resultados del análisis en el momento que estén disponibles por escrito si fuera necesario, por lo que estaré pendiente de mis citas cuantas veces la institución y los investigadores lo requieran.

Y para fines que se decidan convenientes firmo la presente junto con un investigador que me informo y dos testigos.

Participante _____

Testigo 1 _____

Testigo 2 _____

México DF a los _____ días del mes
de _____ del 2006

Anexo 2

**PROTOCOLO ESPINA BIFIDA OCULTA
HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

Nombre: _____

Registro _____

Edad: _____ Expediente urología: _____

Dirección: _____

Teléfono _____

Paridad: G ___ P ___ A ___ C _____ Hijos vivos:

Mujeres _____ Hombres _____

Sintomatología:

Enurésis:

Edad de control de esfínteres:

Trastornos urinarios posteriores al parto:

Diagnóstico Urodinámico:

Radiografía:

Resultado de Mutación MTHFR:

Historia familiar de trastorno urinario:

Madre: _____ Edad: _____

Sintomatología:

2: Hermanas _____ Edad: _____

Sintomatología:

Hijas _____ Edad: _____

Sintomatología

Anexo 3

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	10-12/05	1-3/ 06	6/ 06	9/ 06
Citar pacientes e invitarlas a participar	X			
Firma de consentimiento informado	X			
Toma de muestra para determinación del gen		X		
Solicitud de Radiografía y lectura		X		
Recolección y Tabulación de datos			X	
Publicación				X

COMPLEMENTO

ANÁLISIS MOLECULAR PARA LA EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO:

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Biología Molecular, de la Subdirección de Investigación Biomédica del Instituto Nacional de Perinatología.

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, gotas de sangre seca, semen, tumores, cabellos o tejidos antiguos. En este estudio, se realizó la extracción de DNA, en todos los sujetos incluidos en el estudio, a partir de leucocitos obtenidos de sangre periférica, mediante el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega).

Aislamiento del DNA genómico a partir de sangre venosa periférica.

- Obtención de la muestra
- Extraer en tubo Vacutainer (EDTA) 3 ml de sangre periférica.
- Homogenizar suavemente por inversión.
- Almacenar a temperatura ambiente y procesar lo más rápido posible.

Lisis celular y nuclear.

- A un tubo estéril, con capacidad de 1.5 ml, adicionar 0.9 ml de solución de lisis celular.
- Transferir los 300 mcl de sangre, mezclar por inversión e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Invertir 5 a 6 veces durante la incubación.
- Centrifugar a 16,000 x g por 2min. Remover y desechar el sobrenadante sin perturbar el pellet blanco, dejando de 10 a 20 mcl de líquido residual.
- Mezclar en vortex para resuspender los leucocitos, 10 a 20seg.

- Adicionar 300 mcl 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 1h., cuando se observan grumos celulares.

Tratamiento con RNAsa (Opcional)

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

Precipitación de proteínas

- Adicionar 100mcl de la solución de precipitación de proteínas.
- Mezclar vigorosamente (Vortex) por 20 segundos.
- Centrifugar a 16,000 x g por 3min
- Se observaran las proteínas precipitadas en un pellet café oscuro

Precipitación del DNA

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

Hidratación del DNA

- Adicionar 100 mcl de la solución de hidratación.
- Dejar re-hidratándose toda la noche a temperatura ambiente. Alternativamente, calentar a 65° C por 1 hora. Mezclar periódicamente para dispersar al DNA.
- 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 (λ 280nm)

Tipificación del polimorfismo genético

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica descrita en 1991, por Mullis de la corporación Cetus. 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 en forma exponencial.

Las condiciones de amplificación para efectuar la reacción de PCR fueron modificadas del protocolo de Leclerc D (43):

Adicionar en un tubo de reacción de 0.2 ml:

- El volumen equivalente a 500 ng de DNA genómico.
- Buffer 10X (5mcl)
- Dimetil-sulfoxido (DMSO) (2.5 mcl)
- MgCl₂ 50mM (1 mcl)
- Desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's) 2.5mM (1mcl)
- Oligonucleótido F* 200mM (1mcl)
- Oligonucleótido R200 *mM (1mcl)
- 0.75U de Taq polimerasa (1unidad=0.3 mcl)
- Aforar con agua bidestilada a un volumen de reacción final de 50 mcl

Se utilizan los oligonucleótidos sentido; 5'-GCA GGG AGC TTT GAG GCT GAC-3' y antisentido; 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3', para amplificar un producto de PCR de 228 pb, que incluye la posición 677 del gen MTHFR.

Se utilizan los oligonucleótidos sentido; 5'-ATG TGG GGG GAG GAG CTG AC-3' y antisentido; 5'-GTC TCC CAA CTT ACC CTT CTC CC-3', para amplificar un producto de PCR de 240 pb, que incluye la posición 1298 del gen MTHFR.

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

- Desnaturalización 92°C 60s
- Alineación 54°C 30s
- Extensión 72°C 30s
- Extensión final 72°C 7min

15 mcl de los productos de PCR son sometidos a electroforesis en gel de agarosa (2%) con objeto de confirmar la presencia de los fragmentos amplificados.

Digestión con la enzima de restricción

Digestión de los productos amplificados de la posición 677 del gen MTHFR, con la enzima de restricción Hinf I

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

Las condiciones de digestión para tipificar las muestras fueron modificadas del protocolo de Leclerc D (43):

Adicionar en un tubo de 0.5mL

- a. De la reacción de PCR 20 mcl.
- b. Enzima Hinf I (0.1 mcl)
- c. Buffer específico de la enzima (2.5 mcl)
- d. Agua bidestilada para un volumen final de reacción de 25mcl

Se incuba en baño maría a 37° C por 2:30 a 3:00 hrs. Se somete a electroforesis en gel de agarosa (4%) con objeto de observar la presencia de los fragmentos digeridos, se coloca en un carril un marcador de peso molecular (escalera de 50pb).

El fragmento original de la reacción de PCR mide 189 bp, cuando la enzima digiere genera dos fragmentos uno de 153 bp y otro de 36 bp, 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).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Velásquez D. LL, Babinsky VM. Variedades más frecuentes de defectos del cierre del tubo neural múltiples. *Revista de salud Pública y Nutrición* 2000; 2: 45-48.
- 2- Tubaru A and Palleschi G. Overactive bladder: epidemiology and social impact. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005; 17: 507-511.
3. Galloway NTM, Tanish J. Minor defects in the sacrum and neurogenic bladder dysfunction. *Br J Urol* 1985; 57:154-155.
4. Fidas A, MacDonald HL, Elton RA, McInnes A, Wild SR, Chisholm GD. Prevalence of spina bifida occulta in patients with functional disorders of the lower urinary tract and its relation to urodynamic and neurophysiologic measurements. *Br Med J* 1989; 298:357-359
5. Del Gado R, Aceto G, Del Gaizo D, Del Gado G, Polidori G, Chiozza ML. Desmopressin for the treatment of nocturnal bedwetting in patients with neural tube closure defects. *Journal of Urology* 2004; vol 171:1656-1658.
6. Bruner JP, Tulipan N. Tell the truth about spina bifida. *Ultrasound obstetrics Gynecol* 2004; 24: 595-596.
7. Birnbacher R, Messerschmidt AM, and Pollak AP. Diagnosis and prevention of neural tube defects. *Curr Opin Urol* 2002; 12: 461-464.
8. Bruner JP, Tulipan N, et al. Upper level of the spina bifida defect: how good are we? *Ultrasound Obstetrics Gynecol* 2004; 24:612-617.
9. Geisel J. Folic acid and neural tube defects in pregnancy. *J Perinatal Neonat Nurs* 2003; 17(4): 268-279.
10. Mc Guire EJ, Woodside JR, Borden TA, et al. Prognostic value of urodynamic testing in myelodysplastic patients. *J Urol* 1981; 126:205-209
11. Gallou-Kabani C and Junien C. Nutritional epigenomics of metabolic syndrome. *Diabetes* 2005; 54: 1899-1906.
12. Lucock Mark. Is folic acid the ultimate functional food component for disease prevention? *BMJ* 2004; 328: 211-214.
13. Mutchinick OM, Lopez MA, Luna L, Waxman J, Babinsky VE and the RYVEMCE Collaborative Group. High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Mol Genet and Metab* 1999; 68: 461-467.
14. Torres-Sanchez L, Chen J, Diaz Sanchez Y, Palomeque C, Bottiglieri T, Lopes-Cervantes M and Lopez-Carrillo L. Dietary and genetic determinants of homocysteína levels among mexican women of reproductive age (Abstract). *Eur J Clin Nutr* 2006; 60(6): 691-697.
15. Abrams P, Cardozo L, Fall L, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, Kerrebroeck P, Victor A, Wein A. The standardisation of terminology of lower urinary tract function. *Neurourol.Urodynam* 2002; 21:167-178.
16. Kaufman BA. Neural tube defects. *Pediatric Clinic of North America* 2004; 5 (2): 214-216.
17. Van der Linden IJM, Afman LA, Heil SG and Bloom HJ. Genetic variation in genes of folate metabolism and neural tube defects risk (Abstract). *Proceedings of the nutrition society* 2006; 65(2):204-215.

18. Finglas PM, de Meer K, Molloy A, Verhoef P, et al. Research goals for folate and related B vitamin in Europe (Abstract). *Eur J Clin Nutr* 2006; 60(2): 287-294.
19. Geisel J, Schorr H, Bodis M, Isber S, et al. The vegetarian life style and DNA methylation (Abstract). *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine* 2005; 43(10): 1164-1169.
20. Friso M and Choi SW. The potential co carcinogenic effect of vitamin B 12 deficiency (Abstract). *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine* 2005; 43(10):1158-1163.
21. Choi SW and Friso S. Interactions between folate and aging for cocarcinogenesis (Abstract). *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine* 2005; 43(10): 1151-1157,
22. Ueland PM, Holm PI and Hustad S. Betaine: a key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status (Abstract). *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine*. 2005; 43(10): 1069-1075.
23. Castro IR, Ravasco P, Camilo ME, Jakobs C, Bloom HJ and de Almeida IT. 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T and 1298A>C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet* 2004; 41: 454-458.
24. Botto LD and Yang Q. 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: A huge review. *Am J Epidemiol* 2000; 151(9): 862-887.