

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**Instituto Nacional de Perinatología
“Isidro Espinosa de Los Reyes”**

**Determinación del polimorfismo C677T y C1298A
del gen de la MTHFR en madres con hijos
afectado con defectos del tubo neural.**

Tesis

**Que para obtener el título de:
Especialista en Ginecología y Obstetricia
PRESENTA**

MARIA EMILIA GUERRA GARCIA.

**DR. VALENTÍN IBARRA CHAVARRÍA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO**

**DR. RICARDO GARCIA CAVAZOS.
ASESORAS**



**MÉXICO DF.
2006**

AÑO



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.

AUTORIZACIÓN DE TESIS

**Determinación del polimorfismo C677T y C1298A
del gen del la MTHFR en madres con hijo
afectado con defectos del tubo neural.**

DR. RICARDO GARCÍA CAVAZOS
DIRECTOR DE ENSEÑANZA

DR. VALENTÍN IBARRA CHAVARRÍA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO

DR. RICARDO GARCIA CAVAZOS
ASESOR

DEDICATORIA

A mi papá y mi mamá por su amor, apoyo, comprensión; por ser el ejemplo de la dedicación, la honestidad, el trabajo y las ganas de salir adelante, por enseñarme la esencia de la vida llena de ideales, por que por ellos simplemente soy.

A mi esposo enrique por su amor incondicional, comprensión, apoyo y por que estamos aprendiendo a caminar y encausar nuestros barcos hacia un rumbo, disfrutando simplemente del hecho de vivir plenamente.

A emilia quien con su presencia me ha enseñado que el ser madre es por mucho la esencia primaria de la vida

A mis hermanas ale y bety.

A mis amiguitos pera y enrique que caminamos juntos estos cuatros años conociendo la palabra amistad y lealtad porque nos aceptamos como somos, nos respetamos y somos y seremos siempre los piojos.

AGRADECIMIENTOS.

Al Instituto Nacional de Perinatología, gracias a esta casa por enseñarme que ser un buen profesionalista implica, disciplina, esfuerzo, responsabilidad y dedicación.

Al Dr. Cavazos por tender su mano en los momentos difíciles, por compartir su trabajo de toda su vida, siempre con una palabra de aliento y esperanza para la realización de esta tesis, por hacerlo por el motivo que siempre ha inspirado su trabajo: “el amor a la ciencia”.

Al M. en C. Manuel Saavedra que participo en este estudio y que desgraciadamente perdió la vida en su mejor edad y desarrollo.

A todos los maestros de esta institución que aportaron en mi crecimiento medico día a día.

Al Dr. Carlos Neri por darme la oportunidad y el voto de confianza para emprender el camino en esta institución.

A todos los residentes de mayor jerarquía que me enseñaron: disciplina, amor a la institución, trabajo en equipo y amistad. (Mirna, David, Gaby, Bobby, Ayala).

Agradecemos profundamente el apoyo para la realización de este estudio a los Laboratorios Valdecasas que permitieron la compra de suministros y reactivos, así como la donación de una incubadora y un termociclador.

INDICE

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	1
Formación del tubo neural.....	1
Neurulación Primaria.....	3
Neurulación Secundaria.....	5
Defectos del Tubo Neural.....	6
Marco Teórico.....	13
Síntesis del Proyecto.....	14
Planteamiento del Problema.....	19
Justificación.....	19
Objetivos e Hipótesis.....	19
CAPITULO II. MATERIAL Y MÉTODOS	21
Diseño del estudio.....	21
Metodología.....	21
Modelo y Descripción del Estudio.....	21
CAPITULO III. RESULTADOS	23
CAPITULO IV. DISCUSIÓN	25
CAPITULO V. ANEXO	28
CAPITULO VI. BIBLIOGRAFÍA	29

INDICE DE FOTOGRAFIAS

Fotografía 1. Microfotografía de Microscopio Electrónico de Barrido, donde se identifica la placa neural invaginándose, y el acercamiento de los pliegues para lograr el cierre del tubo neural en embrión de pollo.....	4
Fotografía 2. Teoría de los Multisitios de Cierre del Tubo Neural de Van Allen.....	5
Fotografía 3 y 4. Mielomeningocele Sitio 1.....	7
Fotografía 5. Anencefalia Sitio 2.....	9
Fotografía 6. Encefalocele Occipital sitio 4.....	10

INDICE DE FIGURAS

Figura I. Ciclo metabólico del folato.....	15
Figura II. Estructura química del ácido fólico y sus componentes.....	18

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución genotípica y frecuencias alélicas para el polimorfismo 677C>T entre madres de casos y controles.....	23
Tabla 2. Distribución genotípica y frecuencias alélicas para el polimorfismo 1298 A>C entre madres de casos y controles.....	23
Tabla 3. Razón de momios en la distribución genotípica y frecuencias alélicas para el polimorfismo 677C>T entre madres de casos y controles.....	24

RESUMEN

La etiología precisa de los defectos del tubo neural no se conoce exactamente. Existe mucha evidencia que sugiere que las mutaciones en el gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) son factores de riesgo para defectos del tubo neural en varias poblaciones.

En este estudio de casos y controles, analítico comparativo transversal, se evalúa la asociación entre los polimorfismo materno C677T y C1298A del gen de la MTHFR en madres con hijos afectados con defectos del tubo neural en el Instituto Nacional de Perinatología.

Se obtuvieron muestras sanguíneas de 139 casos y 83 controles para determinar el genotipo materno, el cual fue sometido a análisis.

Se encontró que en relación al polimorfismo de 677C>T hay en el caso del genotipo de heterocigotos un riesgo incrementado de defectos del tubo neural (OR de 2.95 IC 1.99-3.90), así mismo se encontró un riesgo incrementado para homocigotos para DTN (OR de 2.88 IC 1.91-3.84).

El riesgo se incrementa de forma similar tanto para las madres heterocigotos (CT) como para las homocigotos (TT), lo cual determina la relación importante del genotipo materno para la presencia de hijos con DTN sin la suplementación de ácido fólico

En relación a estos resultados cabe señalar la importancia que tiene la ingesta adecuada de ácido fólico periconcepcional por la población mexicana debido a la importante asociación del polimorfismo 677C>T que determina la disminución de la actividad de la enzima MTHFR.

CAPITULO I. INTRODUCCION.

Los defectos congénitos constituyen una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en los recién nacidos. La incidencia y prevalencia de los defectos al nacimiento representa un problema de salud no solo en la República Mexicana, sino en el mundo, en donde se reporta aproximadamente 1 de cada 50 recién nacidos vivos y 1 de cada 9 recién nacidos muertos. (1). Los defectos en el cierre del tubo neural (DTN) constituyen uno de las principales defectos congénitos en México.

Los defectos del tubo neural son de las malformaciones congénitas mas comunes afectando 0.6 por 1000 nacidos vivos en los Estados Unidos (2), existen numerosos reportes de la incidencia de estos defectos por ejemplo: en Nueva Escocia el reporte es de 1-2/1000 nacimientos (3). En nuestro país, los DTN ocupan uno de los primeros lugares en las incidencias, reportadas en estudios epidemiológicos siendo de 8-10/1000 recién nacidos vivos. Para un corte al mes de agosto del 2000, el registro epidemiológico indica que en el estado de Puebla se reporta 170 casos que corresponde a 13.7/1000 recién nacidos vivos, en segundo lugar el estado de México con 115 casos que corresponde al 3.7/1000 recién nacidos vivos, en tercer lugar Veracruz con 42 casos que corresponde al 2.7/1000 recién nacidos vivos, siguiendo Oaxaca con 33 casos que corresponde al 4/1000 recién nacidos vivos y San Luis Potosí con 33 casos siendo el 6.2/1000 recién nacidos vivos. (1)

Los defectos del tubo neural incluyen toda anomalía congénita que implica una falla en el cierre del tubo neural o una reapertura entre la segunda y la quinta semana del desarrollo, afectando tanto la formación del sistema nervioso como del cráneo y la columna. El defecto puede presentarse en varios puntos de la línea media dorsal siendo una alteración de la neurulación primaria y secundaria durante la tubulación embrionaria.

FORMACION DEL TUBO NEURAL.

Durante la segunda semana, el esbozo del sistema nervioso central en el humano aparece en el embrión presomítico, debido a que el complejo cordomesodermico u organizador primario esta constituido por mesodermo regionalizado de la siguiente manera:

a) axial o notocordal, b) cefálico o placa precordial, y c) somático o paraxial, que liberan evocadores que lo inducen a diferenciarse.

Los evocadores son sustancias químicas que actúan como hormonas morfogenéticas y son las responsables de inducir al neuroectodermo, situado en el

centro del ectodermo superficial, sobre el complejo cordomesodermico a diferenciarse en la placa neural y más adelante en el surco y el tubo neural.

Cuando se forma la placa neural cambia la distribución de las moléculas de adhesividad celular o CAMs de la superficie de las células ectodérmicas localizadas en la membrana plasmática y la adhesión es mediada por Calcio. En el epiblasto se expresan N-CAM y L-CAM antes de la inducción primaria. Cuando se diferencian las células neuroepiteliales pierden el L-CAM y conservan el N-CAM. (4)

Las células neuroepiteliales que al principio del desarrollo eran cuboides, tienen en su citoplasma microtúbulos y microfilamentos dispuestos al azar. Cuando son inducidos por el organizador primario para formar la placa neural, las células se vuelven columnares por que los microtúbulos se colocan paralelos al eje mayor de las células neuroepiteliales. Los microfilamentos de actina se colocan en el ápice de las células y se unen a desmosomas por medio de una proteína llamada espectrina. Por contracción de los microfilamentos, se reduce poco a poco el ápice de las células como si se tratara de la jareta de una bolsa de tabaco y se forman el surco y los pliegues neurales que intentan unirse para formar cerrarse y formar el tubo neural. Cabe señalar que los pliegues neurales al acercarse presentan un rechazo y se dirigen lateral a la línea media para desprenderse del tubo neural y constituir las crestas neurales.

Se han estudiado una serie de factores que participan en la diferenciación del sistema nervioso central. Entre estos se encuentra la notogina y la cordina, producidas por la notocorda que determinan la diferenciación del prosencéfalo o cerebro anterior en presencia del factor de crecimiento fibroblástico 8. Su acción consiste en inhibir la acción de las proteínas morfogenéticas óseas 4 y 7 que inducen al ectodermo a formar neuroectodermo, en donde se expresan antes de la diferenciación de la parte dorsal y central, los genes Pax3, Pax7, Msx1 y Msx2. (4)

Las proteínas morfogenéticas óseas 4 y 7 inducen la expresión del gen slug en el ectodermo de las crestas neurales y los genes Pax3 y Pax7 en la mitad dorsal del tubo neural.

El gen sonic hedgehog (Shh) que libera un factor de transcripción notocordal, determina la formación de la placa del piso del tubo neural en el que también inhibe la expresión de los genes Pax3 y Pax7 en la parte ventral del tubo. En esta región se manifiesta la acción del gen Pax6. (4)

La activina participa en el desarrollo de las estructuras axiales e induce la flexión del embrión hacia el lado izquierdo al inhibir la acción del Shh. Indirectamente el gen nodal genera un factor de crecimiento que interviene en la formación de la línea primitiva y el nódulo de Hensen de donde se forma la

notocorda y simultáneamente provoca la flexión hacia la izquierda del tubo cardíaco y del cuerpo del embrión en conjunto.

El factor nuclear hepático-3B es indispensable para que se diferencie el nódulo de Hensen, la notocorda, las estructuras de la línea media craneales al nódulo, la placa del piso y para que inicie su función el nódulo. En ausencia de este no existe notocorda ni placa del piso en el tubo neural.

El gen T que determina el movimiento de las células del mesodermo de la línea primitiva para formar la notocorda es otro de los factores importantes en el desarrollo de la cabeza del embrión, el gen Lim-1 detectado en el nódulo de Hensen y después en la placa precordial participa en la inducción de la cabeza del embrión desde el prosencéfalo hasta la segunda rombomera así mismo participan el gen goosecoide y el cerebrum. (4)

Los genes engrailed1 y 2 participan en la diferenciación del mesencéfalo y el cerebelo. El Wnt 1 y 2 se expresan desde el diencéfalo en forma difusa y débil, en el mesencéfalo y de la rombomera 3 a la 8 que abarcan del cerebelo a la medula espinal, Wnt 7 participa en la diferenciación de los hemisferios cerebrales y el diencéfalo. El grupo de genes homeóticos, homeoboxes u Hox como los Hox-a y Hox-b intervienen en la diferenciación de las rombomera 3 a la 8 y la segmentación de las mismas. El gen Krox 20 cuya proteína tienen dedos de Zinc (zinc-finger), regula la expresión de los genes Hox junto con el ácido retinoico. (4)

NEURULACION PRIMARIA.

Es la formación del tubo neural, por el plegamiento de la placa neural. El proceso concluye con el cierre de los neuroporos.

La placa neural tiene contorno piriforme, debido a que la región cefálica es más amplia que la caudal. A los lados de la placa neural hay dos bandas de neuroectodermo, que dan origen a las crestas neurales que hacia el lado externo están en contacto con el ectodermo superficial.

La placa neural es un epitelio engrosado, constituido por células columnares, que tienen su núcleo colocado a diferentes niveles y sus membranas son muy delgadas.

Cuando la placa neural, engrosada, se invagina en sentido longitudinal, desde la región dorsal del embrión y toma el aspecto de una zapatilla, el surco neural se profundiza sobre todo en la parte media del embrión y sus bordes se acercan. Al principio de la cuarta semana en el embrión con 7 pares de somitas, sus bordes se unen y empiezan a formar el tubo neural a la altura del cuarto al sexto par de somitas. (Fotografía 1)

El tubo neural continúa su cierre, al mismo tiempo, hacia la región cefálica y a la caudal, como si dos cierres de cremallera avanzaran en sentido contrario, este proceso se da en esta primera zona de cierre que empieza de la cuarta a la sexta somita cervicales y hasta las primeras lumbares.(Fotografía 2)

La segunda se produce a partir de la futura fontanela frontoparietal y avanza también en ambos sentidos, abarca entre la región frontal y la parieto-occipital.

La tercera corresponde al cierre del neuroporo anterior que se procede en sentido cráneo caudal.

La cuarta empieza a nivel de las primeras somitas cervicales, donde concluye el cierre de la primera, avanza en sentido craneal y concluye en la fontanela parieto-occipital que es el lugar en donde termina el cierre de la segunda zona.

La quinta corresponde al cierre del neuroporo posterior que se produce en sentido caudocraneal y termina en la región lumbar en donde concluye el cierre de la zona uno.

MULTISITIOS DE CIERRE DEL TUBO NEURAL



En la etapa de diez pares de somitas, el cuarto par corresponde a la parte cervical de la medula espinal: por lo que aproximadamente las dos terceras partes de esbozo del SNC originan las vesículas cerebrales y el tercio caudal la medula espinal.

Las últimas partes del tubo neural que se cierran son el neuroporo anterior y el posterior. El neuroporo anterior se cierra el día 24, en la etapa de 20 somitas y el neuroporo posterior el día 26 en el embrión de 25 somitas; de manera que al final de la cuarta semana, termina el cierre del tubo neural.(neurulación primaria) (4).

NEURULACION SECUNDARIA.

El neuroporo posterior se cierra en la parte subterminal en la placa neural y en la parte final del tubo neural se lleva a cabo la neurulación secundaria, que consiste en la canalización y cavitación directa del tejido sólido de la placa neural, que constituye la formación de la luz o canal neural en la parte del cono terminal, el cual se elonga en relación al crecimiento de la columna. Cuando esta parte de la placa neural se invagina, queda cubierto por ectodermo igual que el resto del tubo neural. Después por la apoptosis, las células del centro de la placa desaparecen y por cavitación se forma la luz del tubo que se continúa con la que se originó durante la neurulación primaria por invaginación y plegamiento de la placa neural.

La neurulación secundaria es muy importante porque se ha observado que si no se invagina la placa neural en esta zona, se produce la espina bífida expuesta a nivel lumbosacro.

La parte rostral o anterior, desde un principio mas amplia, por crecimiento diferencial, origina tres dilataciones separadas por constricciones, que son el esbozo de las tres vesículas cerebrales primitivas, el prosencéfalo, el mesencéfalo y el romboencéfalo que constituyen las dos terceras partes del sistema nervioso central y el tercio caudal es la medula espinal.(4)

DEFECTOS DEL CIERRE DE TUBO NEURAL.

Los defectos del cierre del tubo neural se pueden originar por la falta del cierre de los neuroporos de cualquier parte del tubo neural o a falla en la neurulación secundaria, causada por una alteración de la inducción a falta de respuesta del neuroectodermo o producción anormal de evocadores provocados por agentes teratógenos de diferente naturaleza química.

Los defectos del tubo neural (DTN) como anencefalia, encefalocele y espina bífida abierta o mielomeningocele son los defectos más frecuentes y más

catastróficos, estudios en México reportan > 4.8/1000 recién nacidos vivos presentan DTN. (1)

La **espina bífida** es el defecto en el cierre de la columna vertebral a nivel de los arcos neurales, que al permanecer separados producen la raquisquisis por esquisoplasia de los procesos espinosos. Cuando el defecto es leve se presenta espina bífida oculta que se relaciona con estigmas cutáneos como el nevo piloso o una macula hiperpigmentada.

El **seno dérmico raquídeo** se observa como una foseta en la piel del niño, en la parte media de la región sacra a nivel del cierre del neuroporo posterior. Con frecuencia la foseta esta rodeado por pelo y hacia el interior se conecta por medio de un cordón fibroso con la duramadre no produce alteraciones funcionales.

El **meningocele** aparece cuando los arcos neurales están muy separados en una espina bífida o abarca más de una vértebra, y se puede herniar las meninges y originar una espina bífida con meningocele, en general esta cubierto por piel o por una membrana delgada. Los meningoceles muy voluminosos en general se ulceran y se perforan antes o después del nacimiento y por esa fístula se pierde líquido cerebroespinal y entran microorganismos que pueden producir meningitis. La región lumbosacra es la zona en la que se localizan la mayoría de los meningoceles seguida por la cervical y en menor proporción en otras regiones.

Mielomeningocele o meningomielocele es un tipo de espina bífida quística en la que la medula espinal y las raíces e incluso los ganglios raquídeos se encuentran dentro del meningocele (Fotografía 3 y 4) lo que provoca que por debajo de la zona de la alteración el niño pierde inervación sensitiva y motora. Los músculos se inmovilizan el niño no puede caminar, el esfínter anal o el vesical o los dos están paralizados, hay incontinencia y anestesia en silla de montar. La posición en la que se encuentra con mayor frecuencia es la lumbar y es más común que el meningocele. Su incidencia varia en relación a los diferentes países como por ejemplo en la India 6/1000, en Estado Unidos 1/1,000, en la Gran Bretaña 1.5/1000 en el mundo 2.6/1,000.

Mielosquisis o mielomeningorraquisquisis. Es una espina bífida expuesta en la que la médula espinal permanece en la posición primitiva de la placa neural, como una capa gruesa de neuroepitelio que no se pliega.

Su origen puede ser una alteración en la neurulación primaria, en la que la distribución primitiva, al azar, de los microtúbulos y los microfilamentos se conserva, en lugar de que los microtúbulos se colocan

en sentido paralelo al eje mayor de las células neuroepiteliales y los microfilamentos en el ápice, lo que determina que éste reduzca su diámetro, se acerquen los bordes o pliegues neurales para formar el surco y después el tubo neural.

Otras causas podría ser, que el neuroporo posterior permanezca abierto después de la cuarta semana, en que habitualmente se cierra o una falla de la neurulación secundaria por la cual, la parte de la placa neural localizada en posición caudal al neuroporo posterior permanece en la superficie dorsal del embrión, en lugar de invaginarse y después canalizarse por apoptosis.

Dependiendo de la posición y de la extensión de la mielosquisis, se producen diferentes grados de alteraciones neurológicas, entre las que se encuentra la pérdida de la sensibilidad cutánea y la parálisis parcial o total de los músculos esqueléticos, la anestesia en silla de montar, la parálisis del esfínter anal y del vesical o sólo uno de los dos.

Anencefalia con acrania. Junto con el meningoencefalocelo son las anomalías del cerebro más frecuentes (Fotografía 5) se debe a la falta de cierre del neuroporo anterior en la cuarta semana del desarrollo en el sitio 2. Este defecto incluye del 50 al 65% de todos los DTN.

En la anencefalia se diferencian de manera rudimentaria los núcleos basales del encéfalo y del tallo cerebral, pero como el cráneo es bífido y existe una acrania y por lo tanto exencefalia, los hemisferios cerebrales al estar en contacto con el líquido amniótico el tejido de la corteza degenera.

Todos los niños anencéfalos mueren; aproximadamente el 50% en etapa prenatal, la mayoría dentro de las 48 horas postnatales y en los que tienen el cráneo cerrado han sobrevivido hasta cerca de 2 meses. Es frecuente que la anencefalia se asocie con mielosquisis y mielomeningocele. Como el niño no puede deglutir debido a la alteración tan profunda del cerebro, se produce polihidramnios y el nacimiento es prematuro.

Es de mayor incidencia en el primer embarazo, y se presenta en una proporción de 2-3:1 en mujeres con respecto a los varones, lo que concuerda con una anomalía multifactorial, en la que intervienen factores

genéticos y ambientales, como la situación geográfica o contaminantes que se encuentran en estas zonas, deficiencias nutricionales, especialmente ácido fólico o bien hipertermia materna o exposición a fármacos potencialmente teratogénos, entre otros. Por ejemplo, en Belfast y Dublín en Irlanda del Norte se encuentra la frecuencia mayor que es de 10/1000 comparado con el resto del mundo es de 3/1000.

En los casos en donde la bóveda craneana persiste y se presenta craneosquisis con salida de tejido encefálico junto con meninges se produce un meningoencefalocele, que puede ser occipital, interparietal o frontal y dependiendo del sitio en el que se encuentre se producen diferentes tipos de daño cerebral, que provocan la muerte de los niños si es extenso. Si además del encéfalo y las meninges se proyecta en la hernia parte de los ventrículos laterales se desarrolla un meningohidroencefalocele y es más grave el defecto. En conjunto los tres defectos se presentan en 0.5/1000 recién nacidos.

En algunos niños que presentan mielomeningocele el cráneo no se osifica bien en la parte interna de los huesos planos de la bóveda craneal que se deprimen. A este defecto se le conoce como craneolacunia.

El **encefalocele** occipital es menos frecuente y letal provocando microcefalia por salida de tejido encefálico por el sitio de apertura el sitio en que no cierra en este caso se encuentra en los sitios 3 y 4 de los sitios de multicierre. (Fotografía 6)

En cuanto al origen de los defectos del tubo neural incluye tanto factores genéticos y ambientales, que interactúan para precipitar dicha alteración, en el 95% no existen antecedentes o historia familiar de esta alteración, pero hay casos con patrones de herencia mendeliana específica por lo que el riesgo de recurrencia es mayor. El defecto se puede presentar en forma aislada o ser parte de un síndrome con otros defectos asociados y el patrón genético difiere con los casos aislados. Hay casos hereditarios con patrón autosómico recesivo donde el riesgo de recurrencia para un segundo hijo es alto (25%), son pocos los casos ligados al cromosoma X recesivo donde se afectan los varones en un 50% y la presencia de DTN en trisomía 18 se ha detectado en el 10% de los casos.(1)

Entre los factores ambientales se han identificado: diabetes materna, exposición a anticonvulsivos e hipertermia materna en el primer trimestre y el déficit de ácido fólico

Debido a la complejidad etiológica del DTN la identificación de los genes directamente involucrados en la determinación de la susceptibilidad a estas malformaciones ha sido muy difícil (5). En estudios clínicos y experimentales recientes se ha asociado el consumo de ácido fólico para la prevención de DTN por lo que han surgido varios estudios hacia la investigación para determinar el efecto protector de esta vitamina B. (6,7)

La suplementación de ácido fólico ha disminuido la incidencia de los DTN en un 70%, y ha hecho que se estudien los genes directamente involucrados en el metabolismo del ácido fólico: como el gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) con dos polimorfismos el 677C>T y 1298 A>C, el gen de la metionin sintetasa (MTR) con el polimorfismo 2576 A>G, de la metionina sintetasa reductasa (MTRH) con el polimorfismo 66 A<G, de la cistationina-B-sintetasa (CBS) con el polimorfismo 844ins68 y 699C>T, de la transcobalamina II (TCII) con sus polimorfismos 776C>G y 67 A>G, acarreador de folato reducido-1 (RFC1) con su polimorfismo 80G>A, de la paraoxonasa-1 (PON-1) con su polimorfismo 575 A>G y 163T>A y de la betaina homocisteína metiltransferasa (BMHT) con su polimorfismo 742G>A. (8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24)

La enzima conocida como 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), interviene en el metabolismo del ácido fólico en la conversión de 5,10-metilentetrahidrofolato a 5 metilentetrahidrofolato, Esta reacción es importante en el metabolismo de un carbono para la síntesis de metionina y la inclusión de un grupo metilo.

Mutaciones que provoquen una reducción de la actividad de la enzima MTHFR genera hiperhomocisteinemia, siendo un factor de alto riesgo para toxicidad celular y daño endotelial que se asocia a los DTN. Actualmente se estudian nuevos polimorfismos como causa de los DTN (5,13). Se ha observado que la presencia de estos polimorfismos en conjunto con factores ambientales o nutricionales incrementan el riesgo de DTN. (13)

Existen dos polimorfismos comunes asociados a la reducción de la actividad de la MTHFR. Una mutación puntual localizada en el exón 4 del sitio de unión de los folatos C677T, convirtiendo una alanina a valina.

En sujetos homocigotos (TT) la enzima se convierte en termolábil con lo cual pierde de 35 a 50% de su actividad. En sujetos sanos con genotipo (CC) la actividad de la enzima es normal y los niveles de homocisteína se conservan, cuando se presenta el genotipo heterocigoto (CT) en individuos sanos los niveles de homocisteína se incrementan colocándolo como un individuo de riesgo. (6).

Posteriormente se demostró que la termolabilidad de la MTHFR presenta una herencia recesiva que esta presente en el 5% de la población mundial y en un

17% de los pacientes con enfermedad coronaria, pero existen diferencias importantes entre los diferentes grupos étnicos. El cDNA de la MTHFR humana fue recientemente aislado. La mutación se encontró en el 38% de individuos canadienses. El estado homocigoto de la mutación se observó en un 12% de estos individuos y correlacionó clínicamente con un incremento plasmático de la homocisteína. Evidencias preliminares indican que la frecuencia de la homocigocidad de la mutación C677T varía significativamente de acuerdo al área geográfica. (25).

En Europa del norte, Frosst en 1995 encontró una prevalencia de los genotipos heterocigotos en aproximadamente de 33 al 40% en heterocigotos y de homocigotos con mutación del 10% en la población caucásica. (26).

El genotipo TT está presente en el 12% de la población en general, con variaciones como ejemplo: 0.3% en americanos, 0.2% en asiáticos, 0.1% afro-americanos, 0.047% en australianos, 0.066% en africanos y 0.23 en países Bálticos. (27)

La elevación de la homocisteína circulante total puede deberse a diferentes mecanismos alternos de la función enzimática como la deficiencia de ácido fólico o hábitos como el tabaquismo, alcoholismo y la edad avanzada. La interrelación entre el estado vitamínico y la homocisteína plasmática fue descrita por primera vez por Kang, quien demostró una relación inversa entre la homocisteína y las concentraciones plasmáticas e intraeritrocitarias de folatos, existen múltiples estudios que demuestran esta relación. (25)

En un reciente estudio se demostró la interrelación entre el genotipo de la termolabilidad de MTHFR y el estado nutricional de 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 677CT 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 otro polimorfismo de la enzima MTHFR A1298C se encuentra en el exón 7 cambiando una glutamina a alanina disminuyendo la función de la enzima, esta mutación se encuentra relacionada con problemas renales y defectos del tubo neural, no tiene relación con pérdida gestacional recurrente (PGR). Existe una mutación silente en el gen de la MTHFR, sin efecto clínico que es la T1317C. (6,27)

Por lo que en algunos estudios se han mostrado que los sujetos afectados por DTN, sus madres o ambos presentan una gran frecuencia alélica de MTHFR

677C>T y una gran frecuencia de homocigocidad de la mutación 677C>T, mientras que otros no encontraron dicha asociación.

En población mexicana se tienen pocos reportes de la prevalencia de los alelos 677C>T MTHFR, siendo importante su determinación debido a la alta incidencia de DTN.

El propósito de este estudio es evaluar la asociación entre polimorfismos de la MTHFR 677C>T y 1298 A>C y el riesgo de DTN en sus hijos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La presencia de polimorfismo del gen de la MTHFR representa un grado de riesgo en madres y neonatos para el desarrollo de defectos del Tubo Neural.

Los defectos del tubo neural son de las malformaciones congénitas mas comunes afectando 0.6 por 1000 nacidos vivos en los Estados Unidos (2), existen numerosos reportes de la incidencia de estos defectos por ejemplo: en Nueva Escocia el reporte es de 1-2/1000 nacimientos(3). En nuestro país, los DTN ocupan uno de los primeros lugares en las incidencias, reportadas en estudios epidemiológicos, siendo de 8-10/1000 recién nacidos vivos. Para un corte al mes de agosto del 2000, el registro epidemiológico indica que en el estado de Puebla se reporta 170 casos que corresponde a 13.7/1000 recién nacidos vivos, en segundo lugar el estado de México con 115 casos que corresponde al 3.7/1000 recién nacidos vivos, en tercer lugar Veracruz con 42 casos que corresponde al 2.7/1000 recién nacidos vivos, siguiendo Oaxaca con 33 casos que corresponde al 4/1000 recién nacidos vivos y San Luis Potosí con 33 casos que corresponde a 6.2/1000 recién nacidos vivos. (1)

MARCO TEORICO.

En los primeros 30s, el grupo de Banting y Best demostró que el motivo colina de la lecitina fue responsable para prevenir los hígados grasos producidos en perros pancreatectomizados tratados con insulina. Esto fue el primer estudio que vincula el metabolismo anormal de metilos con la presencia de alguna enfermedad. Desde entonces, las deficiencias de cada una de las 4 fuentes dietéticas esenciales de grupos metilo (colina, metionina, vitamina B12 y ácido fólico) se han asociado con un riesgo incrementado de numerosas enfermedades. Las dietas deficientes en colina mostraron incrementar la formación de tumores hepáticos en ratas y se encontró que tales dietas frecuentemente conducen a aterosclerosis.

Aunque la deficiencia de metionina per se no fue ampliamente estudiada, su antagonista metabólico etionina causo cáncer hepático así como toxicidad pancreática en ratas. Las deficiencias de vitamina B12 y ácido fólico han sido ampliamente asociadas como causa de alteraciones neurológicas y defectos congénitos tanto en humanos como en animales de experimentación.

En 1969, los errores congénitos del metabolismo condujeron a una acumulación del metabolito desmetilado de metionina, la homocisteína, siendo propuesto como un contribuyente a la aparición temprana de aterosclerosis.

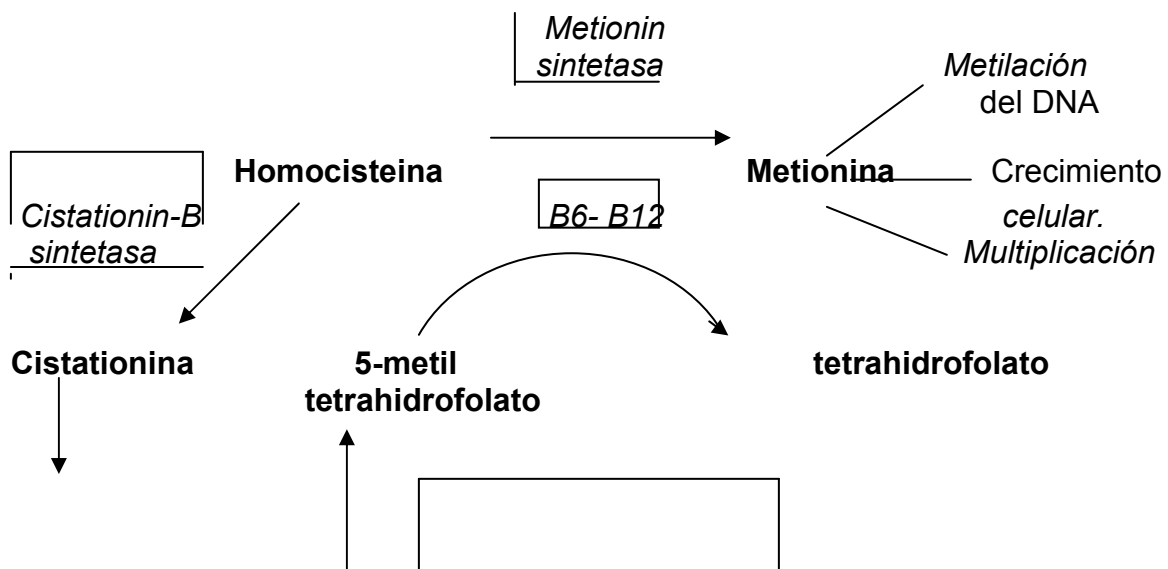
Los posibles vínculos entre alteraciones químicamente inducidas en la metilación de DNA y el desarrollo de otras enfermedades fueron poco exploradas. Sin embargo, por 1990, una cadena de casualidad ha sido establecida en carcinogénesis experimental vinculando la deficiencia dietética de metilos con insuficiencia metílica in vivo, así como la metilación anormal de DNA de genes específicos. También durante este periodo, la actividad disminuida de la enzima MTHFR, la cual es responsable para la síntesis actual de novo de grupos metilo, demostró asociarse con un riesgo incrementado en el desarrollo de aterosclerosis, trastornos neurológicos y defectos del tubo neural. La aparición exponencial en estudios de metabolismo de metilos y la metilacion de DNA desde entonces nos capacita para examinar aquí la dimensión de como los mecanismo por los cuales una metilación anormal parece ejercer efectos tóxicos en una enfermedad que podría aplicarse a otras patologías. (28).

SINTESIS DEL PROYECTO.

Los defectos congénitos o defectos al nacimiento son generados multifactorialmente durante el desarrollo embrionario en el que están involucrados los metabolismos vitamínicos como el del ácido fólico y el de la vitamina B12 (metabolismo de unidades de un carbono). El folato esta involucrado en dos ciclos: el primero involucrando la biosíntesis de DNA (guanina, adenina y timina), esencial

para la división celular y el segundo, es el ciclo de metilación (o metabolismo de un carbono) esencial para la provisión de grupos metilo para un amplio rango de metiltransferasas celulares (28).

El folato es también un importante sustrato en el metabolismo de la homocisteína. La homocisteína es un aminoácido que contiene azufre, formado después de la desmetilación de la metionina que es un aminoácido esencial. La homocisteína intracelular esta destinada con serina a forma cistationina. Esta reacción esta catalizada por la cistationina beta sintetasa (CBS). La cistationina es entonces convertida a cisteína a través de la vía de transulfuración. La homocisteína puede también ser remetilada. (Figura 1)



Cisteína

*5,10 metilentetrahidrofolato
Reductasa MTHFR*

5,10 metil-
Tetrahidrofolato

Figura I. Ciclo metabólico del folato.

Abreviaturas: MTHFR Metilentetrahidrofolato reductasa, B6 piridoxina, B12 cianocobalamina.

Tres vitaminas B están involucradas en el metabolismo de metionina-homocisteína: B6 (piridoxal 5 fosfato), B11 (folato) y B12 (cianocobalamina). La enzima CBS requiere de vitamina B6 como cofactor. La metionina sintetasa requiere vitamina B12 como co-factor y 5-metil-Tetrahidrofolato como sustrato. El metil-tetrahidrofolato esta formado por la reducción de 5-10-metil-tetrahidrofolato catalizada por la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).

Entonces, la vitamina B6 es importante en la transulfuración de homocisteína, mientras que el folato y B12 juegan un significativo papel en la metilación de la homocisteína.

La transulfuración defectuosa así como los desordenes de la remetilación resultarán en niveles incrementados de homocisteína en sangre y orina (hiperhomocistinemia).

Como el folato es un sustrato importante en el metabolismo de la homocisteína, se sugiere que un subgrupo de DTN podría se debido a una alteración de origen materno en este metabolismo. Más allá, se piensa que los niveles de homocisteína podrían dar una exacta medida del status de folato.

La hiperhomocistinemia podría ser el resultado de inadecuada nutrición o de un error innato del metabolismo.

Es entonces a partir de estos estudios que surgió el cuestionamiento acerca de si la homocisteína era tóxica para el embrión. Un papel posible de la homocisteína en la etiología de DTN fue probada in vitro por cultivo en el día 10 poscoital pos-implantación en embriones de rata, en dosis alta (3.6-7.2mM/h) el índice mitótico del epitelio neural y del rombencéfalo así como la contabilización total fue reducida.

La embriotoxicidad de L-homocisteína y de D-homocisteína fue estereoespecífica y no causó efectos embriotóxicos (29). La hipovitaminosis A secundaria a síndrome de malabsorción periconcepcional y enfermedad renal

puede asociarse a labio y paladar hendido (30,31). Las células embrionarias y fetales son enteramente dependientes del folato materno, en donde los receptores de folato median este transporte, asimismo son críticos para el desarrollo del tubo y cresta neurales (ya que murinos “knock-out” y “knock-down” en estos receptores resultan en altos porcentajes de defectos de tubo neural y neurocrestopatías). Asimismo, se cree que la deficiencia de folato esta acompañada por una reducción en la capacidad proliferativa de células altamente mitóticas de la cresta y tubo neural. De hecho, dependiendo en que momento del embarazo estas células altamente proliferativas son privadas de folato, y el origen de las células afectadas determinará el tipo de dismorfogénesis.

La deficiencia de ácido fólico que compromete el desarrollo placentario predispondrá a bebés pequeños para la edad gestacional debido a una total deficiencia de nutrientes y el desarrollo de deficiencia de folato más tardíamente en el embarazo podría predisponer a mayor susceptibilidad de las estructuras derivadas de células crestales (atresia) y defectos de la línea media (anencefalia, encefalocele, meningocele y espina bífida), defectos del tracto urinario, malformaciones cardíacas (defectos conotruncales y transposición de grandes vasos) así como hendiduras orofaciales (labio y paladar hendido) este transporte de folato mediado por receptores puede ser corregido por dosis suprafarmacológicas de ácido fólico, asegurado por difusión pasiva.

El receptor de folato esta expresado no solamente en el tejido placentario sino también en el tejido embrionario y este receptor es importante en el recambio de folato en el embrión. Se ha identificado que la interacción de un elemento de 18pb en cis con un transfactor citosólico es crítico para la traducción del receptor de folato en algunas células de mamíferos, asimismo existen evidencias preliminares de que un oligodeoxinucleotido antisentido al dominio de 18 bases en el 5-UTR del receptor del RNAm del receptor de folato (cis-elemento) que es crítico para la síntesis de receptor del folato a nivel traduccional produce DTN cuando se inyecta en sacos amnióticos de embriones cultivados de rata. De hecho, la administración periconcepcional de dosis farmacológicas de ácido fólico podría revertir los DTN y neurocrestopatías a partir de un deficiente receptor de folato.

Otros estudios también han identificado el entrecruce de suplementos de ácido fólico y otros genes; por ejemplo: ratas con delección homocigótica de genes de clase homeobox, que codifican para un factor transcripcional que regula “rio-abajo” y los genes marcados pueden presentar anomalías craneofaciales y DTN. Interesantemente, el tratamiento prenatal con ácido fólico de esos embriones suprime el desarrollo de DTN.

Estudios en “knock-outs” splotch (Pax-3) también han demostrado DTN responsivo a folato (32). Entonces, defectos celulares pueden influenciar el proceso embriológico en tejidos adyacentes, afectando la cascada entera del

desarrollo craneofacial. Más allá, la remarcablemente amplia contribución de células de la cresta neural al desarrollo de varios tejidos fetales explica por que aparentemente dispara defectos de desarrollo tales como defectos craneofaciales, cardiovasculares y del tracto urinario que tienen un origen en común.

Con base, a lo anteriormente dicho se infiere que el desarrollo normal del tubo y la cresta neural requiere:

1. Consumo adecuado de ácido fólico (Figura II) materno en la dieta.
2. Transporte normal de folato para el cierre de células de tubo neural vía saco endodérmico.
3. Expresión y función normal de receptores de folato en placenta y células de cresta neural en la gestación.
4. Regulación coordinada de suficiente receptor de folato para apoyar los requerimientos de ácido fólico y capacidad proliferativa de células de cresta neural durante la embriogénesis.

Refiriendo este estudio al gen de la MTHFR se dice que se produce una proteína termolábil con actividad enzimática disminuida, niveles disminuidos de folato plasmático y niveles aumentados de homocisteína y cuya homocigocidad es un factor de riesgo para DTN. Las frecuencias del alelo mutante así como la ingesta diaria de ácido fólico es variable entre poblaciones (33).

Existen muchos estudios observacionales que han mostrado que el uso periconcepcional de ácido fólico, solo o en suplementos vitamínicos son efectivos para la prevención primaria de DTN así como hendiduras orofaciales. (21,29,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44)

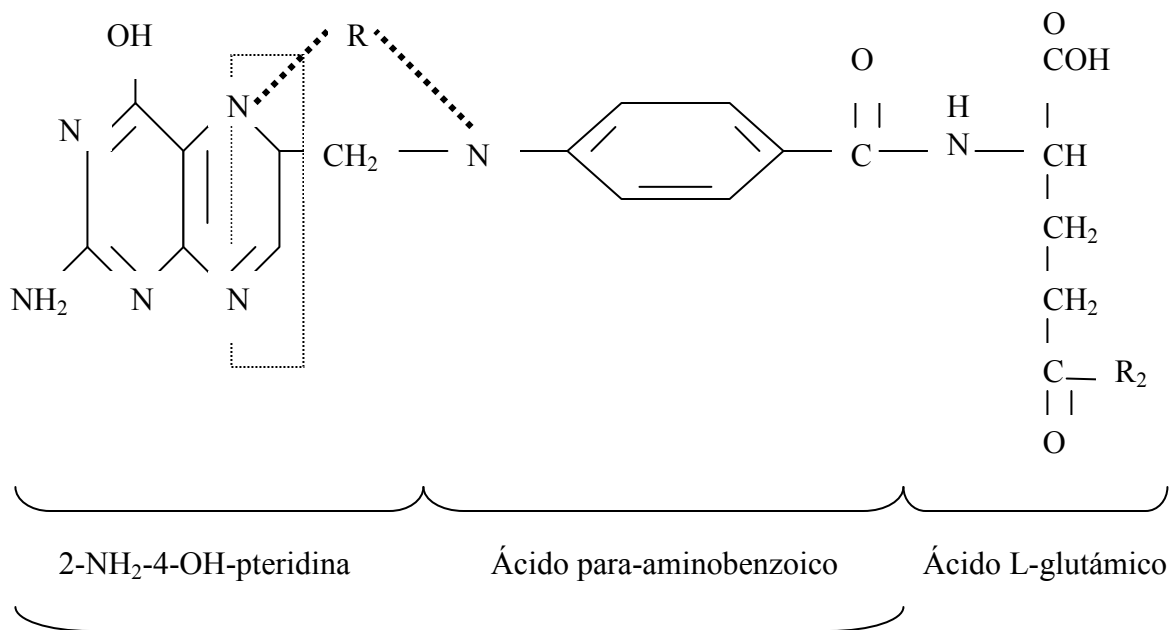


Figura II. Estructura química del ácido fólico y sus componentes.

Los requerimientos de ácido fólico ha sido definidos como la cantidad de ingestión necesaria para prevenir la deficiencia severa con síntomas clínicos.

El folato marcado estable marcado isotópicamente es también usado para definir el requerimiento de ácido fólico más agudamente. Basados en estudios recientes, La Academia Nacional de Ciencias ha reportado nuevas referencias para la ingesta de ácido fólico. Esto incluye la estimación del requerimiento para grupos de población referido al promedio requerido (45).

Clínicamente se ve significativa que el desarrollo y cierre del tubo neural toma lugar muy temprano en el embarazo humano. Recientemente se han identificado genes cuya expresión marca la formación y regionalización de la placa neural y que codifica moléculas de adhesión celular o factores de transcripción responsables de ello (29).

JUSTIFICACION.

Los defectos congénitos mayores en especial los Defectos del Tubo Neural; labio y paladar hendido y cardiopatías congénitas entre otros, representan un grave problema de salud pública que producen serias discapacidades para el aprendizaje así como desajuste psicosocial, el conocer el origen de estos problemas nos permite generar medidas preventivas para disminuir su incidencia.

OBJETIVOS E HIPOTESIS.

Objetivo.

Determinar los polimorfismos C677T y A1298C del gen de la MTHFR en madres con recién nacidos u óbitos con Defecto del Tubo Neural en el Instituto Nacional de Perinatología.

Objetivo General: Determinar si los polimorfismos C677T y A1298C del gen de la MTHFR en las madres con hijos con DTN es mayor que en madres con hijos sanos.

Objetivo Específico:

Determinar la frecuencia de polimorfismos C677C y A1298C del gen de la MTHFR en las madres con recién nacido con DTN.

Determinar la frecuencia de polimorfismo C677C y A1298C del gen de la MTHFR en madres con recién nacidos sanos.

Hipótesis.

La proporción de polimorfismo en C677T y A1298C del gen de la MTHFR en madres con recién nacidos con DTN es mayor que en madres con recién nacidos con hijos sanos.

CAPITULO II. MATERIAL Y METODOS.

DISEÑO DEL ESTUDIO.

Tipo de Investigación: Observacional.

Tipo de Diseño: Casos y controles.

Características del estudio:

En Relación con El Método de Observación: Analítico.

En Relación al Tipo de Análisis: Comparativo.

En Relación a la Temporalidad: Transversal.

METODOLOGIA.

Lugar y Duración: Instituto Nacional de Perinatología.

Duración de 18 meses.

Universo, Unidad de Observación, Métodos de muestreo Y Tamaño de la muestra.

Universo: Madres atendidas en el Instituto Nacional de Perinatología cuyo recién nacidos presenta DTN.

Métodos de muestreo: No probabilístico de casos consecutivos.

Unidad de observación: Madres con recién nacidos u óbitos con DTN.

Criterios de Inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión:

Casos: pacientes cuyos neonatos presentaron un defecto tubo neural, previa valoración por el servicio de neonatología y genética.

Controles: pacientes con neonatos sanos, previa valoración de neonatología y genética.

Que durante la etapa periconcepcional las pacientes no tomaron ácido fólico o multivitamínicos.

Pacientes que aceptaron participar en el estudio y que firmaron la hoja de consentimiento informado

Criterios de no inclusión: pacientes que no aceptaron participar en el estudio.

Recolección de Datos.

Se dio un cuestionario a las madres, en donde dieron su consentimiento a participar en el estudio.

Se tomo una muestra de sangre venosa periférica tanto para los casos como los controles marcando los tubos adecuadamente, para determinar el genotipo materno, la sangre fue obtenida de la vena antecubital usando el sistema de vacutainer, las muestras se almacenaron en tubos con EDTA y se mantuvieron en refrigeración a cuatro grados centígrados y fueron centrifugados para separar el buffy-coat que se mantuvo congelado -70 grados centígrados hasta la extracción de DNA y correr la técnica de PCR-RFLP para determinar el genotipo.

ASPECTOS ETICOS.

Investigación con riesgo mayor al mínimo. (Se anexa carta de consentimiento informado).

PLAN DE ANALISIS.

Análisis estadístico.

Se realizó una comparación de la distribución de características generales, así como la distribución alélica y el genotipo materno del polimorfismo de MTHFR 677C>T y 1298 A >C entre casos y controles.

Se usó una regresión logística, con un análisis bivariado para evaluar la asociación entre los genotipos maternos y los DTN calculando los Odds Ratio correspondientes. Para poder estimar con precisión se calcularon los intervalos de confianza (IC) al 95%.

Todos los datos fueron analizados en el programa estadístico Stata 7.

CAPITULO III. RESULTADOS

Se lleva acabo el análisis molecular del polimorfismo 677C>T y 1298 A>C por la técnica de PCR-RFLP en 136 pacientes para el polimorfismo 677C>T, con 86 casos y 50 controles; para el poliformismo1298 A>C se realizo en 86 pacientes con 53 casos y 33controles.

La distribución del genotipo para el polimorfismo de 677C>T en la población control se encontró semejante a la reportada por Hardy-Weinberg (P=0.55). La distribución del genotipo y las frecuencias alélicas fueron significativamente diferentes entre los casos y los controles, así que en los madres que fueron casos la frecuencia del alelo 677CT y el genotipo 677TT fue mayor que en el caso de madres que fueron los controles. (Tabla 1)

Tabla 1. Distribución genotípica y frecuencias alélicas para el polimorfismo 677C>T entre madres de casos y controles.

Variable	Casos n= 86	%	Controles n= 50	%	P
Genotipo					
CC	11	12.8	15	30	
CT	39	45.3	18	36	
TT	36	41.9	17	34	<0.05
Alelo C	61	35.46	48	48	
Alelo T	111	64.54	52	52	<0.05

En relación al polimorfismo 1298 A>C no hubo diferencia significativas entre las madres con hijo afectado y los controles considerando tanto la frecuencia alélica como la distribución del genotipo. (Tabla 2.)

Tabla 2. Distribución genotípica y frecuencias alélicas para el polimorfismo 1298 A>C entre madres de casos y controles.

Variable	Casos n= 53	%	Controles n= 33	%	P
Genotipo					
AA	42	79.2	26	78.8	
AC	10	18.9	6	18.2	
CC	1	1.9	1	3	>0.05
Alelo A	94	88.68	58	87.88	
Alelo C	12	11.32	8	12.12	>0.05

Se encontró que en relación al polimorfismo 677C>T hay en el caso del genotipo de heterocigotos (CT) un riesgo incrementado de defectos del tubo neural (OR de 2.95 IC 1.99-3.90), así mismo se encontró un riesgo incrementado para homocigotos (TT) para DTN (OR de 2.88 IC 1.91-3.84). (Tabla 3)

Tabla 3. Odds Ratio en la distribución genotípica y frecuencias alélicas para el polimorfismo 677C>T entre madres de casos y controles.

Variable	Casos	Controles	Odds Ratio IC 95%
Genotipo.			
CC	11	15	1
CT	39	18	2.95 (1.99-3.90)
TT	36	17	2.88(1.91-3.84)

El riesgo se incrementa de forma similar tanto para las madres heterocigotos (CT) como para las homocigotos (TT), lo cual determina la relación importante del genotipo materno para la presencia de hijos con DTN sin la suplementación de ácido fólico. (Tabla 3)

CAPITULO IV. DISCUSION.

Los resultados en este estudio indican que tanto la heterocigocidad y la homocigocidad materna para el alelo 677C>T esta asociado con un gran riesgo de defectos del tubo neural en la descendencia.

No se encontró una asociación positiva entre la homocigocidad y la heterocigocidad materna para el alelo 1298 A>C en el riesgo de defectos del tubo neural o cuando se considero el genotipo 677C>T/1298 A>C.

La heterocigocidad para el polimorfismo de la MTHFR que esta presente en el 36% así como la homocigocidad presente en el 34% de la población incrementa el riesgo de presentar malformaciones del tubo neural en la descendencia.

Nuestros resultados se apoyan con estudios reportados en la bibliografía mundial como es el caso que la combinación de los genotipos CT y TT son responsables del 26% de los DTN en Irlanda (3).

Así mismo nuestro estudio apoya ya estudios previos como los realizados por Hon en 1999 hasta los realizados por Peadar en donde confirmamos efectivamente que el polimorfismo 677C>T en esta población homocigoto y heterocigoto son los causantes de DTN y sirven como factores de riesgo importantes (5, 13, 20, 21, 24,3) así mismo, aquí entra un punto importante que tanto los polimorfismos junto con factores ambientales o nutricionales incrementan el riesgo de DTN (6, 7, 13,15).

En relación con la mutación 677C>T, nuestros resultados coinciden con los reportados en la población mexicana por Martínez Villarreal (23) pero llama la atención la diferencia que se muestran en los estudios de Dávalos (48) y por Gonzáles (49) quienes no encontraron una asociación entre esta mutación y el riesgo de anencefalia (DTN) lo mismo se mostró en los estudios de Barber quien uso población de origen hispánico (14), por lo que con estos resultados surge gran parte de la controversia en relación a esta mutación 677C>T y la presencia de DTN; una parte de estos resultados diferentes van en relación al uso de diferentes metodologías estadísticas, en algunos estudios se agrupan los DTN en general y en otros defectos específicos como es el caso de anencefalia como en el estudio de Gonzáles.

En estudios clínicos y experimentales recientes se ha asociado el consumo de ácido fólico para la prevención de DTN por lo que han surgido varios estudios hacia la investigación para determinar el efecto protector de esta vitamina B (6, 7,15).

Existen muchos estudios observacionales que han mostrado que el uso periconcepcional de ácido fólico, solo o en suplementos vitamínicos son efectivos

para la prevención primaria de DTN así como hendiduras orofaciales de un 65% a un 75%. (7,21,29,33,34,35,36,37,38,39,40, 41,42,43,44,46,47).

En algunos estudios evalúan el efecto del genotipo de los padres, especialmente el de la madre como factor de riesgo para DTN; con algunos autores se investigo el efecto protector del ácido fólico para prevenir la falla del cierre del tubo neural y esto depende fundamentalmente del uso del ácido fólico por el embrión

Las controversias existentes entre el polimorfismo 677C>T y los DTN revelan lo complejo de la etiología de estas malformaciones en donde se dan interacciones, genéticas, ambientales y nutricionales que todas en conjunto determinan la aparición de estas malformaciones.

En cuanto al polimorfismo 1298 A>C nuestros resultados concuerdan con la mayoría de los resultados de la literatura como en los estudios de Barber (14) los resultados obtenidos por Van der Put donde la combinación de los dos polimorfismo 677C>T/1298 A>C genera el mismo riesgo que si presentaran homocigocidad para el mismo alelo y se registra en población caucásica como riesgo para DTN (20), dada la baja prevalencia del polimorfismo 1298 A>C en la población de estudio no fue posible encontrar esta asociación.

En relación a estos resultados cabe señalar la importancia que tiene la ingesta adecuada de ácido fólico periconcepcional por la población mexicana debido a la importante asociación del polimorfismo 677 C>T que determina la disminución de la actividad de la enzima MTHFR por lo cual la saturación del sistema por el ácido fólico incrementa la utilización de la enzima estabilizando el sistema y disminuyendo la homocisteína como principal toxico para el desarrollo embrionario.

El ácido fólico ha sido recomendado desde 1992 por la CDC (Control Disease Center), en 1999 se lanza una campaña en Estados Unidos con la indicación de consumir 400mcg (0.4mg) a toda mujer en edad fértil, sin embargo aun en 2001 en una campaña realizada para saber si la población estaba informada sobre los efectos benéficos y preventivos del consumo del ácido fólico, se reporta que solo una de cinco mujeres conocían con exactitud de los efectos en su consumo.

Por lo que la recomendación en México del uso del ácido fólico periconcepcional y muy probablemente desde la adolescencia como medida de prevención inicia desde 1998 lo cual consideramos al paso del tiempo se tendrá una reducción en la incidencia de los DTN.

Los hallazgos hechos en este trabajo tiene 2 implicaciones importantes:

1. MTHFR 677C>T con genotipo homocigoto y heterocigoto necesitan ser considerados como factores de riesgo.
2. La población mexicana ante las deficiencias nutricionales y vitamínicas y la presencia del polimorfismo incrementa su riesgo por lo que el programa de suplementación nacional se vera beneficiada y esperamos una reducción importante del nacimiento de niños con DTN.

Por lo que nuestro estudio aporta nuevos datos que impactaran en los programas de Salud Publica y Epidemiología en nuestro país para prevención de DTN con la administración de ácido fólico en todas las mujeres en edad fértil muy probablemente desde la adolescencia partiendo del hecho que la incidencia y prevalencia de los defectos al nacimiento representan un gran problema de salud tanto en la Republica Mexicana como en el mundo y por lo tanto aumentar la cultura en salud para la prevención.

CONCLUSIONES.

1. Los resultados muestran un incremento de dos veces el riesgo para DTN en madres con genotipo heterocigoto y homocigoto (CT y TT) para el polimorfismo 677 C>T del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa. (MTHFR)
2. La prevalencia del alelo mutado del polimorfismo 677C>T presentó en los casos un 64.5% contra el 52% en los controles con una $p < 0.05$.
3. La prevalencia en la población de estudio tanto en los casos como en los controles el polimorfismo 1298 A>C solo en el 11% casos y 12% controles con un $p > 0.05$.
4. Con base a estos resultados consideramos de fundamental importancia la administración periconcepcional de ácido fólico en dosis base de 0.4mg en dosis diaria 3 meses antes del embarazo y durante el primer trimestre del embarazo donde los niveles de homocisteína deben ser disminuidos en forma importante como factor de riesgo para generar DTN.



ANEXO 1. HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimada Paciente:
P R E S E N T E .

En el Instituto Nacional de Perinatología, estamos realizando un estudio para determinar el polimorfismo C677T y C1298A del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa en madres con hijos afectados con defectos del tubo neural que durante la etapa periconcepcional no hayan tomado ácido fólico o multivitamínicos. Para determinar este polimorfismo se obtiene el genotipo materno, es decir el DNA materno para su estudio tanto de madres que haya presentado su hijo defectos del tubo neural o madres con hijos sanos.

Los defectos del Tubo neural incluyen toda anomalía congénita que implica una falla en el cierre del tubo neural o una reapertura entre la segunda y la quinta semana del desarrollo, afectando tanto la formación del sistema nervioso como del cráneo y la columna. Representa un problema de salud no solo en la República Mexicana, sino en el mundo, en donde se reporta aproximadamente 1 de cada 50 recién nacidos vivos y 1 de cada 9 recién nacidos muertos. Entre los defectos del tubo neural se encuentran la anencefalia, encefalocele y espina bífida abierta o mielomeningocele siendo estos, los defectos más frecuentes

En el presente estudio se tomara una muestra sanguínea de sangre venosa de su antebrazo, para la extracción de DNA y se aplicara la técnica de PCR-RFLP para determinar su genotipo, el trabajo de investigación no implica riesgos adicionales en usted y se considera que el riesgo es mínimo.

Declaro que estoy de acuerdo en participar en este estudio cuyos objetivos, procedimientos, beneficios y daños 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. De no aceptar, tenga la seguridad de que usted seguirá recibiendo el tratamiento oportuno y apropiado que sea necesario para su mejoría clínica así como todos los recursos necesarios para su mejoría. En caso de aceptar, le solicitamos firmar el presente documento y de existir alguna duda con respecto al contenido del mismo, estamos a su disposición la Dra. María Emilia Guerra García en la extensión 144 de esta unidad hospitalaria para aclarar las inquietudes que al respecto genere el presente estudio.

NOMBRE Y FIRMA DE LA PACIENTE QUE AUTORIZA.

TESTIGO 1

TESTIGO 2

CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA TESIS.

1. García Cavazos. R. La prevención de los defectos al nacimiento una responsabilidad de todos. *Revista de Perinatología* 2006; 4:2-6.
2. Nakano KK. Anencephaly: a review. *Dev Med Child Neurol* 1973;15:383-400.
3. Peadar N, James L, et al. Impact of MTHFR C677T polymorphism on risk of neural tube defects: case control study. *BMJ* 2004;328: 1535-1536.
4. Carlson BM. The nervous system. The neural development biology. St Louis Missouri: Mosby Year Book; 1994. 204-251.
5. Harris MJ. Why are the genes that a cause risk of human neural tube defects so hard to find? *Teratology* 2001; 63:165-166.
6. Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural tube defect by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992; 327: 1832-1835.
7. Shaw GM, Schaffer D, Velie EM, Morland K, Harris JA. Periconceptional vitamin use, dietary folate and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiology* 1995; 6:219-226.
8. Finnell Rh, Greer KA, Barber RC, Piedrahita JA, Shaw GM, Lammer EJ. Neural tube and craniofacial defects with special emphasis on folate pathway genes. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9:38-53.
9. Ramsbottom D, Scott JM, Molloy A, et al. Are common mutations of cystathionine beta-synthase involved in the etiology of neural tube defects. *Teratology* 1997; 51:39-42.
10. Morrison K, Papapetrou C, Hol FA, et al. Susceptibility to spina bifida: an association study of five candidate genes. *Ann Hum Genet* 1998; 62:379-396.
11. Hol FA, Van der Put NM, Geurds MP, et al. Molecular genetic analysis of the gene encoding the trifunctional enzyme MTHFR (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase) in patients with neural tube defects. *Clin Genet* 1999; 53:119-125.
12. Hiel SG, Van der Put NM, Waas ET, Gen Heijer M, Trijbels FJ, Blom HJ. Is mutated serine hydroxymethyltransferase involved in the etiology of neural tube defects? *Mol Genet Metab* 2001; 73:164-172.
13. Shaw GM, Lammer EJ, Zhu H, Baker MW, Neri E, Finnell RH. Maternal periconceptional vitamin use, genetic variation of infant reduced folate carrier A80G and risk of spina bifida. *Am J Med Genet* 2002; 208: 1-6.

14. Barber RC, Shaw GM, Lammer EJ, et al. Lack of association between mutations in the folate receptor alpha gene and spina bifida. *Am J Med Genet* 1998; 76:310-317.
15. De Marco P, Moroni A, Merello E, et al. Folate pathway gene alterations in patients with neural tube defects. *Am J Med Genet* 2000; 95:216-223.
16. Trembath D, Sherbondy AL, Vandyke DC. Analysis of selected folate pathway genes, PAX3, and human T in a Midwestern neural tube defect population. *Teratology* 1999;59:331-341.
17. Saikawa Y, Price K, Hance KW, Chen TY, Elwood PC. Structural and functional analysis of the human KB cell folate receptor gene P4 promoter: cooperation of three clustered Spi-binding sites with initiator region for basal promoter activity. *Biochemistry* 1995;34: 9951-9961.
18. Barber R, Shalat S, Hendricks K, et al. Investigation of folate pathway gene polymorphisms and the incidence of neural tube defects in a Texas Hispanic population. *Mol Genet Metabol* 2000; 70:45-52.
19. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate risk factor for cardiovascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet* 1995; 10: 111-113.
20. Vander Pu NMJ, Van den Heuvel LP, Steegers Theunissen RPMO, et al. Decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity due to the 677C-T mutation in families with spina bifida offspring. *J Mol Med* 1995; 74: 691-694.
21. Botto LD, Yang Q. 5-10 Methylenetetrahydrofolate reductase variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 862-877.
22. Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, Wasserman CR, Lammer EJ. Maternal vitamin use, genetic variation of infant methylenetetrahydrofolate reductase, and risk for spina bifida. *Am J Epidemiol* 1998;148:30-37.
23. Martínez de Villarreal LE, Delgado-Eneiso I, Valdez Lea R, et al. Folate levels and N5, N 10 methylenetetrahydrofolate reductase genotype MTHFR in mother of offspring with neural tube defects: a case-control study. *Arch Med Res* 2001; 32: 277-282.
24. Volcik KA, Blanton SH, Tyerman GH, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase and spina bifida: evaluation of level of defect and maternal genotype risk in Hispanics. *Am J Med Genet* 2000; 95: 21-27.
25. Van Allen. Evidence for multi-site closure of neural tube in human. *Am J Med Genet* 1993;47:723-743.
26. Seller MJ. Recent developments in the understanding of the etiology of neural tube defect. *Clinical Dysmorphology* 1995;4:93-104.

27. Epstein D J, Vekemans M, Gross P A. A mutation affecting development of mouse neural tube shows a deletion within the paired homeodomain of PAX-3 Ce/11991. *Teratology* 2000;62: 767-774.
28. Poirier, Lionel A. The effects of Diet, genetics and Chemical on Toxicity and aberrant DNA Methylation: an Introduction. *J Nutr* 2002; 132:2336S-2339S.
29. Eskes Tom. Folates and the fetus. *Eur J Obs Gynecol and Reprod Biol* 1997; 71:105-111.
30. Faron, Gilles, Drouin, Regen, Pedneault L, et al. Recurrent Cleft Lip and palate in Siblings of a patient with Malabsorption Syndrome, Probably caused by hypovitaminosis A and Folic Acid and Vitamin B2 Deficiencies. *Teratology* 2001;63 :161-163.
31. Felkner, Marilyn, Hendricks K, et al. Diarrhea: A new Risk Factor for neural tube Defects. *Birth Defects Research (Part A)* 2003; 67:504-598.
32. Finnell R, Sepeigelstein O, et al. DNA Methylation in Folate 1 knockout Mice supplemented with folic acid during gestation. *J Nutr* 2002;132: 2457S-2461S.
33. DeWalls Phillippe R, et al. Trend in Prevalence of Neural Tube Defects in Quebec. *Birth Defects Research (Part A)* 2003;67:919-923.
34. Brody Lawrence C, Conley Mary, Cox Christopher, Kirke Peadar N, McKeever Mary P. A polymorphism, R653Q in the trifunctional enzyme methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase/Formyltetrahydrofolate Synthetase is a maternal genetic risk factor for neural tube defects: Report of the Birth Defects Research Group. *Am J Hum Genet* 2002;71:1207-1215.
35. Czeizel E. Folic Acid and Prevention of Birth Defects. *JAMA* 1996; 275:21.
36. Green N. Folic Acid Supplementation and Prevention of Birth Defects. *J Nutr* 2002;132:2356S-2360S.
37. Hess Sonja Y, Zimmermann Michael B, Brogli Silvia. A National Survey of Iron and Folate Status in Pregnant Women in Switzerland. *Int J Vitam Nutr Res* 2001;71.
38. Holmes L, Harris J, Oakley GP Jr. Teratology Society Consensus Statement on Use of Folic Acid to Reduce the Risk of Birth Defects. *Teratology* 1997; 55:381.
39. Honein Margaret A, Paulozzi Leonard J, Mathews MS, Erickson J, Wong Lee-Yang. Impact of Folic Acid Fortification of the US Food Supply on the Occurrence of Neural Tube Defects. *JAMA* 2001; 23.
40. Hook Ernest B, Czeizel Andrew E. Can thalassaemia explain the protective effect of folic-acid supplementation on birth defects. *The Lancet* 1997;350:513-515.

41. Itakala A, Padmaja R, Watkins Margaret L, Mulinare J, Moore Cynthia A, Lui Yecai. *Teratology* 2001;63:79-86.
42. Juriloff Diana M, Harris Muriel J. *Hum Mol Gen.Review.*2000; 9.
43. Kapur, Bhushan, Soldin, Porat O and Koren G. *The Drug Monitoring* 2002; 24:628-630.
44. Lynberg Michele C, Khuory Muin J. *Interaction Between Epidemiology and Laboratory Sciences in The Study of Birth Defects: Design of Birth Defects Risk Factor Surveillance in Metropolitan Atlanta. J Toxicol Env Health* 2002;34:23-25.
45. Krishanaswamy Kamala and Madhavan Nair. *Importance of folate in human nutrition* 2001; 85: S115-S124.
46. Amitai Y. *Folic Acid Antagonists during pregnancy and risk of birth defects. N Eng J Med* 2001; 344:12.
47. Botto Lorenzo D, Olney Richard S. *Vitamin supplements and the Risk for Congenital Anomalies Other than Neural Tube Defects. Am J Med Genet* 2004;125:12-21.
48. Davalos IP, Olivares N, et al. *The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. Ann Genet* 2000; 43:89-92.
49. González Herrera L, García Escalante, et al. *Frequency of the thermolabile variant C677T in the MTHFR gene and lack of association with neural tube defects in the State of Yucatán, México. Clin Genet* 2002;62:394-398.