



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

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

**Identificación del Polimorfismo 677 C>T del  
Gen de la 5, 10 Metilentetrahidrofolato  
Reductasa en Pacientes con Pérdida  
Gestacional Recurrente Temprana. Un  
Estudio de Casos y Controles.**

**Tesis**

**Que para obtener el titulo de:**

**Especialista en Ginecología Y Obstetricia**

**PRESENTA**

**JOSÉ DE JESÚS VALDERRAMA SANTILLÁN**

**PROFESOR TITULAR: Dr. Valentín Ibarra Chavarría**

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



**MEXICO, D.F.**

**2007**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al llegar a este punto, no puedo dejar de agradecer a las dos personas más importantes de mi vida: Mis padres Margarita y Jesús, quienes con su ejemplo y entrega han sido pilares para el desarrollo de mi persona, y a quienes dedico cada día el esfuerzo realizado, tal como ellos lo han dedicado para sus hijos.

A mis hermanas Margarita, Bertha y Elsa, con quienes he compartido toda una vida, y quienes junto con mis cuñados Rafael, Luis y José Alberto, me han permitido disfrutar la dicha de ser tío de Luis Javier, Beto Sánchez, Juan Pablo, Beto Ortiz, Emmanuel, Gabriel, Andrea y los que falten, uno nunca sabe.

A mis amigos de tantos años, cuyo apoyo ha sido vital para seguir en este camino. Así como a mis compañeros residentes, con quienes he compartido tantas adversidades y logros, la experiencia colectiva ha sido particularmente enriquecedora.

A mis maestros del Instituto, cuyas enseñanzas han sido parte importante de mi desarrollo profesional. A Lupita en el laboratorio de genética molecular, por su trabajo tan valioso para este estudio.

A las pacientes, quienes ponen lo más valioso que el ser humano posee, la vida misma, en nuestras manos, y por permitirnos el honor de compartir ese momento tan dichoso que es el nacimiento de un hijo.

Y por último, y absolutamente para nada menos importante, al Dr. Ricardo García Cavazos, por su ejemplo, su apoyo y entrega a todas horas, que lo han llevado a ser una persona tan valiosa para nosotros, sus alumnos. Por todo gracias.

**AUTORIZACIÓN.**

**PROFESOR TITULAR: Dr. Valentín Ibarra Chavaría**

FIRMA \_\_\_\_\_

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

FIRMA \_\_\_\_\_

## **ÍNDICE**

1. Introducción.
2. Planteamiento del problema
3. Marco teórico
4. Objetivos, hipótesis y justificación
5. Metodología.
6. Resultados, análisis y discusión.
7. Bibliografía
8. Anexos.

## **1. INTRODUCCIÓN.**

Durante muchos años, se ha asumido que la pérdida gestacional recurrente resulta de una pobre asociación materno-fetal. Sin embargo evidencias recientes clínicas, epidemiológicas, y genéticas han cambiado este pensamiento y nos han permitido lograr una definición de las pérdidas gestacionales recurrentes, que determina que son más de dos pérdidas consecutivas menores de 24 semanas.

Epidemiológicamente las PGR se registran del 1 al 2% en las mujeres fértiles. Cuando se diagnostica clínicamente el embarazo, el riesgo espontáneo de pérdida es del 12 al 14%. Las investigaciones de pérdida gestacional recurrente en más del 50% se clasifican como idiopáticas, con gran heterogeneidad y podría ser debido a que varios mecanismos patológicos se suman. El buscar la etiología de asociación nos hace categorizar cuatro niveles de estudio: 1) endócrino, 2) inmunológico, 3) anatómico y 4) genético. Sin embargo, existen debates sobre los mecanismos fisiopatológicos especialmente en la investigación de teorías directas relacionadas con implantación, invasión trofoblástica, placentación y factores embriopáticos. Es así como Li en el 2002, emite una clasificación modificada y directa que incluye: 1) Anomalías cromosómicas parentales, 2) patología uterina, 3) estado protrombótico, 4) alteraciones endócrinas, 5) factores inmunológicos, 6) insuficiencia cervical, 7) infecciosos, 8) factores nutricionales y ambientales, 9) enfermedades estigmáticas maternas, 10) alteraciones espermáticas, alteraciones cromosómicas fetales, 11) receptividad endometrial, y 12) factores genéticos. Como puede verse el abordaje de las PGR es

altamente variable y se orienta a determinar el manejo y pronóstico con implicaciones para la práctica clínica, la investigación y la prevención.

Desafortunadamente hasta el momento existe discrepancia en el consenso para abordar los métodos de investigación que identifiquen la o las causas y, a la vez, evalúe el pronóstico y con ello se obtenga un tratamiento más efectivo.

No cabe duda la importancia del estudio familiar, para calcular factores de riesgo en la pérdida gestacional. Es así como la edad materna y el número de pérdidas gestacionales previas son importantes, como también lo es el diferenciar entre pacientes con pérdidas tempranas del primer trimestre, mayores de 20 semanas, con y sin hijos vivos previos. Actualmente Christiansen en 2006 propone un cambio del modelo tradicional de estudio donde predominan factores individuales a un nuevo modelo que evalúa las causas de la pérdida gestacional recurrente.<sup>1</sup> (Figura 1)

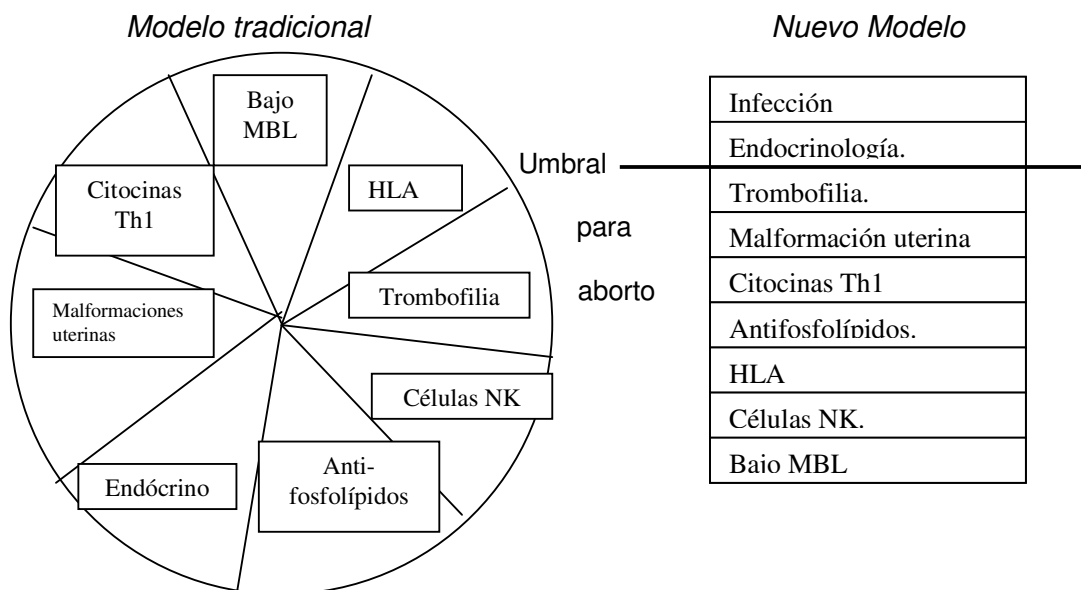


Figura 1: Modelo tradicional y nuevo para la evaluación de las causas de pérdida gestacional recurrente.

El estudio de casos y controles nos permite estimar el riesgo potencial y asociación con la pérdida gestacional recurrente a través del cálculo de los Odds Ratios entre casos y controles, y orienta a factores causales del acontecimiento. Es por ello el estudio que fundamenta que la PGR por causa genética parental tiene definitiva asociación y causalidad.<sup>1</sup>

Los factores genéticos parecen tener una alta asociación con la pérdida reproductiva. En este estudio se excluyen las alteraciones cromosómicas asociadas a padres portadores de rearrreglos balanceados que pueden resultar en gametos anormales y no exitosos para el soporte del embarazo. Recientemente las investigaciones se orientan con gran interés en marcadores genéticos para pérdida recurrente como es la inactivación tardía del cromosoma X, y polimorfismos del antígeno G en leucocitos humanos. La tecnología en reproducción asistida es una opción para las parejas con PGR. Sin embargo, hay que tener sumo cuidado ya que existen factores genéticos no detectables con facilidad y terminan en un embarazo no exitoso por las limitaciones tecnológicas.

Una línea genética de gran atención es la concerniente a polimorfismos génicos con cambio de un solo nucleótido, SNP's, que se involucra en procesos trombofílicos o modificaciones metabólicas a nivel celular que comprometen los sistemas oxidativos y generan toxicidad celular con la consecuente pérdida del embarazo. Entre estos polimorfismos se ha señalado al polimorfismo C677T, del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), donde McCully y otros investigadores sugieren que existe una conexión entre los niveles incrementados de homocisteína y enfermedad arterial después de los 30



años y así emerge que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo para trombosis venosa y arterial.<sup>36</sup>

La Pérdida gestacional recurrente (PGR) es una condición clínica asociada a diversas etiologías. En este sentido, existen puntos por descubrir. Se ha descrito su asociación con alteraciones en el metabolismo del folato, propiamente condiciones asociadas a hiperhomocisteinemia. Entre las causas de hiperhomocisteinemia se encuentra la presencia del polimorfismo 677 C>T del gen de la 5-10 metilén tetrahidrofolato reductasa (MTHFR), una enzima implicada en el metabolismo de la homocisteína. En la literatura se ha descrito una mayor frecuencia de este polimorfismo en la población mexicana.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

La pérdida gestacional recurrente temprana es un problema devastador para las parejas que proyectan el embarazo, y afecta hasta el 5% de las parejas que buscan este. Hoy por hoy, la etiología, manejo, pronóstico y prevención son un reto para el ginecólogo y obstetra. Si bien se ha propuesto que la pérdida gestacional se presenta como una selección natural no cabe duda que el conocer la etiología permite orientar a la decisión para el apoyo por reproducción asistida, o bien la limitación del embarazo o una nueva oportunidad para cumplir el proyecto.

Este estudio intenta obtener información de asociación y causalidad para la pérdida gestacional recurrente en los estudios del polimorfismo 677 C>T en la población mexicana. Es importante comparar los datos entre la población de pacientes con PGR temprana y los de pacientes sin esta condición clínica, para estimar la asociación de polimorfismo de la MTHFR

y PGR. La importancia de este estudio radica en la posibilidad de reducir la hiperhomocisteinemia con la suplementación de ácido fólico que participaría en la actividad inmediata de la enzima MTHFR que se encuentra termolábil y con inactividad de hasta un 60%, lo cual generaría una forma de terapia preventiva para estos casos.

## **RESUMEN.**

La Pérdida gestacional recurrente afecta hasta el 5% de las parejas. Su etiología es muy diversa, y se ha reportado en la literatura una asociación entre la presencia de hiperhomocisteinemia y PRG. El polimorfismo 677C>T en el gen de la MTHFR, es una causa de hiperhomocisteinemia y el objetivo del estudio consistió en determinar la asociación de esta con la PGR. Se realizó un estudio de casos y controles que incluyó a 59 mujeres con diagnóstico de PGR, y a 109 mujeres sanas. Se determinó la frecuencia de los alelos C (silvestre) y T para el polimorfismo 677C>T, encontrándose en los casos una frecuencia de 48.3% del alelo C y de 51.6% del alelo T, en cambio en los controles del alelo C en 55.5% y el T en 44.4%. Los genotipos en los casos correspondieron a CC 30.5%, CT 35.5% y TT 33.9%. Los genotipos en los controles correspondieron a CC 38.5%, CT 32.1% y TT 29.4%, se obtuvo un OR de 1.29 (0.653-2.549,  $p= 0.576$ ), siendo no significativa. Debido al peso que acarrearán las diferentes etiologías de PGR, estos resultados se toman con reserva y podría diseñarse un estudio en pacientes con PGR y sus parejas contra sus similares sanos y además el estudio del genotipo del feto.

## **ABSTRACT**

The recurrent pregnancy loss (RPL) affects the 3% of the couples. The etiology is multiple, and it has been reported an association between hiperhomocisteinemia and RPL. The 677C>T polymorphism of the MTHRF is one cause of hiperhomocisteinemia, and this study was aimed to determinate the association between this one and RPL. This one is a case control study that evaluated 59 women with PGR and 109 women without that condition. The alele C frequency was 48.3% in the case group, while the alele T frequency was 51.6%. In the control group the alele C frequency was 55.5%, while the alele T frequency was 44.4%. The genotypes in the case group was CC 30.5%, CT 35.5% and TT 33.9%, while in the control group was CC 38.5%, CT 32.1% and TT 29.4%. The OR was 1.29 (0.653-2.549, p=0.576). There was not significant difference between both groups. Because of the magnitude that brings the multiple etiologies of RPL, those results must be carefully taken. A case-control study between couples with and without RPL is suggested.

## 1. MARCO TEÓRICO.

### Definiciones

La Pérdida Gestacional Recurrente (PGR) ha sido definida recientemente como la pérdida del producto del embarazo en 3 o más ocasiones que se presenta antes de la semana 28 de gestación.<sup>1</sup> Esta definición se ha modificado, para identificar como riesgo de recurrencia dos abortos espontáneos consecutivos, siendo similares los resultados posteriores en mujeres que han tenido dos o tres pérdidas previas.<sup>2</sup> En este trabajo la definición utilizada será de dos a más abortos consecutivos.<sup>2-3</sup>

La pérdida gestacional recurrente (PGR) se divide en dos grupos: Pérdidas tempranas o abortos y tardías u óbitos.<sup>4</sup> La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha definido el aborto como “la expulsión o extracción de su madre de un embrión o feto que pese 500 gramos o menos”, a una edad gestacional menor a 20 semanas.<sup>5</sup>

Se denomina aborto temprano al que ocurre antes de la 12a semana de gestación y aborto tardío al que se presenta entre las 12 y la semana 20 de gestación.<sup>5</sup>

Algunos autores han establecido una clasificación de las pacientes con PGR de acuerdo a las diferencias entre las manifestaciones de las pérdidas:<sup>5</sup>

1.-PGR primaria: Paciente que presenta por lo menos 3 Abortos Consecutivos

2.-PGR secundaria: Paciente que presenta por lo menos 3 abortos, posterior a un embarazo mayor de 20 semanas.

Polimorfismo génico: Se refiere a las diferentes secuencias de nucleótidos que pueden existir para la conformación de un gen.

Termolabilidad de la enzima: Se refiere a la disminución en la actividad enzimática ante determinados cambios en la temperatura.

Metilación. Se refiere a la agregación de un grupo metilo a una molécula determinada.

Hiperhomocisteinemia. Se refiere a concentraciones séricas elevadas de homocisteína.

## **Epidemiología**

En el rubro de las complicaciones del embarazo, el aborto corresponde a la más frecuente, con una incidencia variable entre las diferentes poblaciones estudiadas. Los reportes han señalado cifras desde el 12% hasta el 20% de todos los embarazos entre la semana 4 y 20 de gestación.<sup>2-3</sup> Sin embargo, la

verdadera incidencia de la pérdida gestacional temprana esporádica se ha señalado entre el 50% y el 60%, esto se ha detectado en estudios de alta sensibilidad para la medición de la fracción Beta de Gonadotropina Coriónica Humana, los cuales han demostrado este alto número de pérdidas no reconocibles clínicamente, usualmente entre las semanas 2 y 4 la de gestación.<sup>2-4</sup> Estos embarazos pueden ser embarazos ectópicos que se reabsorben espontáneamente, o fallas tempranas de implantación dadas por anomalías en el embrión.<sup>1</sup>

La incidencia de PGR depende de la definición de la misma, cuando esta corresponde a la presencia de 2 o más abortos, se ha reportado un 3% en todas las parejas.<sup>6</sup> Atendiendo a cálculos estadísticos, La frecuencia de una pérdida gestacional al azar es del 15%, siendo la posibilidad de un segundo aborto del 2.3% y de un tercero del 0.3%, considerando cada evento como independiente.<sup>2</sup> Sin embargo y atendiendo a estudios realizados en población representativa, se destaca el hecho de que mientras más abortos presente una paciente, mayor será el riesgo de presentar nuevamente dicha complicación. En 1989 Regan publicó una incidencia del 20% en mujeres con un aborto previo, de 28% con dos abortos previos y de 43% con tres o más abortos.<sup>6</sup> En 1990 Stirrat publicó una incidencia de 12.8% en mujeres sin historia previa de pérdidas (12-15%), con un aborto previo 21.3% (16-26%), con dos abortos previos 29% (19-35%) y tres abortos previos del 31.1% (26-37%).<sup>3</sup> En 1991 Knudsen reportó una incidencia de 16% en mujeres sin abortos previos, 25% en mujeres con un aborto previo, 45% en mujeres con dos abortos previos y, finalmente, 54% en mujeres con tres abortos previos. Cabe señalar que las

diferencias son mínimas y dependen de las poblaciones estudiadas. De cualquier modo, la tendencia del riesgo es similar en todos los estudios. <sup>6</sup>

(Cuadro No. 1)

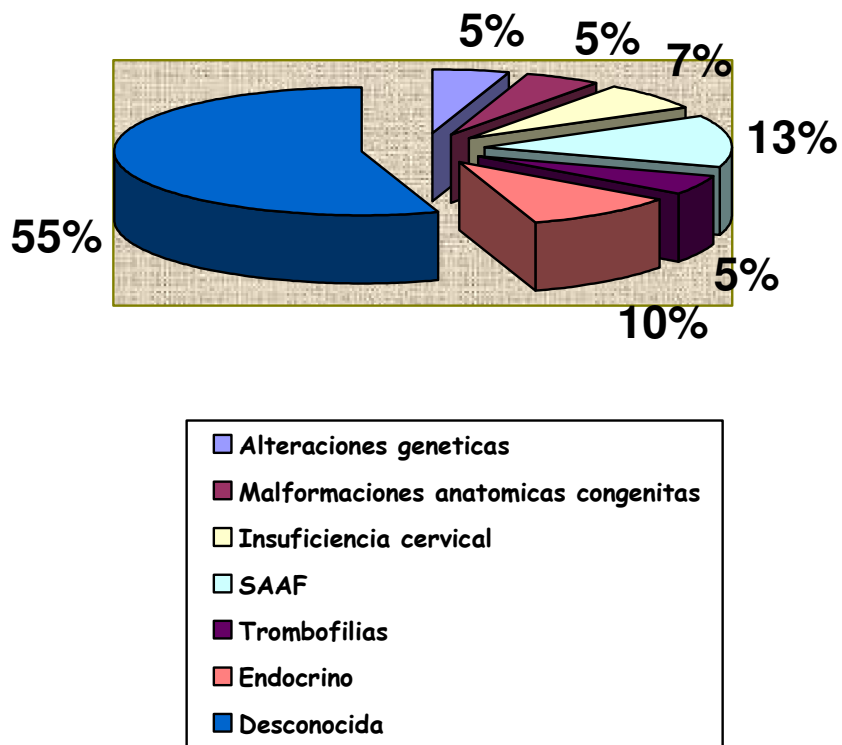
Número de Pérdidas	Regan 1989	Stirrat 1990	Knudsen 1991
0		12.8%	16%
1	20%	21.3%	25%
2	28%	29%	45%
3	43%	31.1%	54%

Cuadro 1.- Cálculo de riesgo para PGR, en relación a abortos previos.

## **Etiología**

Históricamente ha sido común dividir las causas de PGR en anomalías genéticas, desórdenes metabólicos y hormonales, anomalías anatómicas uterinas, infecciones, desórdenes autoinmunes, trombofilias y pérdida gestacional inexplicable, como lo muestra la siguiente gráfica que distribuye en porcentajes las etiologías posibles. <sup>(gráfica 1)</sup>

# ETIOLOGIA



Gráfica No 1. Frecuencia de las etiologías relacionadas con PGR.

Se reportan etiologías potenciales, algunas están asociadas a PGR, es decir, son causa directa de ellas; mientras que otras solamente están relacionadas, lo que significa que las pacientes que presenten algunas de estas últimas, no siempre presentarán pérdida gestacional. <sup>7, (tabla 2)</sup>



Factor	PGR	
	RELATIVAS A	CAUSA DE
Alteraciones genéticas	Definitivo	Definitivo
Anormalidades uterinas	Definitivo	Probable
Enfermedad tiroidea descontrolada	Probable	Probable
Diabetes descontrolada	Probable	Probable
Síndrome de ovarios poliquísticos	Definitivo	Probable
Anticuerpos antitiroideos	Raro	Raro
Anticuerpos antifosfolípidos	Definitivo	Probable
Mutación del Factor V de Leyden	Definitivo	Probable

. Tabla 2: Factores etiológicos potenciales como causa de Pérdida Gestacional Recurrente

Se ha reportado un 50% de casos en PRG que permanecen con etiología inexplicable, sin embargo entre el 70% y 75% de las parejas con PGR inexplicable, se presentará un embarazo subsecuente exitoso.<sup>8</sup>

Los avances en el rubro etiológico para cada factor se ven obstaculizados por las diferencias entre los estudios, siendo las de mayor repercusión las diferencias poblacionales, la definición de PGR, las semanas de gestación durante la pérdida, principalmente. El rol de factores en el sistema fibrinolítico (por ejemplo el inhibidor tipo 1 del activador del

plasminógeno) han sido recientemente señalados.<sup>9</sup> De esta manera podemos decir que en la actualidad los factores trombofílicos, genéticos e inmunológicos son los que conllevan mayor importancia.

Las anormalidades genéticas conforman hasta el 60% de las alteraciones encontradas en los productos de la concepción en abortos espontáneos en el primer trimestre o antes de la semana 12 de gestación.<sup>5</sup> Es por eso que la genética es una base importante para la investigación y abordaje etiológico de cada paciente con PGR.<sup>7</sup> Dichas alteraciones genéticas se pueden dividir en alteraciones citogenéticas numéricas y estructurales con o sin mosaicismo y alteraciones monogénicas. Las anormalidades numéricas se subdividen en aneuploidías (trisomías o monosomías) y poliploidías. Las trisomías son las más frecuentes (52%), seguidas de las poliploidías (21%) y monosomías del cromosoma X (13%). Las anormalidades estructurales se subdividen a su vez en deleciones, translocaciones, inversiones y duplicaciones, siendo que las translocaciones e inversiones tienen un papel importante en el aborto recurrente.<sup>10</sup>

Aproximadamente, 1 de cada 500 personas presenta una traslocación balanceada. Cuando un miembro de una pareja presenta una traslocación genética balanceada, el riesgo de presentar un aborto se duplica.<sup>9</sup> Estas alteraciones conforman el 6% de las causas genéticas en aborto recurrente. El mosaicismo se refiere a la presencia de dos o más líneas celulares en un mismo individuo y siempre dependerá de la etapa en que se presente durante el desarrollo embrionario.<sup>10</sup>

Ha sido señalada la relación de algunos polimorfismos génicos relacionados con PGR, como son la mutación del factor V de Leiden, la mutación 20210G>A de la protrombina y la mutación 677 C>T del gen de la MTHFR.<sup>6</sup> Estas tres mutaciones se han relacionado con defectos protrombóticos, específicamente en vasculopatía placentaria.<sup>11</sup>

Este trabajo se dirige al estudio molecular del polimorfismo 677 C>T del gen de la 5,10 MTHFR localizado en el cromosoma 1p36.3.

## **Homocisteína**

La homocisteína (Hcy) es un aminoácido no esencial, sulfurado, producto del metabolismo intermedio de la desmetilación del aminoácido esencial metionina.

Desde su descubrimiento en 1932 por el ganador del premio Nobel en 1955 Vincent DuVigneaud, y su asociación con la enfermedad vascular aterosclerótica prematura descrita por Kilmer McCully en 1969, la homocisteína surge como un nuevo marcador de riesgo para la enfermedad vascular.<sup>12</sup>

La homocisteína corresponde entonces a un producto intermediario del metabolismo de la metionina, el cual puede ser metabolizado posteriormente mediante dos vías alternativas: Puede ser degradado irreversiblemente mediante una vía de transulfuración o puede ser remetilado hacia metionina

mediante la vía de la remetilación. Ambas vías son dependientes de la vitamina B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>. Las concentraciones plasmáticas de homocisteína son determinadas por factores tanto genéticos como no genéticos.<sup>32</sup>

Los niveles séricos en ayuno de homocisteína se han utilizado para clasificar a la hiperhomocisteinemia (HHcy) en tres categorías:

- 1) Severa (100 mol/l).
- 2) Moderada (25-100 mol/l).
- 3) Leve (16-24 mol/l).

Estos niveles séricos usualmente descienden desde un 30 hasta un 50% durante el embarazo a partir del segundo trimestre.<sup>34</sup>

El aumento leve a moderado de los niveles séricos de la homocisteína se observa en un 5-7% de población general. Existen factores clínicos asociados a la presencia de hiperhomocisteinemia, algunos de los cuales son:

1. Edad y sexo: La HHcy se asocia con la edad avanzada y con el género masculino, generalmente las mujeres tienen niveles de Hcy 20% más bajos que los hombres, hasta que llegan a la menopausia, cuando los niveles de Hcy en ayuno son similares para hombres y mujeres.

2. Genéticos, incluyendo la disfunción secundaria por varios polimorfismos: Deficiencia de cistationina Beta sintasa, Deficiencia de 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa, Deficiencia de metionina sintasa.

3. Insuficiencia renal: Una tasa de filtración glomerular disminuída conlleva a una disminución en la excreción de la Hcy, y por lo tanto a la presencia de HHcy.

4. Estado nutricional: Disminución en la ingesta de los cofactores vitamínicos (folato, vitamina B12 y B6), alteración en la mucosa gástrica que afecte el factor intrínseco, enfermedad inflamatoria del intestino como enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa.

5. Enfermedades sistémicas: Como el hipertiroidismo, carcinomas (particularmente el de mama, ovarios y páncreas), insuficiencia renal crónica, LES y psoriasis.

6. Medicamentos: Anticonvulsivantes, como fenitoína, carbamazepina y otros como metrotexate, inhibidores de la fosfodiesterasa como teofilina, L-dopa, niacina y fibratos.

7. Disfunción de las células endoteliales: Cualquier causa de la disminución en la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial.

Los principales factores que afectan la concentración de homocisteína sérica son: la dieta con la ingesta de folatos y vitamina B12 y B6, y los polimorfismos en los genes que codifican las enzimas del ciclo de la homocisteína y las proteínas transportadoras de la transcobalamina.

### **Fisiopatología de la hiperhomocisteinemia**

Así tenemos que los efectos dañinos de la HHcy son:

1. Disfunción de las células endoteliales por la disminución de la viabilidad del óxido nítrico endotelial.
2. Toxicidad celular endotelial (Apoptosis).
3. Proliferación de células del músculo liso, hiperplasia e hipertrofia de la íntima.
4. Remodelación de la matriz extracelular, que resulta en fibrosis.
5. Promueve la vasoconstricción.
6. Promueve la modificación de LDL a LDL-C por la oxidación de sus moléculas.
7. Efecto proinflamatorio: IL-8
8. Promotor de macrófagos, con la formación de células espumosas.
9. Efectos protrombóticos al disminuir la trombomodulina y los niveles de heparin sulfato, así como inhibir la actividad de la proteína C, y de la tAP, principal activador del sistema fibrinolítico. También activa los factores V y XII e induce agregación plaquetaria.

10. Promueve el estrés oxidativo por la autooxidación de los residuos metilo de la homocisteína con la formación de radicales libres. Así mismo induce la formación de radicales superóxido.

11. Promueve la aterogénesis, arteriosclerosis, aterosclerosis y ateroescleropatía.

Es importante señalar que el daño encontrado en el endotelio por la HHcy es diferente al encontrado por la hipercolesterolemia.<sup>12</sup>

La hiperhomocisteinemia ha sido descrita como un nuevo factor de riesgo modificable para aterosclerosis y enfermedad vascular. Los mecanismos por los cuales la homocisteína ocasiona daño endotelial y enfermedad vascular no han sido comprendidos totalmente.<sup>32</sup>

### **Metabolismo de la homocisteína y el polimorfismo 677 C>T del gen de la enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa**

Hay evidencia que sugiere que la homocisteína está involucrada en varios defectos del desarrollo.

El metabolismo de la homocisteína también llamado metabolismo de un carbono, es una compleja serie de vías cruciales para la síntesis y reparación del DNA, y para una amplia serie de reacciones de metilación.<sup>figura 2.</sup>

### Mechanism of Hyperhomocysteinemia:

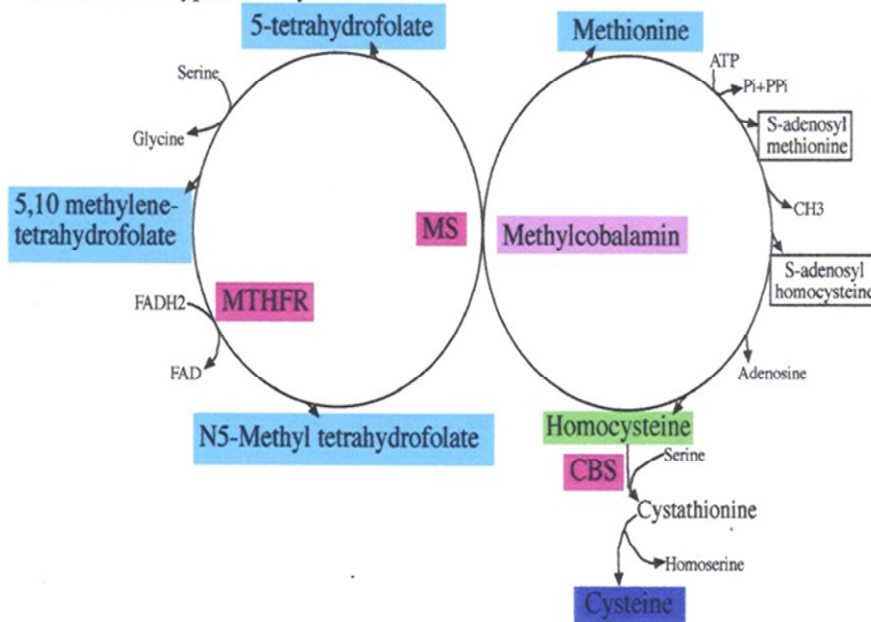


Figura 2: Ciclo de la homocisteína.

La enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHRF) es una enzima clave en el metabolismo de la homocisteína, esta enzima cataliza la conversión de 5,10 metilentetrahidrofolato en 5 metilentetrahidrofolato, la forma predominante del folato circulante.<sup>(Figura 2)</sup> El 5 metilentetrahidrofolato participa en la remetilación de homocisteína a metionina dependiente de vitamina B12, la metionina es convertida a S-adenosilmetionina que sirve como donador de grupos metilo en la metilación de DNA, proteínas, neurotransmisores y fosfolípidos.<sup>13, (Figura 2)</sup>

En el año de 1970 el primer reporte de las propiedades enzimáticas de la MTHRF fue de Kutzbach y Stokstad. La MTHFR es una flavoproteína que consiste en dos subunidades idénticas de aproximadamente 70 kDa. La



enzima contiene una región catalítica N-terminal. El gen humano de MTHFR está localizado en el cromosoma 1p36.3. La región total contiene 1,980 bp con un peso molecular de 74.6 kDa. La secuencia de aminoácidos muestra una homología en el 95% con el polipéptido de MTHFR del ratón. La organización genómica de la MTHFR consiste en 11 exones con una longitud de 102 bp a 432 bp e intrones que van de 150 bp a 1.5 kb. Se han identificado dos ARNm de 7.5 kb y 8.5 kb.<sup>14</sup>

El polimorfismo mejor caracterizado de la MTHFR consiste en una transición 677 C>T la cual resulta en una sustitución de alanina a valina en el dominio catalítico predeterminado de la MTHFR, esta sustitución vuelve a la enzima termolábil, presentando una disminución del 70% en su actividad en individuos homocigotos para la mutación, y una disminución del 35% en heterocigotos en estudio in vitro. La homocigocidad para el alelo T se asocia con niveles elevados de homocisteína en el plasma, principalmente en individuos con bajos niveles de folato plasmático.<sup>13</sup> Sin embargo se ha descrito que los niveles plasmáticos de homocisteína en individuos homocigotos para la mutación pueden ser disminuídos con la suplementación del folato.<sup>15</sup>

El segundo polimorfismo más común de la MTHFR es la transición 1298 A>C la cual resulta en la sustitución del glutamato por alanina. Se ha reportado que el alelo 1298C disminuye la actividad de la enzima MTHFR, pero no al mismo nivel que el alelo 677T. Se ha encontrado que en la población mexicana la prevalencia de este polimorfismo es muy baja.<sup>16-17</sup>

En aquellos sujetos que son heterocigotos para los alelos 677T y 1298C, lo que produce un genotipo 677CT/1298AC, se ha encontrado en algunos estudios que la actividad in vitro de la MTHFR disminuye en un 40-50%, similar a la disminución de la actividad de la enzima presentada por los individuos homocigotos 677T, con un incremento en los niveles de homocisteína y disminución de los niveles de folatos.<sup>16</sup> Aunque recientes estudios indican que el polimorfismo 1298 A>C no contribuye significativamente a hiperhomocisteinemia por sí solo, ni en conjunción con el 677 C>T, y el efecto fenotípico del polimorfismo ha sido cuestionado desde el punto de vista bioquímico.

Los polimorfismos de la MTHFR se asocian frecuentemente con homocisteinemia en mujeres embarazadas, esto es un riesgo para defectos del tubo neural, y PGR.<sup>18-19</sup> Gris, et al reportaron una asociación entre el incremento en los niveles de homocisteína y PGR temprana primaria.<sup>20</sup>

Recientemente se ha descrito otro polimorfismo genético que influye en la concentración de homocisteína en la transición C>G de la posición 776 (776 C>G) en el gen de la transcobalamina.<sup>21</sup> La transición resulta en una sustitución de arginina por prolina en el codón 259 que es el determinante principal del fenotipo de la transcobalamina en las poblaciones caucásicas. La transcobalamina transporta la vitamina B12 a los tejidos periféricos y la heterocigocidad para este polimorfismo también se ha asociado con hiperhomocisteinemia.<sup>22</sup> El tipo silvestre (sin mutación) de este gen tiene efectos positivos sobre los niveles plasmáticos de la transcobalamina, lo que

puede ser importante para el transporte adecuado de vitamina B12 a las células del embrión en crecimiento.

### **Prevalencia del polimorfismo 677 C>T del gen de la MTHRF**

Cerca de la mitad de la población general es portadora de al menos un alelo mutado del polimorfismo 677 C>T y la frecuencia del genotipo homocigoto mutado va del 1 al 20% dependiendo de la población estudiada.<sup>23</sup> En Europa del Norte, Frost en 1995 encontró una prevalencia de la mutación de aproximadamente 33 al 40% en heterocigotos y 10% en homocigotos en la población caucásica.<sup>24</sup>

El genotipo TT está presente en el 12% de la población en general, con frecuencias alélicas para T con variaciones como ejemplo 0.3 en americanos y 0.2 en asiáticos, 0.1 en afro-americanos, 0.047 en australianos, 0.066 en africanos y 0.23 en países Bálticos.<sup>14</sup>

En un estudio brasileño donde se buscó la prevalencia del estado homocigoto de la mutación encontraron una diferencia racial marcada entre brasileños, asiáticos, blancos, africanos y negros.<sup>25</sup>

## Prevalencia del polimorfismo 677 C>T en México

En México se realizó en 1999 por Mutchinick un estudio donde se buscó la frecuencia de la mutación 677 en 250 mujeres sanas de distintas áreas geográficas del país, encontrando los siguientes genotipos:

CC----- 17.6%

CT----- 47.6%

TT----- 34.8%

La frecuencia de los alelos fue

C-----41.4%

T-----58.6%.<sup>26</sup>

El segundo se realizó en la ciudad de Guadalajara en el 2000 por Dávalos donde se buscó en población sana la mutación de la MTHFR. Se estudiaron 102 pacientes mestizos, 50 Huicholes, 38 tarahumaras y 38 purépechas, la frecuencia genotípica fue de:<sup>27</sup>

GENOTIPO	MESTIZOS	HUICHOLAS	TARAHUMARAS	PURÉPECHAS
CC	31%	16%	45%	19%
CT	50%	56%	39%	48%
TT	19%	28%	16%	33%

La frecuencia de los alelos fue:

ALELO	MESTIZOS	HUICHOLES	TARAHUMARAS	PURÉPECHAS
C	56%	44%	64%	43%
T	44%	56%	36%	57%

Recientemente se realizaron dos estudios en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes en México. En el primero se incluyeron pacientes mexicanas con 2 o más abortos primarios tempranos de etiología desconocida. Se reunieron un total de 53 pacientes con PGR temprana, en las que excluyeron las causas conocidas de pérdida gestacional. El número total de abortos fue de 184, todos del primer trimestre, la frecuencia de genotipos maternos de la MTHFR fue de:

CC: 28.31%

CT: 33.9%

TT: 37.7%

La frecuencia alélica de la MTHFR en las pacientes con PGR fue:

Alelo C:45.28%

Alelo T: 54.72%

En el segundo estudio de tipo transversal, se incluyeron a un total de 118/59 pacientes/parejas, con dos o más pérdidas gestacionales tempranas. Se identificó la prevalencia del alelo mutado en 677T en un 51.2% de las

parejas. El riesgo materno al presentar un genotipo 677 T>T fue de 33.8% y el riesgo fetal por la combinación materna-paterna de 677T fué del 57.6%.<sup>29</sup>

### **Desarrollo embrionario.**

El metabolismo de un-carbono durante el desarrollo embrionario ha sido estudiado, la mayoría de las veces, enfocado al desarrollo del sistema nervioso. Las mujeres embarazadas con deficiencia de folato tienen un riesgo muy aumentado de procrear niños con defectos del tubo neural, y la suplementación periconcepcional de folato protege contra este defecto.<sup>30</sup> Los eventos moleculares que llevan a los defectos del tubo neural debido a la deficiencia de folatos no se conocen, pero pueden incluir metilación insuficiente de los metabolitos cruciales en el desarrollo del embrión y/o anomalías en la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células neuronales, lo cual puede ser debido a la inadecuada incorporación del nucleótido de ADN que caracteriza a la deficiencia de folatos en las células proliferativas.<sup>17</sup> Además de estos eventos fundamentales, se ha observado una disminución en la viabilidad fetal.

Un estudio reciente de casos y controles mostró un incremento en el riesgo de aborto espontáneo temprano en aquellas mujeres con niveles bajos de folato plasmático. La deficiencia de vitamina B12 durante el embarazo

resulta en una concentración elevada de homocisteína en el embrión e incrementa la incidencia de defectos del tubo neural, además la deficiencia hereditaria de transcobalamina da como resultado anomalías neurológicas profundas y retardo mental.

Tres estudios analizaron los efectos embriotóxicos directos de la homocisteína.

En un estudio la exposición de embriones de pollo a la homocisteína resultó en defectos cardíacos y del tubo neural.

En los otros dos estudios, la exposición de embriones de ratas y ratones a la homocisteína resultó en restricción del crecimiento y anomalías del desarrollo de los somitas, pero no en defectos neurológicos ni otros defectos teratógenos.<sup>31</sup>

Se ha reportado una asociación entre anomalías cardíacas congénitas, específicamente estenosis valvular pulmonar y atresia pulmonar en individuos con genotipos homocigotos TT para polimorfismo C677T de la MTHFR.<sup>33</sup>

El mecanismo preciso de la embriotoxicidad de la homocisteína aún no se ha aclarado pero hay muchas hipótesis algunas de las cuales han sido probadas experimentalmente. Los efectos tóxicos de la homocisteína en los embriones de ratas en desarrollo pueden resultar de la formación incrementada de S-adenosilhomocisteína que puede inhibir las reacciones de metilación

críticas, la concentración elevada de homocisteína puede también inhibir de novo la síntesis de deoxitimidilato (dTMP). La exposición de células Raji B-linfoideas proliferativas al exceso de homocisteína o metionina incrementa la recaptura de la timidina exógena, debido a la inhibición de la reacción catalizada por la timidilato-sintetasa en la cual el deoxiuridilato (dUMP) es convertido a dTMP, es así como la 5,10 metilentetrahidrofolato, un cofactor en esta reacción es agotada en exceso de homocisteína debido al incremento en la demanda de 5 metiltetrahidrofolato para remover la homocisteína por metilación. Se cree que lo anterior induce daño al ADN por el aumento en la incorporación inadecuada de dUMP en lugar de dTMP en el ADN, seguido de reacciones de excisión, reparación, fragmentación de ADN; paro del ciclo celular y finalmente apoptosis.

En conclusión folato, vitamina B12 y homocisteína juegan papeles muy importantes en las células en crecimiento y por lo tanto en el desarrollo embrionario. Es también posible que la homocisteína por si misma induzca algún desorden en el desarrollo previamente atribuido a la deficiencia de ácido fólico o vitamina B12.<sup>31</sup>

### **Polimorfismos de la MTHFR y TC su relación con la PGRT**

Los polimorfismos de la MTHFR y TC han sido implicados como factores de riesgo de muchos desórdenes del desarrollo, como defectos del tubo neural, labio y paladar hendido y síndrome de Down. Recientemente se



encontró una interacción positiva entre la combinación del genotipo MTHFR 677TT y 1298CC/CA como riesgo para síndrome de Down.<sup>35</sup>

En un estudio de Wenstrom et al se encontró una fuerte asociación entre los alelos fetales 677T, concentraciones elevadas de homocisteína en el líquido amniótico y defectos del tubo neural específicamente en la espina cervical-lumbar, lumbosacra y encefalocele occipital, pero no anencefalia, exencefalia o espina bífida confinada al sacro, estos autores concluyen que los alelos 677T de la MTHFR predisponen solo para ciertos tipos de defectos del tubo neural relacionado en el sitio de cierre.<sup>31</sup>

### **Alelos 677T maternos y fetales en el aborto espontáneo**

Como se mencionó previamente, la hiperhomocisteinemia materna es un factor de riesgo para PGR y también para pérdida gestacional temprana primaria, algunos estudios la han asociado con pérdida gestacional recurrente temprana, aunque este efecto no se replica en otros estudios. En un meta análisis del 2004 se analizaron los estudios encontrados de pérdida gestacional, y los hallazgos de genotipos maternos y fetales, para determinar si ser portadores de la mutación 677 C>T aumenta el riesgo de pérdidas, encontrándose lo siguiente:<sup>31</sup>

REFERENCIA	CASOS/CONTROLES	RESULTADOS
<u>Aborto recurrente</u>		
<i>Genotipos maternos</i>		
Foka et al.	80/100	Sin riesgo
Holmes et al.	173/67	Sin riesgo
Kumar et al.	24/24	Riesgo incrementado
Kutteh et al.	50/50	Sin riesgo
Lissak et al.	41/18	Riesgo incrementado
Murphy et al.	40/540	Sin riesgo
Nelen et al.	185/113	Riesgo incrementado
Pihusch et al.	102/128	Sin riesgo
Wramsby et al.	84/69	Sin riesgo
<u>Aborto no recurrente</u>		
<i>Genotipos maternos</i>		
Alfirevic et al.	18/44	Sin riesgo
Gris et al.	232/464	Sin riesgo
Kupferminc et al.	12/110	Sin riesgo
Many et al.	40/80	Sin riesgo
Martinelly et al.	67/232	Sin riesgo
Murphy et al.	24/540	Sin riesgo
<u>Aborto espontáneo</u>		
<i>Genotipos fetales</i>		
Isolato et al.	161/119	Riesgo incrementado
Zettemberg et al.	80/125	Riesgo incrementado

Así tenemos que 6 estudios no encontraron asociación entre los alelos maternos 677T y la pérdida fetal no recurrente, pero 5 de estos solo examinaron pérdida fetal tardía ( muerte fetal después de las 19 semanas de gestación o más), esta diferencia en los resultados puede ser debida a que el número de muestra es relativamente pequeño.

Los efectos comunes de los alelos mutados de las enzimas MTHFR y TC son la disminución en la viabilidad del folato y la vitamina B12 y el incremento en la concentración de homocisteína. Ya que los procesos vitales como proliferación y diferenciación celular son dependientes del folato y de la vitamina B12, mediadores en el metabolismo de la homocisteína, cualquier alteración en este puede ser especialmente grave tempranamente en la embriogénesis cuando las células se encuentra en proliferación y diferenciación rápidas, por lo que hay un especial interés por analizar los embriones abortados espontáneamente para determinarles los polimorfismos de la MTHFR y de la TC y no solo a las madres de dichos embriones.

Recientemente se realizaron 4 estudios para analizar los genotipos fetales: El primero de Isotalo et al. reporta una alta prevalencia de los alelos mutados de la MTHFR en embriones abortados, este grupo consistió en

muestras de tejido fetal de los abortos sucedidos tanto espontáneamente como terapéuticos, lo cual le disminuye validez al estudio.

Se realizó pues un nuevo estudio por Zettemberg et al. donde solo se incluían embriones abortados espontáneamente (muerte fetal entre las semanas 6 y 13 después de la concepción), encontrándose un OR significativo para aborto espontáneo de 14.2 (95% IC 1.78-113);  $p=0.001$ ), cuando se comparó la prevalencia de uno o más alelos 677T y 1298C contra el genotipo silvestre combinado CC/AA, en casos y controles, se encontró que el polimorfismo de la MTHFR tiene un mayor impacto en la supervivencia fetal.

La prevalencia de la mutación del TC 776G está significativamente incrementada en embriones abortados en los cuales la prevalencia del genotipo silvestre fue mucho menor que en los controles (9.1% y 32,2 respectivamente con  $p<0.001$ ).

Se ha establecido la posibilidad de la interacción gen-gen de los polimorfismos de la MTHFR y TC en abortos espontáneos, ya que los embriones que presentan los genotipos combinados MTHFR 677T y TC 776CG o 776GG, presentan el metabolismo de homocisteína más alterado que aquellos en los que solo se encuentra un gen con polimorfismo.

Por último otro posible mecanismo hasta ahora inexplorado, es el del tipo de interacción genética materno-fetal en los abortos espontáneos. El polimorfismo 677 C>T confiere un riesgo aumentado para defectos del tubo

neural si la madre y su hijo son homocigotos para el alelo 677T, comparado con el riesgo que presentaría si solo la madre o el hijo fuesen homocigotos, coincidiendo en que los niveles de homocisteína en el embrión son mayores si el feto y la madre presenta hiperhomocisteinemia asociada a los polimorfismos en el gen de la MTHFR y TC, y si la hipótesis de la embriotoxicidad de la homocisteína fuese comprobada, esto incrementaría aún más el riesgo de presentar aborto espontáneo.

## 1. OBJETIVOS, HIPÓTESIS.

### 4.1 OBJETIVOS

#### General

Determinar la presencia del polimorfismo 677 C>T del gen de la MTHFR en mujeres con pérdida gestacional recurrente en comparación con mujeres sin pérdida gestacional recurrente.

#### Específicos

1. Localizar la mutación 677 C>T del gen de la MTHFR por medio de la técnica PCR-FLP en pacientes mexicanas con y sin PGR
2. Describir la prevalencia de la mutación 677 C>T del gen de la MTHFR en mujeres mexicanas con y sin PGR.
3. Determinar la frecuencia del alelo T en mujeres con PGR y sin PGR.
4. Determinar la frecuencia del genotipo para el alelo C y T en la población de estudio.

### 1.2 HIPÓTESIS

La presencia del polimorfismo 677 C>T en estado homocigoto o heterocigoto en la madre es un factor de riesgo que incrementa los niveles de homocisteína y genera embriotoxicidad y disminución de la viabilidad embrio-fetal, con precipitación de la pérdida gestacional.

## 1. METODOLOGÍA

5.1. TIPO DE INVESTIGACION: Clínica.

5.2 TIPOS DE DISEÑO: Casos y controles, anidado en una cohorte perinatal.

5.2.1 RIESGO: Menor al mínimo (toma de muestra de sangre venosa periférica).

### 5.3 LUGAR Y DURACIÓN

Instituto Nacional de Perinatología en el servicio de Obstetricia y consulta de riesgo pregestacional que cumplen los criterios de inclusión, durante el período del 31 de Mayo 2004, al 31 de Mayo 2006.

5.4. UNIVERSO, UNIDADES DE OBSERVACIÓN, MÉTODO DE MUESTREO Y TAMAÑO DE LA MUESTRA.

#### Universo

#### Grupo 1: casos

Pacientes del Instituto Nacional de Perinatología con dos o más pérdidas gestacionales tempranas que acuden la consulta de riesgo pregestacional o que acuden a urgencias por aborto.

### Grupo 2: controles.

Pacientes embarazadas sanas que acudan de primer ingreso al servicio de consulta externa y pacientes puerperas sanas en el servicio de hospitalización.

### Método de Muestreo

Muestreo no probabilístico.

### Tamaño de la Muestra

El total de pacientes capturadas durante el periodo establecido

## 5.5 . CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

### 5.6 Criterios de Inclusión

#### 5.6.1 Grupo 1, casos:

- Pacientes con dos o más abortos.
- Estudio citogenético de pareja normal.
- Estudios de endocrinología normales.
- Estudios de anticuerpos antifosfolípidos normales.
- Estudios anatómicos normales.
- Perfil TORCH negativo.

#### 5.6.2 Grupo 2, controles:

- Pacientes sin antecedentes de aborto
- Pacientes sin antecedente de preeclampsia



- Pacientes sin preeclampsia, hipertensión o proteinuria.
- Pacientes con estudios endócrinos, inmunológicos, infecciosos y anatómicos negativos.

#### 5.7 Criterios de exclusión.

- Pacientes que no cumplan los criterios antes señalados y que no acepten participar en el estudio.

#### 5.8 Criterios de eliminación

- Muestras sanguíneas de calidad deficiente, y que no pueda obtenerse una nueva muestra.

#### 5.9 VARIABLES EN ESTUDIO.

##### 1. Pacientes sanas

Se refiere a las pacientes embarazadas o durante el puerperio sin antecedente de dos o más abortos, sin antecedente de preeclampsia, y sin diagnóstico de cualquier enfermedad hipertensiva asociada al embarazo, con pruebas citogenéticas, inmunológicas, infecciosas, endócrinas y anatómicas negativas.

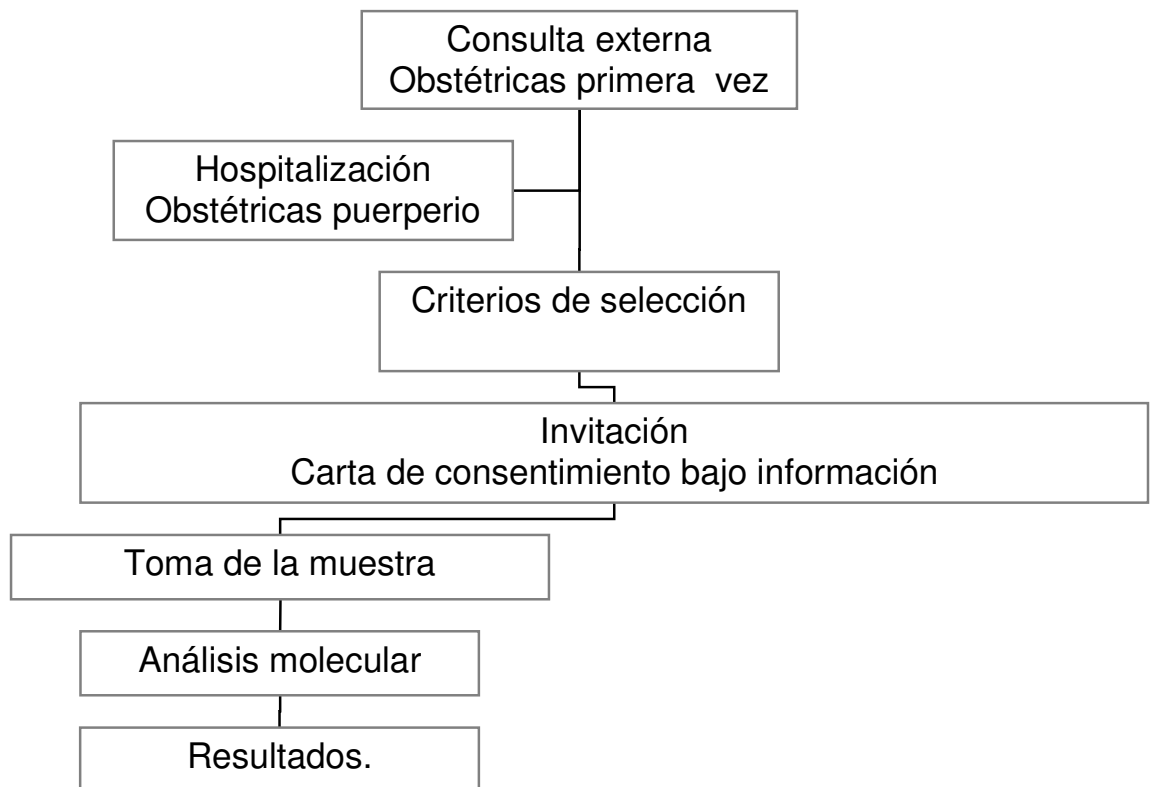
##### 2. Pacientes con pérdida gestacional recurrente

Se refiere a las pacientes con el antecedente de dos o más abortos.

## 5.11 RECOLECCION DE DATOS

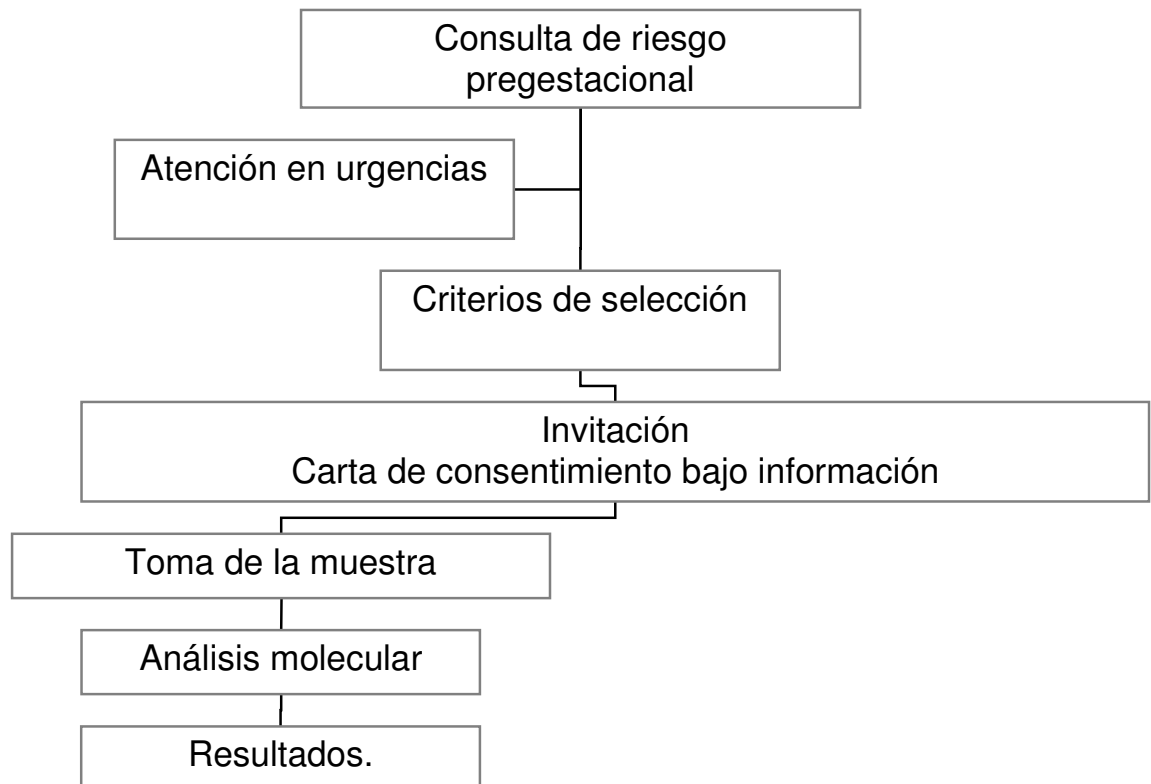
### 5.11.1 CONTROLES.

Fuente: pacientes embarazadas sanas que ingresan por vez primera al INPerIER por el departamento de consulta externa. Se anexa el siguiente algoritmo



### 5.11.2 CASOS.

Fuente: pacientes con pérdida gestacional recurrente vistas en la consulta de riesgo pregestacional o atendidas en el servicio de urgencias del INPerIER, se anexa el siguiente algoritmo. embarazadas sanas que ingresan por vez primera al INPerIER por el departamento de consulta externa. Se anexa el siguiente algoritmo:



5.11.2 Método de recolección: Se revisará si las pacientes cumplen los criterios de selección. En caso de ser esto afirmativo, se les solicitará consentimiento de manera informada para participar en el estudio.

### 5.11.3 Procesamiento de las muestras.

El polimorfismo se buscó en el ADN extraído de linfocitos de sangre venosa periférica de la siguiente forma:

Se tomó una muestra de sangre (5ml) y se colocó en un tubo vacutainer con EDTA.

Se extrajo su ácido desoxirribonucleico (ADN) y se realizó PCR-RFLP para determinar la presencia de las mutaciones 677 C>T mediante la digestión con enzimas de restricción *Hinf* I del producto de PCR de 228 bp. Los individuos silvestres solo muestran una banda en el gel de azarosa de 234bp, mientras que los heterocigotos (CT) muestran dos fragmentos (234 y 181 pb) y los homocigotos para la mutación solo muestran el fragmento de 181 bp.

Iniciadores de PCR para la mutación 677 C>T:

5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'

3'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'

Las condiciones de la reacción para PCR fueron 50 ng de cada iniciador, 0.2 mM de los desoxirribonucleicos, 1 mc de amortiguador de reacción, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5% (v/v) de DMSO, 0.5 U de Taq DNA Pol, 1 de agua desionizada c.b.p. 50 uL.

El programa de temperatura fue: 2 minutos a 96° C (desnaturalización del ADN); y 35 ciclos con las siguientes características: 1 minuto 92° C, 30 seg 58° C, 30 seg 72° C y 7 minutos a 72° C.

El producto de PCR se identificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Posteriormente se tomaron 15 µL del producto PCR para la digestión con la enzima de restricción y se agregaron 2 u de *Hinf* I en el buffer de reacción incubado 2 horas a 37° C. Finalmente se analizó el patrón de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa al 4%. El marcador de peso molecular a utilizar será el plasmado pUC 18 cortado por *Hae*III.

Se esquematiza el proceso en la figura 3:

# Materiales y métodos

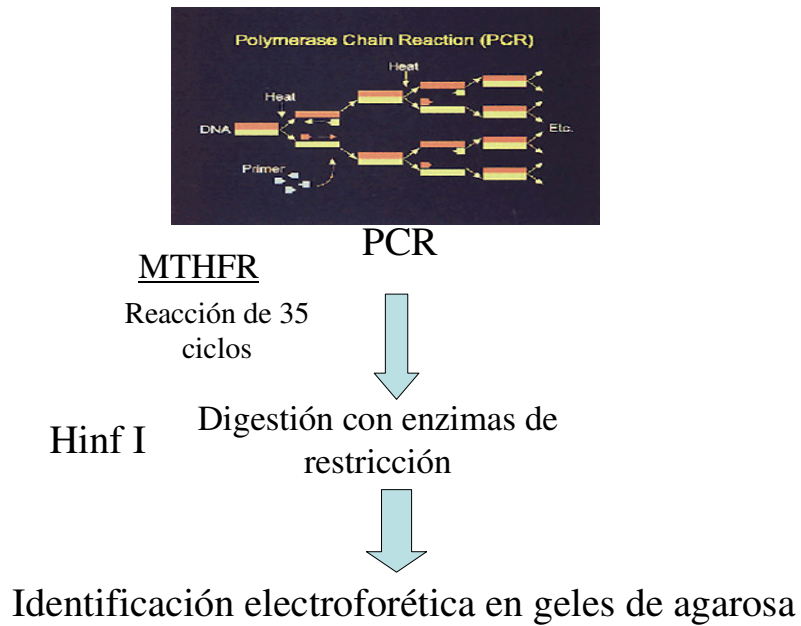
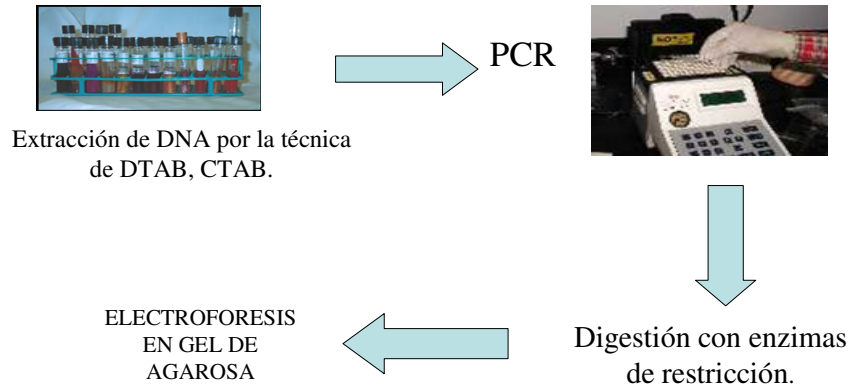


Figura 3: Proceso de las muestras.

## 5.12 PLAN DE ANÁLISIS

Para el análisis estadístico se utilizará el programa de Windows SPSS, Sigma Plot, determinando para las variables:

- Estadística descriptiva:

Frecuencias y proporciones.

- Fase analítica:

Comparación de promedios entre dos grupos independientes para distribución normal: t student.

- Fuerza de la asociación entre variables:

1. Diferencia de riesgo o reducción absoluta del riesgo (RAR).
2. Reducción del riesgo relativo.
3. Riesgo relativo.
4. Odds Ratio, oportunidad relativa (OR).

## 1. RESULTADOS ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.

Fueron estudiados dos grupos de pacientes. El primero lo conformaron 59 pacientes con diagnóstico de PGR, las cuales conformaron el grupo correspondiente a los casos. El segundo grupo lo conformaron 109 pacientes sanas con los criterios de inclusión señalados previamente, correspondiendo así al grupo de controles.

El porcentaje de distribución de los casos:

	frecuencia	porcentaje	Porcentaje acumulado
CC	18	30.5%	30.5%
CT	21	35.6%	66.1%
TT	20	33.9%	100%
Total	59	100%	

El porcentaje de distribución de los controles:

	frecuencia	porcentaje	Porcentaje acumulado
CC	42	38.5%	38.5%
CT	35	32.1%	70.6%
TT	32	29.4%	100%
Total	109		

La distribución de las frecuencias alélicas en los casos



Alelo	Frecuencia del alelo	Porcentaje de frecuencia
C	57	48.3%
T	61	51.6%

La distribución de las frecuencias alélicas en los controles

Alelo	Frecuencia del alelo	Porcentaje de frecuencia
C	121	55.5%
T	97	44.4%

Prueba de t student.

	t	gl	Diferencia de medias	Límite inferior*	Límite superior*
PGR	19.318	58	2.03390	1.8231	2.2446
Sanas	24.219	108	1.90826	1.7521	2.0644

Valor de la prueba =0. \* 95% intervalo de confianza.

Individuos homocigotos TT: OR 1.290 (0.653-2.549, p=0.576).

## **1. CONCLUSIONES**

La pérdida gestacional recurrente conlleva una etiología diversa sobre la que aún se encuentra mucho por descubrir. De acuerdo con los antecedentes bibliográficos y la fisiopatología de la hiperhomocisteinemia la presencia del polimorfismo C>T en el gen de la MTHFR es presumiblemente mayor en las pacientes con pérdida gestacional recurrente, sin olvidar el peso que acarrea la presencia de otros factores asociados con PGR. Es por ello que aunque la asociación entre el grupo de casos y controles no demostró una diferencia significativa para la presencia de este polimorfismo, sí es posible observar una tendencia al mayor número de alelos T en la población con PGR.

## 1. BIBLIOGRAFÍA

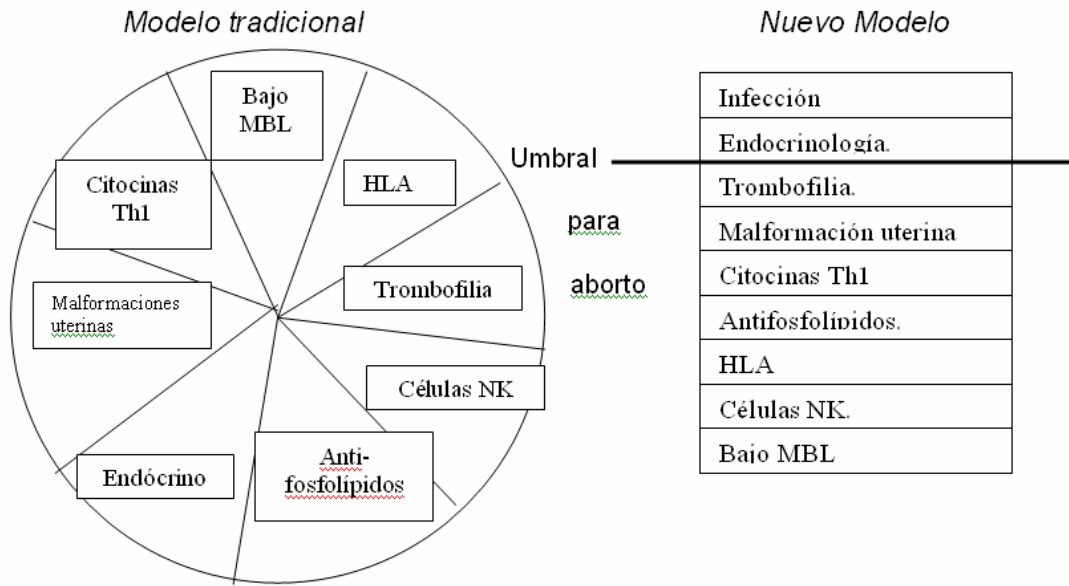
1. Christiasen O., Nielsen H., Kolte A., Pedersen A. Research Methodology and Epidemiology of Relevance in Recurrent Pregnancy Loss. seminars in reproductive medicine 2006; 24 (1): 2006.
2. Hill JA. Diagnóstico y tratamiento de la pérdida recurrente del embarazo En: Remohí J, Pellicer A, Simón C, Navarro J. Reproducción humana 2 ed Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2002. p 607-12.
3. Hatasaka H. Recurrent Miscarriage: Epidemiologic factors, definitions and incidente. Clin Obstet Gynecol 1994; 37(3):625-634
4. Speroff L. Recurrent Early Pregnancy Losses. En: Speroff L. Glass R. Kase N. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 6ta ed Atlanta: Lippincott Williams and Wilkins, 1999. p1043-1056.
5. Ruiz A. "Aborto" guías para el manejo de urgencias Capitulo X, 2003: 906-911.
6. Regan L. Rai R. Epidemiology and the medical causes of miscarriage. Clin Obstet Gynecol 2000; 14(5):839-854.
7. Clinical management guidelines for obstetrician – gynecologist. ACOG Practice boletin, 2001 Feb ; 24
8. Clifford K, Rai R, Regan L. Future pregnancy outcome in unexplained recurrent first trimester miscarriage. Hum Reprod 1997; 12:387–389
9. Carrington B., Sacks G., Regan L.,  
Recurrent miscarriage: Pathophysiology and outcome  
Curr Opin Obstet Gynecol 2005; 17:591–597.

10. Goddijn M, Leschot N. Genetic Aspects of Miscarriage. *Bailliers Clin Obstet Gynecol* 2000; 14(5):839-854.
11. Cunningham F. et al. Disease and injuries of the fetus and newborn En: Cunningham F, Williams Obstetrics 21va ed McGraw Hill; 2001. p 1073-8.
12. Hayden MR, Tyagi SC. Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: The pleiotropic effects of folate supplementation. *Nutrition Journal* 2004,3:4.
13. Mattson MP, Shea TB: Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2003, 26:137-146.
14. Fodinger M, Walter H, Sunder G. Molecular Biology of 5,10 Methylene tetrahydrofolate Reductase. *J Nephrol* 2000, 13:20-23.
15. Jacques PF et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996, 93:7-9.
16. Weisberg I et al. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998, 64:169-172.
17. Chango A et al. The effect of 677C>T and 1298A>C mutation on plasma homocysteine and 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. *Br J Nutr* 2000, 83:593-596.
18. Steeger-Theunissen RP et al. Hyperhomocysteinemia and recurrent spontaneous abortion or abruption placentae. *Lancet* 1992,339:1122-1123.
19. Nelen WL: Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2000, 74:1196-1199.

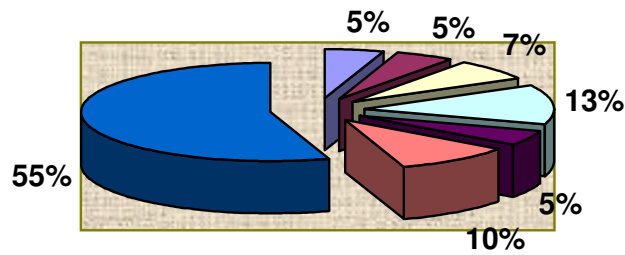
20. Gris JC et al. Antiphospholipid/antiprotein antibodies, hemostasis-related autoantibodies, and plasma homocysteine as risk factors for a first early pregnancy loss: a matched case-control study. *Blood* 2003,102:3504-3513.
21. ZetterberH. Et al. The transcobalamin codon 259 polymorphism should be designated 776C>G. *Blood* 2003, 101:3749-51.
22. Namour F et al. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood* 2001,97:1092-1098.
23. Botto LD. Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: HuGe review. *Am J Epidemiol* 2000,151:862-877.
24. Holmes Z. Regan L. Chilcott I. Cohen H. The C677T MTHFR gene mutation is not predictive of risk for recurrent fetal loss. *Br J Haematol* 1999,105:98-101.
25. Franco F. et al. Analisis of the 677 C>T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic group. *Thromb Haemost* 1998,79:119-21.
26. Mutchinick O. Lopez M. Luna L. Waxman J. Babinsky V. High prevalence of neural tube defects. *Mol Genet Metab* 1999,68:461-7.
27. Dávalos I. et al. The 677 C>T polymorphism of the metylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Ann Genet* 2000,43:89-92.
28. Dueñas RJ, García CR, Identificación del polimorfismo C677T de la 5-10 metiltetrahidrofolato reductasa en población mexicana con pérdida gestacional recurrente [tesis] México, UNAM, 2004

29. García JR, García CR, Identificación del polimorfismo C677T del gen de la 5-10 metil tetrahidrofolato reductasa en pacientes y su pareja con pérdida gestacional recurrente temprana [tesis] México, UNAM, 2005.
30. Van der Put NM, Van Straaten HW, Trijbels FJ, Blom HJ. Folate homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp Biol Med* 2001;226:243-270.
31. Zetterberg H. Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphism in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. *Reproduc biol endocrinol* 2004;2-7.
32. Castro et al. Homocysteine metabolism, hiperhomocysteinaemia and vascular disease: an overview. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2006;29(1):3-20.
33. Lee C et al. Association of the C677T methylenetetrahydrofolate reductase. mutation with congenital heart disease. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 2005;84(12):1134-1140.
34. Adelberg AM, Kuller JA. Thrombofilias and recurrent miscarriage. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 2002;57(10):703-709.
35. Scala I et al. Analysis of seven maternal polymorphisms of genes involved in homocysteine/folate metabolism and risk of Down syndrome offspring. *Genetics in Medicine* 2006;8(7):409-416.
36. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: Implication for the pathogenesis of artheryosclerosis. *American Journal Pathol* 1969; 56:111-128.

# 1. ANEXOS Y APÉNDICES.

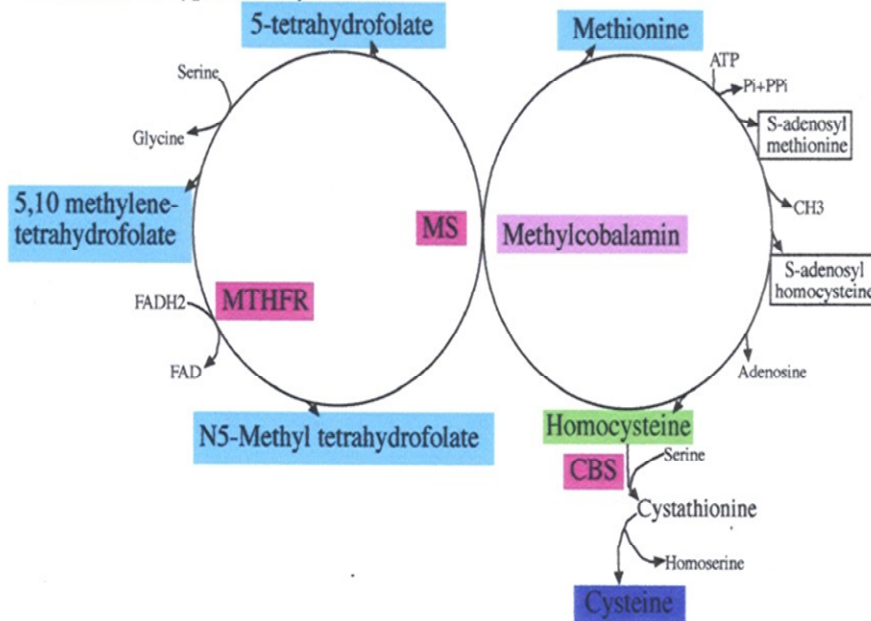


## ETIOLOGIA



- Alteraciones geneticas
- Malformaciones anatomicas congenitas
- Insuficiencia cervical
- SAAF
- Trombofilias
- Endocrino
- Desconocida

### Mechanism of Hyperhomocysteinemia:



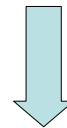
## Materialles y métodos



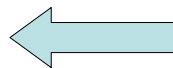
Extracción de DNA por la técnica de DTAB, CTAB.



PCR

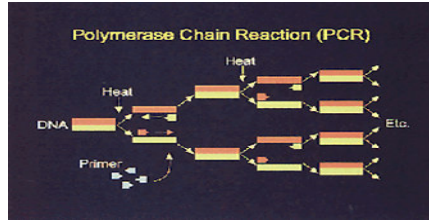


Digestión con enzimas de restricción.



ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA





PCR

MTHFR

Reacción de 35  
ciclos



Hinf I Digestión con enzimas de  
restricción



Identificación electroforética en geles de agarosa

V