



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO A2756G DEL GEN *MTR*
EN PACIENTES CON LABIO HENDIDO CON O SIN
PALADAR HENDIDO NO SINDRÓMICO Y EN SUS MADRES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:

DR. LUIS ENRIQUE MARTÍNEZ BARRERA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. VERÓNICA FABIOLA MORÁN BARROSO

ASESORAS DE TESIS:

DRA. CONSTANZA GARCÍA DELGADO

BIOL. ADRIANA SÁNCHEZ BOISO



MEXICO, D.F.

FEBRERO 2011

HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO

FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud



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.

Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso

Profesor Titular de la Especialidad en Genética Médica HIMFG

Dra. Constanza García Delgado

Profesor Adjunto de la Especialidad en Genética Médica HIMFG

Biol. Adriana Sánchez Boiso

Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética HIMFG

Dr. Jaime Nieto Zermeño

Director de Enseñanza y Desarrollo Académico

Agradecimientos

Gracias a mi familia Reyna, José León, Laura, Alberto y Felicitas

Por su cariño, comprensión y apoyo sin condiciones. Gracias por guiarme sobre el camino de la educación y la responsabilidad.

Gracias a mi amor Mali

Por tu amor y alegría que me permite poder lograr lo que me proponga. Gracias por ser parte de mi vida.

Gracias Dra. Verónica F. Moran Barroso

Por permitirme ser parte del grupo de trabajo. Sus consejos, paciencia y opiniones me sirvieron para sentirme satisfecho por mi participación en el proyecto de investigación y en mi desarrollo profesional.

*Gracias a mis maestros Dra. Constanza García Delgado, Dra. Rosa Isela Ortiz de Luna y
Dr. Francisco Flores*

Por brindarme sus enseñanzas y servirme de guía durante mi crecimiento profesional. Toda mi admiración.

Gracias a mi asesora Biol. Adriana Sánchez Boiso

No voy a olvidar tus conocimientos y ayuda para el logro de mis objetivos.

Gracias a mis compañeros Luz, Melania y Ocelotl

Que estuvieron conmigo y compartimos experiencias. Gracias a cada uno por hacer que mi estancia en la residencia fuera placentera.

Gracias M. en C. Alicia Beatriz Cervantes Peredo

Por su extraordinario apoyo para la realización de este proyecto.

Gracias a usted maestra Dora

Que siempre es un estímulo para crecer como persona.

Gracias al Departamento de Genética y al Hospital Infantil de México Federico Gómez

INDICE

Resumen.....	6
I. Introducción.....	7
1.1 . Malformaciones congénitas.....	7
1.2 . Labio y paladar hendido.....	8
1.2.1. Desarrollo embrionario del labio y paladar.....	9
1.2.2. Epidemiología del labio y paladar hendido.....	12
1.2.3. Clasificación del labio y paladar hendido.....	13
1.2.4. Etiología del labio y paladar hendido no sindrómico.....	16
1.3. Bases moleculares del labio y paladar hendido.....	18
1.4. Enzima metionina sintasa.....	20
1.5. Gen <i>MTR</i>	24
1.6. Polimorfismo A2756G del gen <i>MTR</i>	27
II. Planteamiento del problema.....	31
III. Justificación.....	31
IV. Objetivos.....	32
4.1. Objetivo general.....	32
4.2. Objetivos particulares.....	32

V.	Material y metodología.....	33
	5.1. Diseño del estudio.....	33
	5.2. Variables de estudio.....	33
	5.3. Muestra.....	33
	5.4. Criterios de selección.....	34
	5.4.1. Criterios de inclusión.....	34
	5.4.2. Criterios de exclusión.....	34
	5.4.3. Criterios de eliminación.....	34
	5.5. Análisis clínico.....	35
	5.6. Evaluación del DNA genómico.....	37
	5.7. Reacción en cadena de polimerasa.....	37
	5.8. Análisis del polimorfismo A2756G del gen <i>MTR</i>	40
	5.9. Análisis estadístico.....	43
VI.	Resultados.....	44
	6.1. Características clínicas.....	44
	6.1.1. Género y edad.....	44
	6.1.2. Antecedentes heredofamiliares.....	45
	6.1.3. Lugar de origen y residencia.....	46
	6.1.4. Ingesta de ácido fólico.....	47
	6.1.5. Fenotipo de los pacientes.....	48
	6.2. Análisis molecular.....	50
	6.3. Frecuencia del polimorfismo A2756G del gen <i>MTR</i>	53
	6.4. Relación genotipo-fenotipo.....	54

6.5. Análisis estadístico de Hardy-Weinberg.....	56
VII. Discusión.....	59
VIII. Bibliografía.....	66
Anexos.....	76
Anexo 1. Extracción de ADN genómico.....	76
Anexo 2. Reacción en cadena de polimerasa.....	80
Anexo 3. Gel de agarosa.....	83
Anexo 4. Electroforesis.....	84
Anexo 5. Carta de consentimiento informado.....	85

RESUMEN

Las hendiduras orofaciales son los defectos congénitos craneofaciales más comunes. En México, el labio hendido con o sin paladar hendido no sindrómico (LPHNS) tiene una prevalencia de 12.7/10,000 nacimientos y en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) es la 13ª causa de consulta externa, representando 1.2%. El componente etiológico es multifactorial y complejo, existiendo una interacción genoma-ambiente. Se ha reportado la asociación entre polimorfismos de genes involucrados con el metabolismo del ácido fólico y homocisteína (*MTHFR* y *MTR*) y la presencia de LPHNS. La determinación de la frecuencia del polimorfismo A2756G del gen *MTR* en población mexicana contribuirá a esclarecer si este factor genético, en la madre o el producto, hace que este último sea más susceptible a presentar LPHNS. El objetivo del presente estudio fue describir o determinar la frecuencia del polimorfismo en un grupo de pacientes con LPHNS y sus madres del HIMFG. La muestra constó de 66 individuos (33 pacientes y 33 madres) para el análisis del polimorfismo mediante RFLP. La presentación de LPHNS izquierdo y el predominio en masculinos fue lo más frecuente. Aproximadamente 30% de los pacientes tuvo antecedentes heredofamiliares. La mayoría de las madres no ingirió ácido fólico antes del embarazo y cuando lo hizo, generalmente, fue en el segundo trimestre. Con respecto a las frecuencias genotípicas para el polimorfismo A2756G, el genotipo AA fue el más frecuente en pacientes y sus madres 0.76; mientras que el genotipo AG presentó discreta variación entre pacientes y madres, 0.24 y 0.21 respectivamente. No se encontró el genotipo GG en los pacientes y sólo una madre lo presentó (0.3). La frecuencia para el alelo A en los casos fue de 0.88 y para el alelo G de 0.12; en cuanto a las madres, las frecuencias alélicas fueron 0.86 y 0.14 respectivamente. Los resultados sugieren el alelo G no representaría un factor de riesgo para LPHNS en la población de pacientes estudiada en el HIMFG. Sin embargo, para obtener una conclusión definitiva sería necesario compararlo con la frecuencia del polimorfismo en la población mexicana general y aumentar el tamaño de la muestra.

I. INTRODUCCION

1.1. MALFORMACIONES CONGÉNITAS

Los defectos o malformaciones congénitas son un grupo heterogéneo de enfermedades resultado de una alteración intrínseca en la formación, crecimiento o diferenciación de un órgano o estructura. Son responsables directos o indirectos de mortalidad perinatal e infantil, contribuyendo al 20-25% de las muertes perinatales. Deben considerarse además las repercusiones emocionales y económicas que estas alteraciones tienen para los pacientes y sus familias. Aproximadamente en 30% de los defectos congénitos se desconoce la causa y entre 20% y 30% de ellos se considera que su etiología es multifactorial.¹

Por otra parte, aproximadamente el 30% de todos los embarazos son afectados por malformaciones y la mayoría de ellos son perdidos espontáneamente en etapas tempranas. Alrededor de 2.7% de los productos que nacen tienen alguna malformación.²

A nivel mundial la prevalencia de los defectos congénitos es de 2-5% de todos los recién nacidos vivos (RNV). En México se encuentran entre las diez principales causas de mortalidad infantil, representando cerca del 10% y se estima una frecuencia de 3 a 5% en RNV.³ Otro estudio reportó una frecuencia de 5.5 por cada 1,000 RNV⁴ y de acuerdo con el estudio de Valdés-Hernández, et al. (2009), en México, una proporción de 42 a 48% de las muertes por defectos al nacimiento en menores de 5 años de edad se debe a defectos del sistema circulatorio y 13 a 19% del sistema nervioso.⁵

Tomado en consideración los datos anteriores, los defectos al nacimiento más frecuentes en México con una prevalencia por 10,000 RNV son: nevus (17.4%), poliotia (13.6%), síndrome de Down (13.3%), pie equinovaro (12.2%), luxación congénita de cadera (10.5%), espina bífida-hidrocefalia (10.5%), polidactilia (8.8%), labio y/o paladar hendido (8.8%), entre otros.³

1.2. LABIO Y PALADAR HENDIDO

Las hendiduras del labio y el paladar (LPH) representan un grupo heterogéneo de alteraciones que afectan los labios y la cavidad oral. Los efectos sobre el lenguaje, audición, apariencia y complicaciones en relación al aprendizaje, conducen a resultados adversos para la salud y la integración social. Los individuos afectados requieren atención multidisciplinaria desde el nacimiento hasta la edad adulta, por la afectación que tiene tanto en morbilidad como en calidad de vida. La atención para los niños que nacen con estos defectos requiere de grupos multidisciplinarios en los que se incluyen especialistas en: audiología, cirugía plástica, cirugía maxilofacial, enfermería, genética, odontología, otorrinolaringología, ortodoncia, psicología y terapia del lenguaje, entre otros.⁶

1.2.1. DESARROLLO EMBRIONARIO DEL LABIO Y PALADAR

El desarrollo del labio y el paladar implica una serie compleja de eventos que requiere de la coordinación estrecha de los procesos de migración, crecimiento y diferenciación celular, así como de apoptosis. El desarrollo facial humano inicia durante la cuarta semana de vida intrauterina cuando las células de la cresta neural migran y se combinan con el mesodermo para formar el primordio craneofacial (Fig.1).⁷

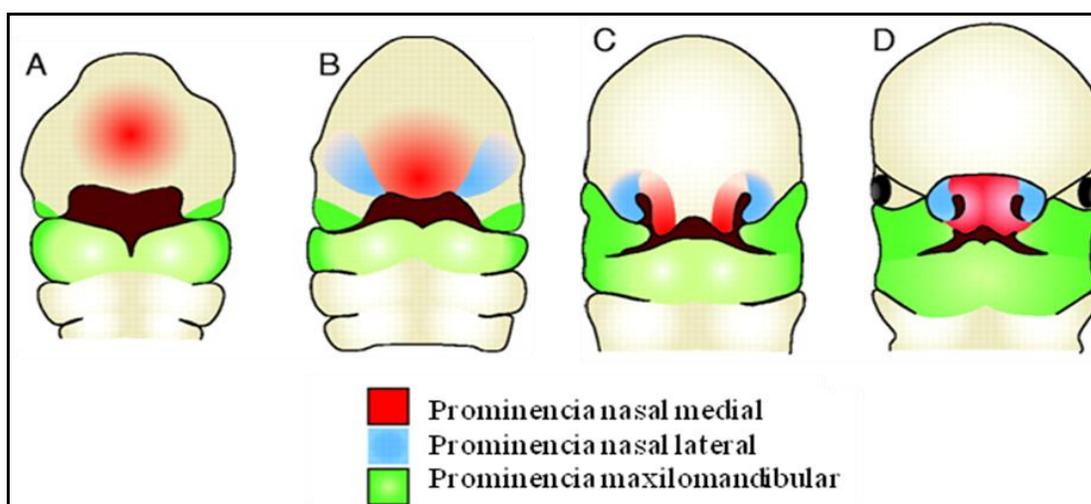


Figura 1. Desarrollo del primordio craneofacial. Visión frontal de las prominencias que dan lugar a las principales estructuras de la cara. La prominencia frontonasal o nasal media (en rojo) contribuye para formar la frente (A), la parte media de la nariz (B), el filtrum (C) y el paladar primario (D), mientras que las prominencias nasales laterales (en azul) forman los lados de la nariz (B y D). La prominencia maxilomandibular (en verde) origina la mandíbula inferior (específicamente de la prominencia mandibular), la región lateral y baja de la cara, los bordes laterales de los labios y el paladar secundario (a partir de la prominencia maxilar). Modificado de Helms et al., 2005⁸.

El segmento central de la cara (que comprende la frente, las crestas supraorbitarias, nariz, *filtrum* y paladar primario) es derivado del proceso frontonasal. El segmento intermaxilar del proceso frontonasal es formado por la fusión de dos prominencias nasales medias. Este segmento intermaxilar origina el *filtrum* y la porción de la maxila que aloja al diente incisivo.⁷

Durante la quinta y sexta semanas del desarrollo intrauterino, el crecimiento medio de las prominencias maxilares, derivadas del primer arco branquial, resulta en la fusión de las prominencias nasales medias y maxilares para formar el labio superior y el alveolo anterior. La falta de fusión resulta en hendidura del labio y el alveolo.⁷

El paladar secundario se forma a través de la fusión de dos protuberancias de las prominencias maxilares, las hojas palatinas. Estas estructuras aparecen durante la séptima semana del desarrollo como una proyección vertical dentro de la cavidad oral sobre ambos lados de la lengua y se elevan de manera horizontal para después fusionarse y formar el paladar secundario (Fig. 2 A, B y C). Esta fusión inicia en el foramen incisivo, progresa hacia el paladar posterior y está completa alrededor de la doceava semana de vida intrauterina. La falla en la fusión resulta en paladar hendido.^{7, 8} La palatogénesis se considera completa alrededor de la semana 12 de gestación en el ser humano.⁹ Los procesos descritos para la formación normal del labio y paladar son controlados por la expresión de varios genes, los que serán discutidos en la sección 1.3.

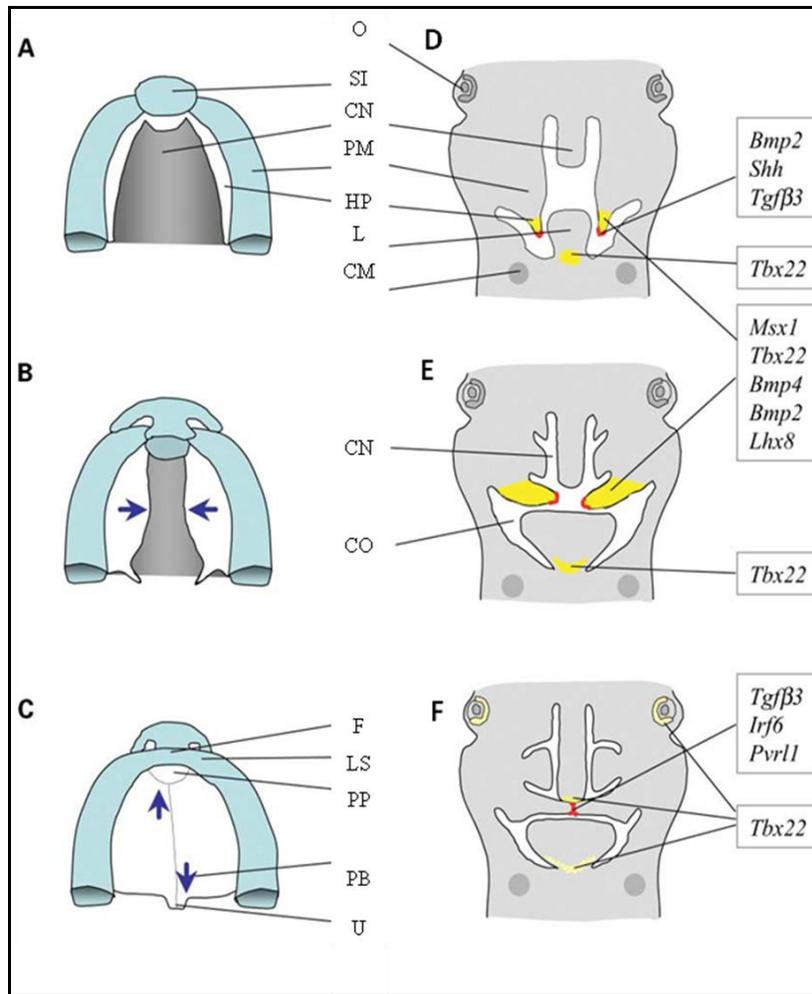


Figura 2. Etapas críticas en el desarrollo del labio y paladar. A) Secciones horizontales de la cabeza de un embrión de ratón a las 12.5 semanas de gestación (séptima semana en el humano). Las prominencias nasales se fusionan para dar origen al segmento intermaxilar (SI), mientras que las partes laterales del labio superior se forman a partir de las prominencias maxilares (PM). Las hojas palatinas (HP) también surgen de las prominencias maxilares y crecen de manera vertical en relación a la lengua (L). B) En el embrión murino de 13.5 sdg (octava semana en humanos), las hojas palatinas van por debajo del epitelio y se elevan en posición horizontal por encima de la lengua. Las flechas azules indican la posición del contacto y fusión inicial. C) A las 14.5 sdg (en el humano semana 9-10) el SI se convierte en el *filtrum* (F) del labio superior (LS) y el paladar primario (PP). Las hojas palatinas se han fusionado en dirección anterior y posterior (flechas azules), junto con el *septum* nasal. La osificación inicia en el paladar anterior. En las secciones coronales (D, E y F) se indican los sitios de expresión de algunos de los genes clave que participan en la palatogénesis: el sombreado amarillo corresponde a la expresión de *Tbx22*; el rojo indica el borde epitelial del paladar medio caracterizado por la expresión de *Tgfb β 3*. Modificado de Stanier y Moore, 2004⁹.

1.2.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL LPH

Las hendiduras orofaciales son los defectos congénitos craneofaciales más comunes. Las variaciones en la prevalencia a nivel mundial son de 3.4 a 22.9 por 10,000 nacimientos para labio hendido con o sin paladar hendido (LPH) y de 1.3 a 25.3 por 10,000 nacimientos para paladar hendido (PH). Es generalmente aceptado que estos defectos se presentan en aproximadamente 1 de cada 700 nacidos vivos. El LH está asociado con paladar hendido en 68% a 86% de los casos.⁶

Diferentes estudios reportan que la incidencia para LPH varía ampliamente dependiendo del grupo étnico y estado socioeconómico, siendo por ejemplo de 1 en 500 nacimientos en población asiática, 1 en 1,000 en caucásicos y 1 en 2,500 en africanos. La incidencia de paladar hendido (PH) es de 1 en 1,500 a 2,000 recién nacidos vivos.⁷

Aproximadamente entre 60 y 80% de los pacientes con LPH son masculinos, mientras que el PH, es más común en pacientes femeninos. El LPH unilateral es dos veces más común que el bilateral, y predominantemente afecta el lado izquierdo.¹⁰

En México, la incidencia de LPH se estima en 1.7 por 10,000 RNV⁴, con una prevalencia de 8.8 por 10,000 en RNV y una mortalidad neonatal baja, de 0.4 a 0.7%.^{3, 11} En el Hospital Infantil de México Federico Gómez, el LPH se encuentra registrado como la 13ª causa de solicitud de atención en consulta externa de primera vez, representando el 1.2% de todas las causas de solicitud de consulta otorgadas por la Institución en 2008-2009.¹²

1.2.3. CLASIFICACIÓN DEL LPH

En 1976 Tessier describió la clasificación de las fisuras orofaciales basándose en la anatomía de la cara. Se asignó un número a cada hendidura en base a su ubicación en relación a la línea media sagital (Fig. 3A). De acuerdo a su clasificación, la órbita es dividida en dos hemisferios, en la cual todas las estructuras que se encuentran por debajo del párpado inferior corresponden a fisuras faciales mientras que las que están por arriba del párpado superior se consideran fisuras craneales. El compromiso de las partes blandas y su relación con el componente óseo no siempre coinciden, pudiendo coexistir dos o más fisuras. Las fisuras faciales se enumeran del 0 al 14, correspondiendo las fisuras labiopalatinas a los números 1-2-3 de Tessier.¹³

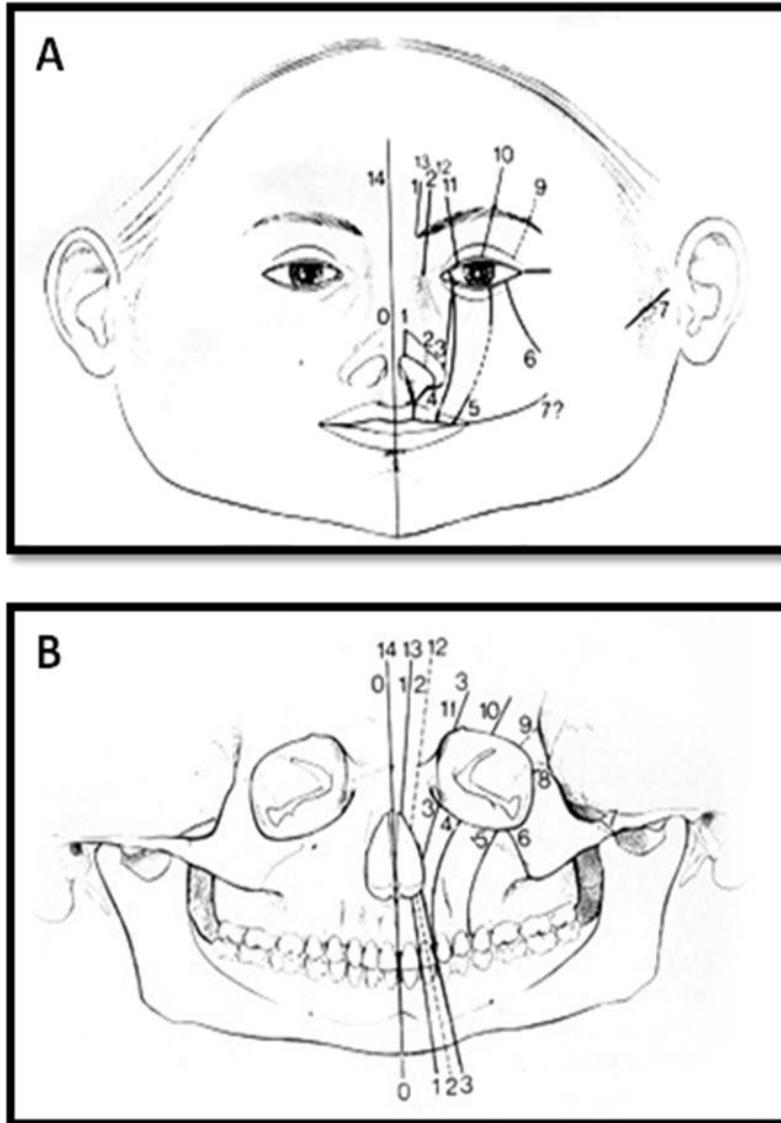


Figura 3. Clasificación anatómica de Tessier. Se muestran las fisuras orofaciales enumeradas del 0 al 14 con involucro de las partes blandas (A) y del componente óseo (B). Modificado de Tessier, 1976¹³.

Además de la clasificación de Tessier, existen otros sistemas específicos (Fig. 4) para clasificar el fenotipo de las hendiduras que afectan particularmente los labios y la cavidad oral.⁶

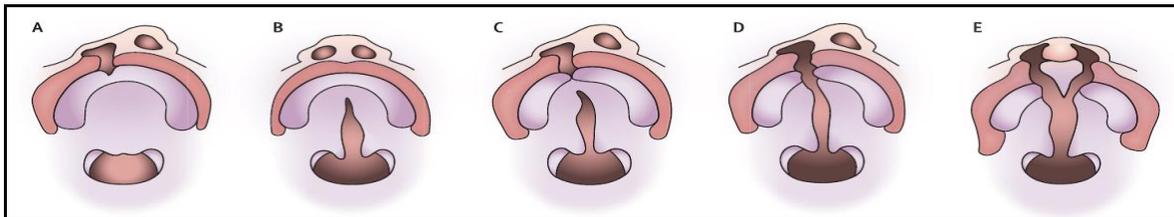


Figura 4. Clasificación del LPH. (A) Labio y alveolo hendido. (B) Paladar hendido. (C) Labio y paladar hendido unilateral incompleto. (D) Labio y paladar hendido unilateral completo. (E) Labio y paladar hendido completo. Tomado de Stanier y Moore, 2004⁹.

Aproximadamente 70% de los casos de LPH son no sindrómicos o aislados (LPHNS), las hendiduras ocurren sin estar asociadas a otras malformaciones. Cuando una o más anomalías adicionales están involucradas, el LPH se refiere como sindrómico o como formando parte de un síndrome conocido. Esta última situación es relevante porque puede estar relacionado con alteraciones cromosómicas (como la trisomía 13), síndromes monogénicos (como el síndrome de Stickler), efectos teratogénicos (ácido retinoico o diabetes gestacional) y otros.^{9, 15} Se estima que aproximadamente entre 14% a 30% de los casos de LPH es de presentación sindrómica, mientras que esta situación se presenta en 42% a 54% de los pacientes con PH.⁷

1.2.4. ETIOLOGÍA DEL LPHNS

Se considera que la etiología del LPHNS es multifactorial, es decir, es causado por la acción simultánea de múltiples factores genéticos y ambientales que actúan independientemente o en combinación para el desarrollo del defecto. Aunque las hendiduras orofaciales tienden a agruparse en familias, su herencia usualmente no es mendeliana. La concordancia en gemelos monocigotos es de 40% y en dicigotos de 4.2%, mientras que su heredabilidad es de 60%.¹⁶

La etiología de las alteraciones multifactoriales es compleja por los componentes genéticos y ambientales que participan. Las características de este tipo de herencia se han tratado de explicar a través del modelo del umbral. Este modelo propone que los individuos estarán afectados cuando se sobrepasa cierto número de unidades de predisposición o propensión, es decir, cuando se cruza un umbral. En cuanto al riesgo y grado de parentesco, se observa que al alejarse el grado de parentesco disminuye el riesgo para otros miembros de la familia, ya que los familiares en primer grado tienen 50% de genes en común y los de segundo sólo 25%. Por otra parte, la presencia de antecedentes familiares positivos para malformaciones, implican un mayor riesgo de recurrencia en la familia. Otra característica es que a mayor gravedad de la malformación, existe un mayor riesgo para los familiares del paciente de presentar la alteración. Si una malformación es predominante en un género, el riesgo de recurrencia será mayor para los familiares del paciente si éste es del género afectado menos frecuentemente.¹⁶

La influencia de los factores ambientales, tal y como son el tabaquismo materno, nutrición materna (vitaminas del complejo B y zinc), deficiencias o alteraciones en el metabolismo de los folatos, consumo materno de alcohol, anticonvulsivantes (diazepam, fenitoina y fenobarbital), infecciones virales, uso de vitaminas, corticoides, estatinas, y exposición a retinoides, es un campo ampliamente investigado en el desarrollo de las hendiduras del labio y paladar, demostrándose asociación entre la exposición a estos factores y la presentación de la alteración.^{6, 7, 17, 18, 19, 20}

Diversos estudios han demostrado que la deficiencia de folatos causa hendiduras en modelos animales y que el uso de los medicamentos antagonistas de folatos se asocia con un riesgo incrementado de hendiduras orofaciales en humanos.^{21, 22} En la mayoría de los estudios, se ha asociado el consumo materno de suplementos multivitamínicos en etapas tempranas del embarazo con la disminución en el riesgo de hendiduras orofaciales; en un metaanálisis sobre el consumo de multivitaminas fue asociado con una reducción de 25% en la prevalencia de hendiduras orofaciales.⁶ Sin embargo, los resultados son controversiales, ya que por ejemplo algunas evidencias reportan una disminución de estas alteraciones en USA, pero no en Canadá ni en Chile.²³⁻²⁷

La vitamina B6 (piridoxina) es un cofactor en el metabolismo de la homocisteína y reduce la ocurrencia de hendiduras orofaciales en animales.⁶ Así como también algunos biomarcadores de un estado pobre de vitamina B6 están asociados con incremento en el riesgo de hendiduras orofaciales en Holanda, Filipinas y Asia.⁶

1.3. BASES MOLECULARES DEL LPH

Como se ha mencionado, la etiología del LPH es extremadamente compleja y está asociada tanto con factores genéticos como ambientales. Una variedad de genes han sido implicados en el desarrollo del primordio facial y el control de la palatogénesis normal. Estos genes controlan el desarrollo embrionario a través de una cascada de señalización compleja y ejercen su acción por ejemplo en los patrones de migración celular y fusión de estructuras. Incluyen genes que codifican moléculas de matriz extracelular, moléculas de señales polarizantes, factores de transcripción, factores y receptores de crecimiento y moléculas de adhesión celular. Alteraciones en la expresión de estos genes pueden resultar en hendiduras orofaciales. (Fig. 2 y Tabla 1).^{9, 17, 28}

Tabla 1. Principales genes requeridos para la morfogénesis craneofacial del ratón. Modificado de de Stanier et al., 2004⁹.

Señales polarizantes	<i>Shh, Bmp2, Bmp4 and Bmp7, Wnt5a, Smad2–4</i>
Factores y receptores de crecimiento	<i>Egf, Egfr, Tgfa, Tgfβ1–3, Fgf1, Fgf2, Fgf8, Fgfr1, Fgfr2</i>
Factores de transcripción	<i>Ap2a, Dlx1–6, Gli2–3, Hoxa2, Irf6, Lhx8, Pax9, Pitx1, Pitx2, Prx1, Msx1, Tbx1, Tbx22</i>
Moléculas de adhesión celular	<i>Pvrl1, Connexina 43, E-caderina</i>
Matriz extracelular	<i>Col2A1, Col11A1 and Col11A2, Mmp2, Mmp3, Mmp9, Mmp13, Timp1–3, Fibronectina</i>

En modelos murinos se ha demostrado que Pdgf-c, miembro de la familia de factores de crecimiento derivados de plaquetas, regula el desarrollo de las estructuras craneofaciales, siendo una de las vías propuestas en la palatogénesis.²⁹

Por otra parte, es posible que el desarrollo orofacial pueda estar regulado a través de otros mecanismos como son los microRNA (miRNAs), por ejemplo Mirn140 que regula la señalización del receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas (Pdgfra) el cual a su vez participa en la migración de las células de la cresta neural hacia el ectodermo oral y se ha propuesto la alteración de ésta vía de señalización como un mecanismo para el desarrollo del paladar hendido durante la embriogénesis animal (pez cebra).^{30,31}

Otro punto importante a considerar en la etiología del LPH son varios polimorfismos genéticos que han sido investigados en estudios de asociación en diferentes poblaciones. Algunos productos génicos son factores de crecimiento (FGFA, TGF β 3), factores de transcripción (MSX1, TBX22), factores con función en la respuesta inmune (PVRL1, IRF6) o enzimas involucradas en el metabolismo de nutrientes (MTHFR, MTR y RARA).⁶ Ha sido controversial la asociación entre los polimorfismos de genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo de folatos tal y como son *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* y la presencia de LPH³²⁻³⁵, así como su interacción con el consumo materno de folatos.^{36,37}

Recientemente se realizó un trabajo de tesis en el HIMFG sobre la frecuencia del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en 32 pacientes mexicanos y sus madres, encontrando una frecuencia de heterocigotos (CT) de 50% y de homocigotos (TT) de 43.75% en pacientes con LPH; en cuanto a las madres de estos pacientes, el genotipo homocigoto mutado (TT) fue el más frecuente, 46.87%.³⁸ En esta misma línea, otro trabajo de tesis analizó 27 pacientes y no se observó una asociación del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* con el LPHNS.

1.4. ENZIMA METIONINA SINTASA

La *N*-5-metiltetrahidrofolato homocisteína metiltransferasa dependiente de vitamina B12 (Metionina sintasa; MS) es una enzima que cataliza la metilación de homocisteína a metionina. La MS es inactivada por la oxidación de la vitamina B12, su cofactor esencial, y es reactivada por metionina sintasa reductasa (MTRR), la cual cataliza la remetilación reductiva de la cobalamina.⁴⁰

La homocisteína es un aminoácido que contiene sulfuro generado como un producto intermedio en el metabolismo de metionina y que se encuentra en la intersección de dos vías metabólicas: metilación y transulfuración (Fig. 5).⁴¹

El metabolismo de la homocisteína involucra tres enzimas claves: cistationina β -sintasa (CBS), metionina sintasa y 5-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), así como cofactores: folatos, vitamina B₆ y B₁₂. Las reacciones bioquímicas implicadas en el procesamiento de homocisteína son bien conocidas. La homocisteína puede ser condensada con serina para formar cistationina por la enzima CBS o puede ser metilada para formar metionina, mediante la homocisteína metiltransferasa dependiente de betaina y MS.⁴²

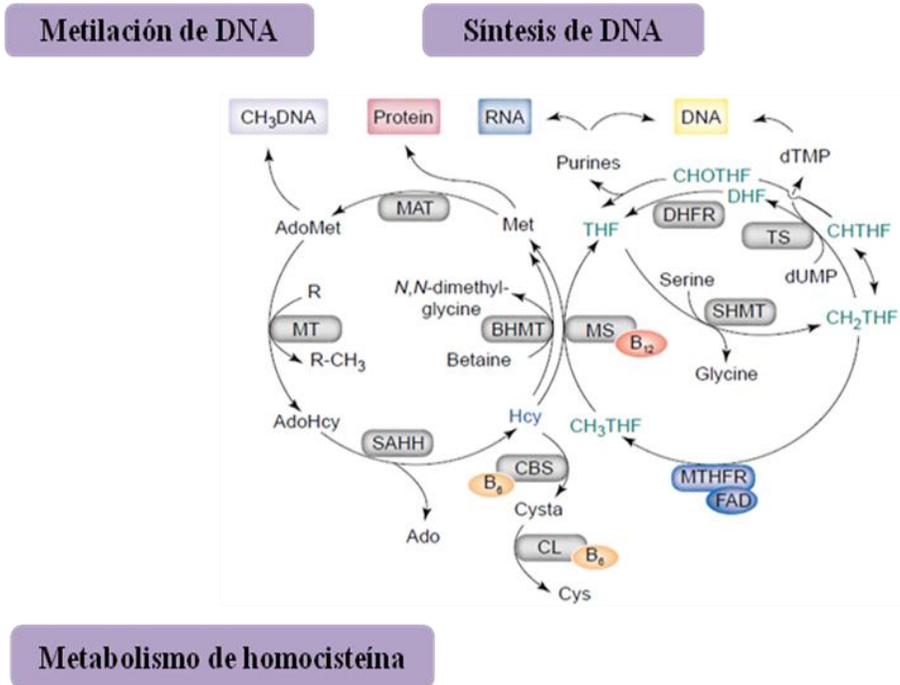


Figura 5. Formación, remetilación y transulfuración de homocisteína (Hcy). La Hcy es formada a partir de S-adenosilhomocisteína (AdoHcy). La remetilación a metionina (Met) es catalizada por la metionina sintasa (MS), la cual requiere cobalamina (B12) como un cofactor y 5-metiltetrahidrofolato (CH3THF) como sustrato. CH3THF es formado por la acción de la enzima 5, 10-metilenetetrahidrofolato reductasa (MTHFR) dependiente de dinucleótido de flavina adenina (FAD), la cual reside en una región metabólica crucial que dirige el conjunto de folatos (en letras verdes) para la remetilación de Hcy a expensas de los folatos utilizados para la biosíntesis de DNA y RNA. Abreviaciones: Ado, adenosina; AdoMet, S-adenosilmetionina; BHMT, betainhomocisteína S-metiltransferasa; CBS, cistationina β -sintasa; CH2THF, 5,10-metiltetrahidrofolato; CH3DNA, DNA metilado; CHOTHF, formiltetrahidrofolato; CHTHF, metiltetrahidrofolato; CL, cistationina liasa; Cys, cisteína; Cysta, cistationina; DHF, dihidrofolato; DHFR, dihidrofolato reductasa; dTMP, deoxitimidina 5'-monofosfato; dUMP, deoxiuridina 5'-monofosfato; MAT, metionina adenosiltransferasa; MT, metiltransferasa; SAHH, S-adenosilhomocisteína hidrolasa; SHMT, serina hidroximetiltransferasa; THF, tetrahidrofolato; TS, timidilato sintasa. Modificado de Ueland et al., 2001⁴¹.

La conversión de homocisteína a metionina catalizada por MS requiere 5-metiltetrahidrofolato (CH₃THF) como donador de grupos metilo y utiliza cobalamina (B12) como cofactor. Esta vía sugiere que los niveles de homocisteína podrían estar elevados por defecto en la reacción catalizada por MS. Se ha demostrado que mutaciones en el gen *CBS* y el polimorfismo C677T del gen *MTHFR* causan un incremento en los niveles plasmáticos de homocisteína. Debido a que las enzimas CBS, MTHFR y MS, involucradas en la conversión de homocisteína a otros metabolitos, es probable que mutaciones o polimorfismos en el gen *MTR* causen un incremento de los niveles plasmáticos de homocisteína.⁴²

La hiperhomocisteinemia ha sido relacionada con enfermedad arterial coronaria y se ha demostrado que constituye un factor de riesgo para las mujeres de tener hijos con defectos del tubo neural (DTN).³⁶

Si bien la fisiopatología no está completamente entendida, se han demostrado que las concentraciones elevadas de homocisteína pueden ser tóxicas para las células endoteliales vasculares. Se ha postulado que la hiperhomocisteinemia observada en madres de hijos con DTN puede ser resultado de un defecto en la conversión de homocisteína a metionina.⁴² En otro estudio se reportó la presencia de concentraciones séricas elevadas de homocisteína (parcialmente determinadas por el estado de folatos) en madres de niños con LPH.³⁶

Por otra parte, la metionina es el precursor de S-adenosilmetionina, el donador universal de grupos metilo, el cual provee un grupo metilo en más de 100 reacciones, incluyendo la

metilación de DNA. El metabolismo de los folatos está ampliamente implicado en la metilación del DNA. Los folatos y las vitaminas del complejo B, funcionan como coenzimas en la transferencia de un solo carbón en el metabolismo de aminoácidos y ácidos nucleicos. El ácido fólico (ácido pteroilmonoglutámico o PGA) es la forma más oxidada y estable de los folatos.⁴³

El folato es requerido en la forma de 5-metiltetrahidrofolato para la remetilación de la homocisteína. En el metabolismo de los folatos, las vitaminas B2 y B6 funcionan como cofactores cruciales para la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y serina hidroximetiltransferasa, respectivamente; la MTHFR cataliza la conversión irreversible de 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato.⁴⁴

Los defectos en la actividad de MS pueden desempeñar un papel importante en la formación de tumores y se ha postulado que el metabolismo alterado de la metionina puede estar relacionado con la hipometilación de DNA, comúnmente observada en células cancerosas.⁴⁵

1.5. GEN *MTR*

El gen *MTR* (5-metiltetrahidrofolato-homocisteína S-metiltransferasa) es responsable de la codificación de la enzima metionina sintasa. Se localiza en 1q43 y se expanden 108.67kb. La longitud de su transcrito es de 10,529pb y codifica un polipéptido de 1,265 aminoácidos (Fig. 6).^{42, 46}

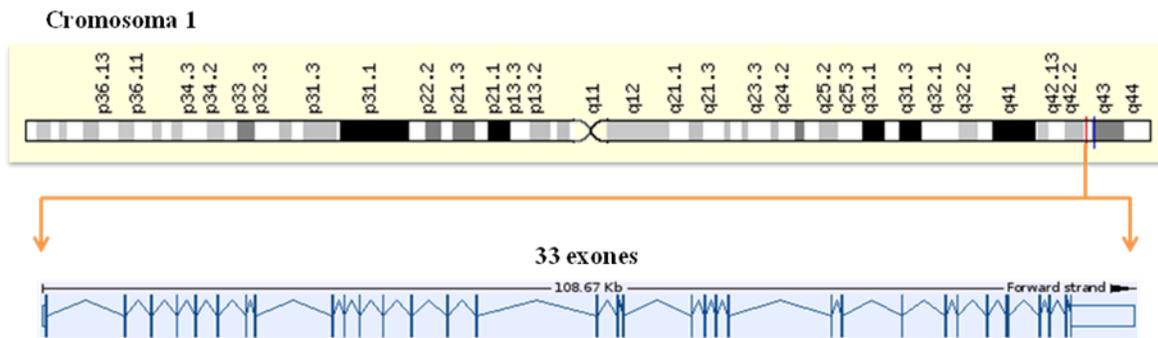


Figura 6. Locus y estructura del gen *MTR*. Modificado de www.ensembl.org

La región codificante del gen *MTR* está compuesta de 33 exones y 32 intrones. La secuencia de nucleótidos en los sitios de corte y empalme y el tamaño aproximado de cada intrón se resumen en la tabla 2. Todos los intrones, excepto el intrón 21, siguen la regla GT-AG. El ATG inicial está en el exón 1.⁴⁷

Tabla 2. Secuencia de nucleótidos en los sitios de corte y empalme y el tamaño aproximado de cada intrón. Los nucleótidos están enumerados a partir del sitio de inicio de la traducción. Las letras mayúsculas se refieren a la secuencia codificante y las minúsculas indican secuencias intrónicas. ND: no determinado. Modificado de Watkins et al, 1989⁴⁷.

Exon	Posición	5' donador de corte y empalme	Intrón	Tamaño kb	3' aceptor de corte y empalme
1	-394 to 34	TCGCAACCCGgtaacgctgc	1	4.0	ttctttaaagAAGGTCTGAA
2	35-249	AATCCATAAGgtaaagtatt	2	2.4	ctgttgcagGAATACCTTGC
3	250-339	TGAACACTTGgtaagaattc	3	2.4	gatacgttagGCCTACCGGA
4	340-409	TGAACACTTGgtaagaattc	4	1.7	tttcccaaagGAATTAAGAG
5	410-502	AGGAACATCAgtgagtattt	5	2.0	ttttttgcagCATTTGATGA
6	503-609	CAATGCCAAGgtgagttaag	6	2.7	tccctgacagGTAGCCTTGT
7	610-669	GCCTATCTTTgtaagtcta	7	.7	gtcaattcagATTTACAGGGA
8	670-764	AACCACTCTGgtgagtgatc	8	~3.5	gtttttctagCATTGGATTA
9	765-865	AACCACTCTGgtgagtgatc	9	1.1	ctttactcagGTCTTCCCAA
10	866-927	GCACCTAAAGgtcaggggctc	10	1.5	ctaaatgcagGATTTTGCTA
11	928-995	ATCATATCAGgtcaggggctc	11	2.2	ttcaactcagGGAAATTGCT
12	996-1075	TTACTGTCTGgtgagtgcata	12	2.5	tccttttaagGTCTAGAGCC
13	1076-1188	AACTATGAAAGgtgagtgggt	13	3.0	cttccctcagGAAGCCTTGT
14	1189-1329	CATCGCAAAGgttatacaaaa	14	2.5	ctgatctcagGTACCTTTGT
15	1330-1515	AGAAGGACAgtgagtgggt	15	ND	ttttccctagGCAACAGAAA
16	1516-1695	AGTCATTAAGtaagtgttag	16	2.0	tttttccagGAAACATTAC
17	1696-1812	TGCAATCAAGgtatggtaga	17	.3	tgcccttagTCTGGCATGG
18	1813-1953	TTATGCCCAAGgtagagagac	18	4.5	ttcaattcagACTCAAGGCA
19	1954-2043	CCTTGTGAAGgtaagttaca	19	1.3	tccttttagGGCATTGAAA
20	2044-2196	TCTACCTCAGgttagcaaaa	20	.9	ttttctcagGTTATAAAGT
21	2197-2304	AGAAGAAGAGgcaagtcatt	21	1.0	tccttccagGACCCTTACC
22	2305-2405	ATAATTTCCGgtaagttagg	22	~3.0	tggtccctcagAGTTATTGAT
23	2406-2473	CACAAAGCAGgtactgtgca	23	.9	aaaaaaatagATATAATTGG
24	2474-2594	CCACTTCAAAGtaagttata	24	6.0	ttcttttagAACCCACACA
25	2595-2676	TGTGGTGGTgtaagtgggt	25	ND	gcattttcagTGTTCCCAGC
26	2677-2775	GTCTCTCAAGgtaagtggta	26	2.5	tttttaacagGAGAGGAGAT
27	2776-2851	CCTCACCCAGgtctgtttgg	27	1.0	tctcctgtagTGAAGCCAC
28	2852-3007	AAAACAGTAGgttagtgcag	28	1.8	tttctaataagGTGGAGAGGC
29	3008-3204	AAGGCAACAgtatggaagg	29	2.5	tggttttaagGCTGAGAAGG
30	3205-3405	GCTGGCAGAgttaaggcaga	30	.8	gggtcccaagGCCTTTGCAG
31	3406-3598	CAGTCTACAGgttaggaagcc	31	1.4	ctccctcagGCATTAGGTT
32	3599-3711	CAAGGATCAGgtaagctagc	32	.5	tcctttgcagGTTGAGGATT
33	3712-				

Todas las mutaciones identificadas a la fecha son mostradas en la figura 7 y resultan en la deficiencia de metilcobalamina (cblG), la cual está caracterizada por homocistinuria, hiperhomocisteinemia e hipometioninemia. La secuenciación de *MTR* demostró la existencia de polimorfismos no asociados con cblG. Algunos de estos polimorfismos fueron detectados en múltiples líneas celulares, incluyendo R1164R, L1192L, A1048A, P283P y D919G.⁴⁷

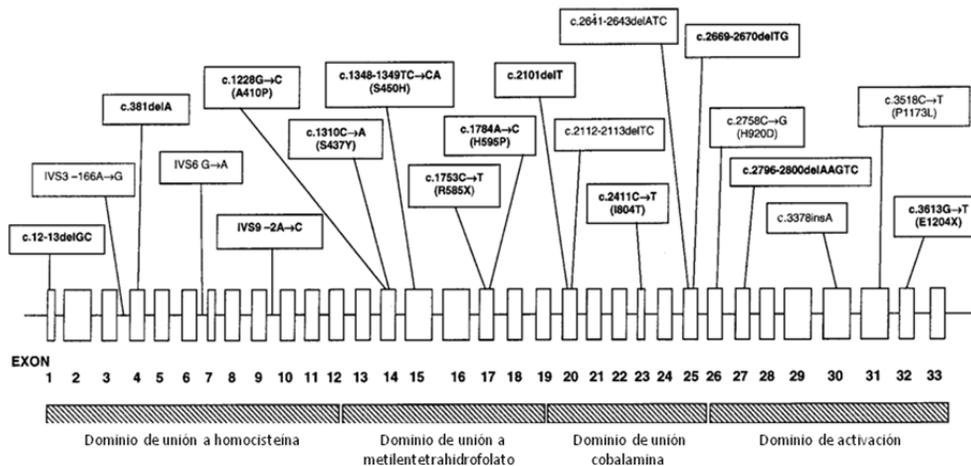


Figura 7. Mutaciones identificadas en el gen *MTR*. Las mutaciones se localizan a lo largo de todo el gen. Se ilustran los cuatro dominios de unión y activación. Modificado de Ref. 47.

1.6. POLIMORFISMO A2756G DEL GEN *MTR*

Una variante común de *MTR* que consiste en una transición de adenina a guanina en la posición 2756 (A2756G) y conduce a un cambio de ácido aspártico por glicina en el codón 919 (D919G) (Fig. 8), fue identificada como un polimorfismo ya que se observó en 8 de 52 alelos control (15%).⁴¹ Aunque el impacto funcional directo de este polimorfismo no ha sido bien establecido, hay evidencias inconsistentes de su asociación con hiperhomocisteinemia.^{51, 52}

```
3001 AGTTAAAATAGCTCCGAGATACAGTGCACCTGTAATCCATGTCCTGGACGCGTCCAAGAG
2607 AGTTAAAATAGCTCCGAGATACAGTGCACCTGTAATCCATGTCCTGGACGCGTCCAAGAG
869 --V--K--I--A--P--R--Y--S--A--P--V--I--H--V--L--D--A--S--K--S

3061 TGTGGTGGTGTGTTCCAGCTGTTAGATGAAAATCTAAAAGGATGAATACTTTGAGGAAAT
2667 TGTGGTGGTGTGTTCCAGCTGTTAGATGAAAATCTAAAAGGATGAATACTTTGAGGAAAT
889 --V--V--V--C--S--Q--L--L--D--E--N--L--K--D--E--Y--F--E--E--I

          A2756G
3121 CATGGAAGAATATGAAAGATATTAGACAGGACCATTATGAGTCTCTCAAGGAGAGGAGATA
2727 CATGGAAGAATATGAAAGATATTAGACAGGACCATTATGAGTCTCTCAAGGAGAGGAGATA
909 --M--E--E--Y--E--D--I--R--Q--D==H==Y--E--S--L--K--E--R--R--Y

          D919G

3181 CTTACCCTTAAAGTCAAAGCCAGAAAAAGTGGTTTCCAAATGGATTGGCTGTCTGAAACCTCA
2787 CTTACCCTTAAAGTCAAAGCCAGAAAAAGTGGTTTCCAAATGGATTGGCTGTCTGAAACCTCA
929 --L--P--L--S--Q--A--R--K--S--G--F--Q--M--D--W--L--S--E--P--H

3241 CCCAGTGAAGCCACGTTTATTGGGACCCAGGTCTTTGAAGACTATGACCTGCAGAAGCT
2847 CCCAGTGAAGCCACGTTTATTGGGACCCAGGTCTTTGAAGACTATGACCTGCAGAAGCT
949 --P--V--K--P--T--F--I--G--T--Q--V--F--E--D--Y--D--L--Q--K--L
```

Figura 8. Secuencia parcial del gen *MTR*. Se muestra la ubicación del polimorfismo A2756G en el exón 26 y el cambio de ácido aspártico (D) por glicina (G) en el aminoácido 919. Modificado de www.ensembl.org

La distribución del polimorfismo A2756G del gen *MTR*, la cual fue inicialmente descrita en población caucásica, varía en diferentes grupos étnicos. Aproximadamente el 3% de los europeos tiene el genotipo GG⁵¹, en Norteamérica se reporta una frecuencia de 1-5%^{53,54} y en afroamericanos se encuentra en 6%⁵⁵. Un estudio canadiense reportó una frecuencia de 10 a 11% en niños y sus madres caucásicas^{56, 57}. En poblaciones chinas, japonesas y coreanas el genotipo GG es reportado en 2-3%.^{52,58,59}

El polimorfismo A2756G de *MTR* en línea germinal, cuyo producto desempeña un papel importante en el mantenimiento intracelular de los niveles de S-adenosilmetionina (SAM), puede afectar la metilación del DNA.^{60, 61} Se ha demostrado que el genotipo GG está asociado tanto con hipometilación genómica global como con niveles bajos de islas CpG hipermetiladas dentro de los promotores de genes supresores de tumor en individuos con cáncer de colon, mama y pulmón.⁶²

Por otra parte, algunos estudios sugirieron que el polimorfismo podría ser responsable del incremento en los niveles de metionina y SAM. De acuerdo a esta hipótesis, la variante de *MTR* podría contribuir a la hipermetilación del DNA y por lo tanto al silenciamiento génico.^{63, 64} Estos estudios indican un papel crucial de dicho proceso y demuestran que la metilación del DNA podría ser alterada por variantes polimórficas de genes que codifican proteínas importantes en el ciclo de folatos y metionina.⁶⁵

Se ha reportado que el polimorfismo materno A2756G de *MTR* es un factor de riesgo significativo para tener hijos con espina bífida y síndrome de Down.^{66, 67} La presencia del polimorfismo en forma heterocigota (AG) está asociado con un incremento en las

concentración plasmática de homocisteína en individuos con síndrome de Down en población brasileña.⁶⁸

También se ha sugerido que la presencia de LPH en niños de madres con el polimorfismo A2756G de *MTR* con genotipo GG, podría ser un resultado de la hipometilación del DNA, ya que puede cambiar la expresión de los genes involucrados en la formación de estructuras craneofaciales. Además, la influencia negativa de la hipometilación del DNA sobre el desarrollo podría ser resultado de la inducción de inestabilidad cromosómica, reactivación de transposones y pérdida de la impronta.⁶²

El estudio de Mostowska et al., 2006 reveló diferencias significativas en las frecuencias genotípicas y alélicas de A2756G *MTR* entre madres casos (madres de hijo con LPH) y controles. Observando además, que las mujeres portadoras de genotipo GG tienen un incremento en el riesgo de 2.195 veces para tener un hijo con LPH. La determinación del mecanismo exacto por medio del cual este polimorfismo puede afectar el desarrollo craneofacial y sus efectos sobre la metilación del DNA no se conoce aún pero podría aportar conocimiento importante acerca de la etiología de las hendiduras orofaciales.⁶⁹ Por otra parte, se ha reportado que los polimorfismos C677T de *MTHFR*, A66G de *MTRR* y A2756G de *MTR* no están involucrados en pacientes estudiados con LPH en población brasileña.⁷⁰ Si bien la determinación del mecanismo exacto por medio del cual el polimorfismo A2756G del gen *MTR* puede afectar el desarrollo craneofacial no está completamente entendido, algunos estudios de la estructura enzimática realizados sobre MS de pacientes con alteraciones de folato/cobalamina (*cblG*), han demostrado que la variante cae en el dominio de activación de la enzima.⁴⁷ Se ha postulado que el cambio de ácido

aspártico por un residuo de glicina podría afectar la estructura secundaria de la proteína y por lo tanto tener consecuencias funcionales, quizá conduciendo a niveles alterados de vitamina B₁₂, folatos y homocisteína.⁷¹

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la frecuencia del polimorfismo A2756G de *MTR* en pacientes con labio hendido con o sin paladar hendido no sindrómico y en sus madres en el periodo de 2007 a 2008 en el Hospital Infantil de México Federico Gómez?

III. JUSTIFICACIÓN

El LPHNS representa una de las causas más frecuentes de malformaciones congénitas y la primera en los defectos craneofaciales. El componente etiológico es multifactorial y complejo, existiendo una interacción genoma-ambiente. Se ha reportado la asociación de polimorfismos en genes involucrados con el metabolismo del ácido fólico y homocisteína, como el gen *MTR*, y la presencia de LPHNS. La determinación de la frecuencia del polimorfismo A2756G del gen *MTR* en población mexicana contribuirá a esclarecer si este factor genético, en la madre y/o el producto hace que este último sea más susceptible de presentar LPHNS.

IV.OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Describir la frecuencia del polimorfismo A2756G del gen *MTR* en un grupo de pacientes con LPHNS y sus madres en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

4.2. Objetivos particulares

- Analizar las características clínicas (fenotipo) y epidemiológicas de la población en estudio.
- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo en la población estudiada.
- Describir si la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.
- Establecer si existe una relación entre el genotipo y el fenotipo de los pacientes.

V. MATERIAL Y METODOLOGÍA

5.1. Diseño del estudio

Estudio de tipo observacional, descriptivo y transversal.

5.2. Variables de estudio

Las variables de estudio fueron las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo A2756G del gen *MTR* en los pacientes y sus madres, y la presencia de LPHNS.

5.3. Muestra

Los individuos que participaron en este estudio fueron pacientes y sus madres que acuden al servicio de Genética y a la Clínica de Labio y Paladar Hendido del Hospital Infantil de México Federico Gómez, con diagnóstico de LPHNS. La muestra fue de 33 pacientes y sus madres provenientes de diferentes estados de la Republica Mexicana y el Distrito Federal. Los participantes forman parte del protocolo (HIM-012-2007) “Frecuencia del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* y niveles de homocisteína en pacientes con cardiopatías congénitas y pacientes con labio hendido con o sin paladar hendido no sindrómicos”, que se lleva a cabo por parte del Departamento de Genética del HIMFG y cuya responsable es la Dra. Constanza García Delgado, aprobado por los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad del HIMFG. Estos pacientes han sido previamente analizados para la presencia del polimorfismo C677T *MTHFR*.^{38,39}

5.4. Criterios de selección

5.4.1. Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico de LPHNS y sus madres que reciben atención en el Hospital Infantil de México Federico Gómez
- Aceptaron participar en el estudio bajo una carta de consentimiento informado.

5.4.2. Criterios de exclusión

- Individuos con diagnóstico de labio hendido con o sin paladar hendido sindrómico.
- Individuos que no aceptaron participar en el estudio.
- Individuos hijos de madre diabética.
- Ingesta materna de fármacos potencialmente teratógenos durante el embarazo.
- Individuos con antecedente de transfusiones sanguíneas recientes.

5.4.3. Criterios de eliminación

- Pacientes cuyas muestras sanguíneas fueron insuficientes
- DNA inadecuado para la realización del estudio.

5.5. Análisis clínico

Los pacientes ya habían sido incluidos en el protocolo para determinar la frecuencia del polimorfismo C677T de *MTHFR* en 2007 y 2008. Acudieron a consulta y a entrega de resultados del polimorfismo anterior y según lo autorizado por el Comité de Investigación, Ética y Bioseguridad, se invitó a participar en el nuevo estudio para el polimorfismo A2756G del gen MTR, para lo cual se explicó que se contaba con muestra de DNA y sólo fue necesaria la toma de una muestra nueva en un caso. Posterior a la aceptación y nueva firma de consentimiento informado, se actualizaron y se confirmaron los datos de la historia clínica, haciendo énfasis en los antecedentes heredofamiliares y consumo de micronutrientes antes y durante el embarazo (Fig. 9).

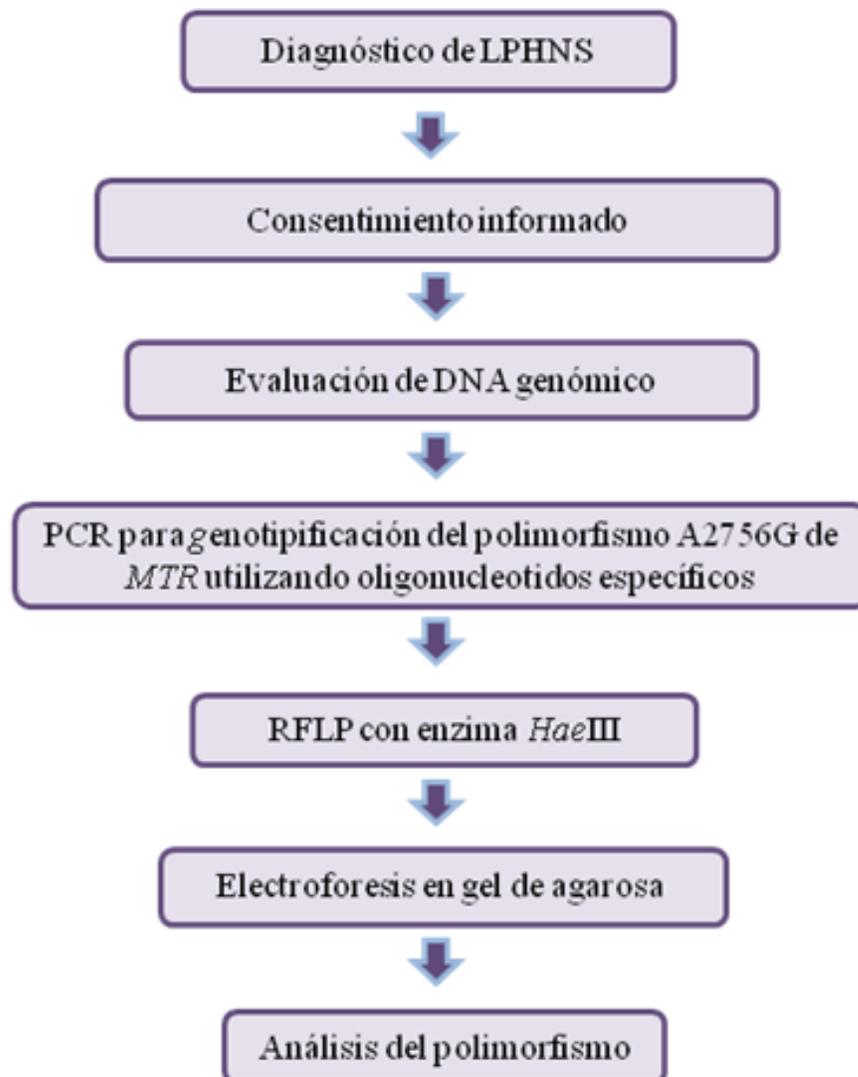


Figura 9. Descripción del procedimiento realizado para identificar el polimorfismo A2756G del gen *MTR*.

5.6. Evaluación del ADN genómico

La extracción de DNA genómico se llevo a cabo por el método de lisis celular con detergentes aniónicos, utilizando el kit Genra Puregene Blood de QIAGEN[®]. Se confirmó su adecuada calidad y cantidad para realizar la determinación del polimorfismo (anexo I).

5.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se realizó PCR (anexo 2) utilizando los oligonucleótidos referidos por Biselli ⁶⁸ (Tabla 3). La secuencia y tamaño del producto de PCR fueron confirmados en las bases de datos de Ensamble (ENSE00000961552, Fig. 10.) y se modificaron las condiciones de la reacción para mejorar la amplificación, mediante 35 ciclos (Tabla 4 y 5). Se amplificó un fragmento de 498pb del exón 26 que incluye al polimorfismo A2756G.

Intrón 25-26
 ttttattgggggttggtcacataggccagaatgccatgtgtctagccttaattggttca
 gtcttcagtcctctgcagaggtcaaacataagcatgagcgaaggccccaccataaatca
 gactgttagcataaacgatgtgacgtggc**ccaggggtgccaggtatacag**tgactctctta
 tcaggcaggctgtccaagggtttagagtttgtctcccagaaaccagtcaaag**ggcc**agtc
 ccttctttggcttgtgcagggttgaacatccaagcccactgagtttaccttttctctgc
 acgccaggcaggaattagcacagttggtgaagggagaagaaatgaagttaaggaagcctt
 cctgaaggaggtgttatcagcattgaccactacaccagttttatcatcttttgctca
 tctatggctatcttgcattttcag

Exón 26
 TGTTCCCAGCTGTTAGATGAAAATCTAAAGGATGAATACTTTGAGGAAATCATGGAAGAA
 TATGAAGATATTAGACAG**GAC**CATTATGAGTCTCTCAAG

Intrón 26-27
 gtaagtggtagaaacagatTTTTgcttgtTTTTaatgtgactgtTTTTatgatcctagt
 tTTaatgtgactTTTTaaat**ggTTTTgaggagtgtaaaaggc**ttggatcattttaga
 gaatttctgtcttctagttcaaatacagaggtcttcagtgcttaagttcccaaataatt
 ttggttgattgaaatgaattttatttattcagccaaacatttactgggtaccagtagg
 tgttagggctgtgctagatatcagaactatggtaatgaataaaacatgagttcatactc

Figura 10. Secuencia del exón 26 y las regiones intrónicas adyacentes de *MTR*. Los oligonucleótidos específicos se muestran sombreados en amarillo (sentido) y en azul (antisentido). En el rectángulo negro se señala el sitio de restricción constitutivo para la enzima *Hae*III. El polimorfismo A2756G se señala en el rectángulo rojo (GAC que codifica para ácido aspártico). Modificado de www.ensembl.org

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados.

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño (pb)	%GC	Tm (°C)
Sentido	5'CCAGGGTGCCAGGTATACAG3'	20	60	60
Antisentido	5'GCCTTTTACTCCTCAAACCC3'	22	46	59

Tabla 4. Condiciones de la PCR.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final para una reacción (μ l)	Volumen final para 73 reacciones (μ l)
Amortiguador	10 X	1 X	2.5	182.5
<i>Taq</i> DNA polimerasa	5 U/ μ l	1 U	0.2	14.6
Oligonucleótido Sentido	10 pmol/ μ l	7.5 pmol	0.75	54.75
Oligonucleótido Antisentido	10 pmol/ μ l	7.5 pmol	0.75	54.75
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5	14.6
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75	54.75
Mezcla maestra	-	-	5.45	397.85
DNA	50ng/ μ l	50ng	1	-
H ₂ O	-	-	18.55	1354.15
Volumen final			25	

Tabla 5. Descripción de los ciclos de la PCR.

	Fase	Temperatura (°C)	Tiempo
	Desnaturalización inicial	94	4 minutos
35 ciclos	Desnaturalización	94	40 segundos
	Alineamiento	60	40 segundos
	Extensión	72	40 segundos
	Extensión final	72	40 segundos

Posteriormente los productos de cada reacción se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 2%, para lo cual se colocaron 10 μ l de cada producto de la reacción y se realizó un corrimiento por 60 minutos a 100volts. Se visualizaron bajo luz UV en el equipo Gel Logic 440 para valorar la integridad del ADN y se tomó registro fotográfico (Fig. 13).

5.8. Análisis del polimorfismo A2756G del gen MTR

Se realizó mediante la técnica de RFLP (fragmentos de restricción de longitud polimórfica). La enzima de restricción utilizada para el presente trabajo fue *HaeIII*, la cual reconoce la secuencia 5'-GG↓CC-3' generando un fragmento de 85pb (sitio de restricción constitutivo) y otro de 413pb (Fig. 10). El segundo sitio de restricción solo se presenta cuando existe la presencia del alelo G en el polimorfismo A2756G de *MTR*, generando los fragmentos de restricción como se muestra en la Fig. 13. Las condiciones para la reacción de restricción se muestran en las tablas 6 y 7.

Tabla 6. Condiciones para la reacción de restricción con *HaeIII*.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final para una reacción (μ l)	Volumen final para 66 reacciones (μ l)
Amortiguador	10 X	1 X	2.5	165
<i>HaeIII</i>	10 U/ μ l	2 U	0.2	13.2
H ₂ O	-	-	7.3	481.8
Producto de PCR	-	-	15	-
Volumen final	-	-	25	-

Tabla 7. Condiciones para la incubación

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo
Incubación	37	3 horas
Inactivación	65	20 minutos
Mantenimiento	4	.

Posteriormente se colocaron $20\mu\text{l}$ de cada muestra en los pozos correspondientes de un gel de agarosa al 4% para ser sometidos a electroforesis durante 180 minutos a 100 volts y obteniendo los fragmentos esperados de acuerdo a la presencia o ausencia del sitio de corte, visualizados bajo luz UV.

De encontrarse el sitio de restricción presente para *HaeIII*, en el caso de un individuo homocigoto silvestre (AA), la restricción originaría 1 fragmento de 413pb y de 85pb (Fig. 11). En el caso de un individuo heterocigoto AG, los fragmentos de la reacción serían 413pb, 290pb, 123pb y el de 85pb.

De ser un individuo homocigoto para el alelo mutado (GG), los fragmentos de la reacción serían de 290pb, 123pb y 85pb (Fig. 12). Los posibles resultados de la restricción se presentan en la Figura 13.

A2756G MRT digest

Enzymes: *HaeIII*

Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
413	<i>HaeIII</i>	86	none	498	CCAGTCCCTT CTTGGCTTG TGCAGGGTTT GAACATCCCA AGCCCACTGA GTTTACCTTT TCCTGCACGC CAGGCAGGAA TTAGCACAGT TGGTGAAGGG AGAAGAAATG AAGTTAAGGA AGCCTTCCTG AAGGAGGTGT TATCAGCATT GACCATTACT ACACCAGTTT TATCATCTTT TGCTCATCTA TGGCTATCTT GCATTTTCAG TGTTCCCAGC TGTTAGATGA AAATCTAAAG GATGAATACT TTGAGGAAAT CATGGAAGAA TATGAAGATA TTAGACAGGA CCATTATGAG TCTCTCAAGG TAAGTGGTAG AAACAGATTT TTGCTTGTTT TTAATGTGAC TGTTTTTAT GATCCTAGTT TTTAATGTGA CTTTTTAAAA TGGTTTTGAG GAGTGTAATA GGC
85	none	1	<i>HaeIII</i>	85	CCAGGGTGCC AGGTATACAG TGA CTCTCTT ATCAGGCAGG CTGTCCCAAG GGTTTAGAGT TTGCTCCCA GAAACCAGTC AAAGG

Figura 11. Secuencia de interés para identificar el polimorfismo A2756G del gen *MTR* sometida a restricción mediante *HaeIII*. Cuando el alelo silvestre A está presente (óvalo verde) la enzima solo reconoce un sitio de restricción y se obtienen dos fragmentos, uno de 413pb y 85pb. Modificado de www.restrictionmapper.org

A2756G MRT digest

Enzymes: *HaeIII*

Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
290	<i>HaeIII</i>	86	<i>HaeIII</i>	375	CCAGTCCCTT CTTGGCTTG TGCAGGGTTT GAACATCCCA AGCCCACTGA GTTTACCTTT TCCTGCACGC CAGGCAGGAA TTAGCACAGT TGGTGAAGGG AGAAGAAATG AAGTTAAGGA AGCCTTCCTG AAGGAGGTGT TATCAGCATT GACCATTACT ACACCAGTTT TATCATCTTT TGCTCATCTA TGGCTATCTT GCATTTTCAG TGTTCCCAGC TGTTAGATGA AAATCTAAAG GATGAATACT TTGAGGAAAT CATGGAAGAA TATGAAGATA TTAGACAGG
123	<i>HaeIII</i>	376	none	498	CCATTATGAG TCTCTCAAGG TAAGTGGTAG AAACAGATTT TTGCTTGTTT TTAATGTGAC TGTTTTTAT GATCCTAGTT TTTAATGTGA CTTTTTAAAA TGGTTTTGAG GAGTGTAATA GGC
85	none	1	<i>HaeIII</i>	85	CCAGGGTGCC AGGTATACAG TGA CTCTCTT ATCAGGCAGG CTGTCCCAAG GGTTTAGAGT TTGCTCCCA GAAACCAGTC AAAGG

Figura 12. Secuencia de interés para identificar el polimorfismo A2756G del gen *MTR* sometida a restricción mediante *HaeIII*. Cuando el alelo mutado G está presente (óvalo rojo) se reconocen dos sitios de restricción (constitutivo y el polimórfico) obteniendo tres fragmentos, de 290pb, 123pb y 85pb. Modificado de www.restrictionmapper.org



Figura 13. Dibujo representativo de los posibles resultados de la restricción enzimática.

5.9. Análisis estadístico

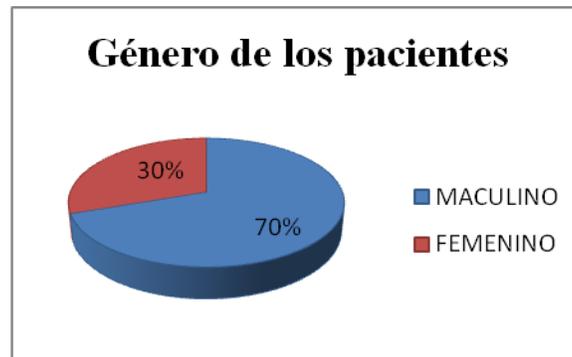
Los datos clínicos y epidemiológicos del estudio se analizaron mediante estadística descriptiva y por porcentajes. Las frecuencias alélicas y genotípicas se calcularon utilizando el método de la cuenta directa simple. Para determinar si la población en estudio se encontraba en equilibrio se utilizó la Ley de Hardy-Weinberg y la prueba de χ^2 .

VI. RESULTADOS

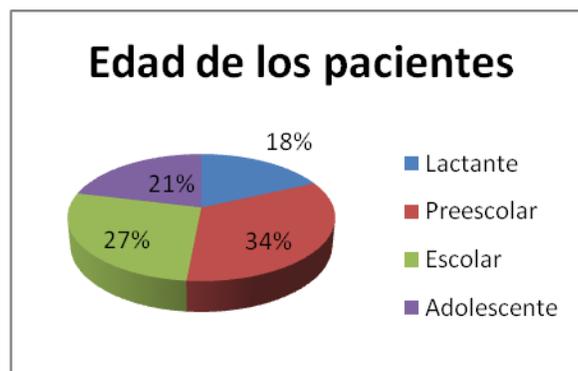
6.1. Características clínicas

6.1.1. Género y edad

Se incluyeron 33 pacientes y sus madres, dando un total de 66 individuos. El 70% fueron individuos masculinos (Gráfica 1). El grupo etario mayor fue el de preescolar representando el 34%, seguido por el grupo de escolares con 27% (Gráfica 2).



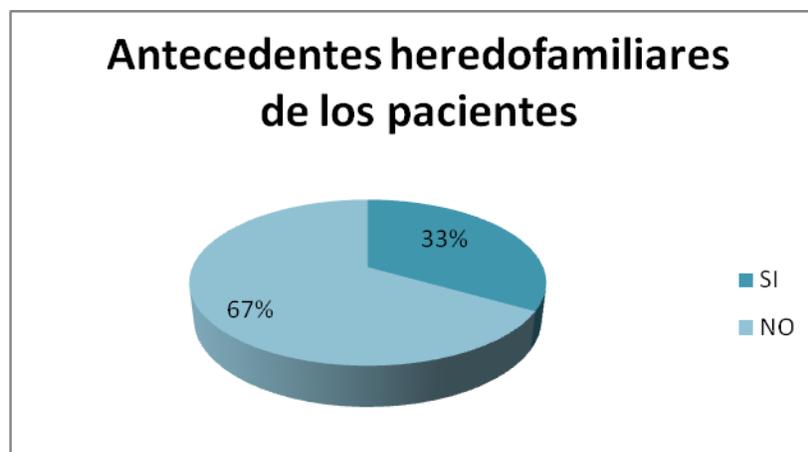
Gráfica 1. Género de los pacientes en estudio.



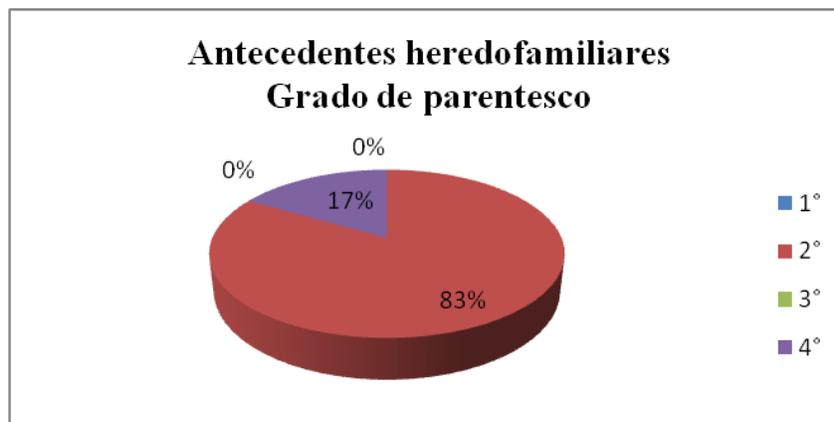
Gráfica 2. Edad de los pacientes en estudio.

6.1.2. Antecedentes heredofamiliares

En 11 pacientes (33%) se identificó que tuvieron uno o más familiares con LPHNS (Gráfica 3). El grado de parentesco más frecuente fue de segundo grado (83%, N=5), correspondiendo a abuelos y tios (Gráfica 4). Ningún caso presento más de un familiar afectado con LPHNS.



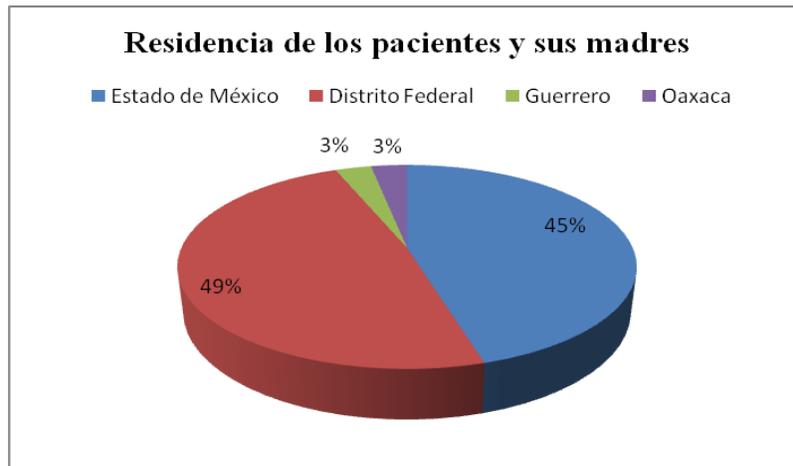
Gráfica 3. Antecedentes heredofamiliares de los pacientes en estudio.



Gráfica 4. Grado de parentesco en los antecedentes heredofamiliares.

6.1.3. Lugar de origen y residencia

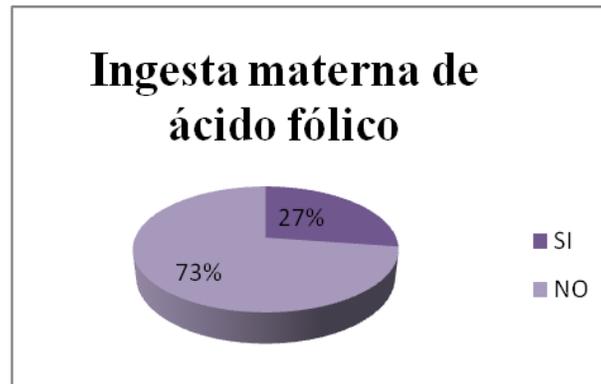
En el lugar de origen y residencia de los pacientes y sus madres predominó la zona centro del país, siendo el Distrito Federal y Estado de México las entidades más frecuentes, 49% N=16 y 45% N=15, respectivamente (Gráfica 5).



Gráfica 5. Residencia de los pacientes y sus madres.

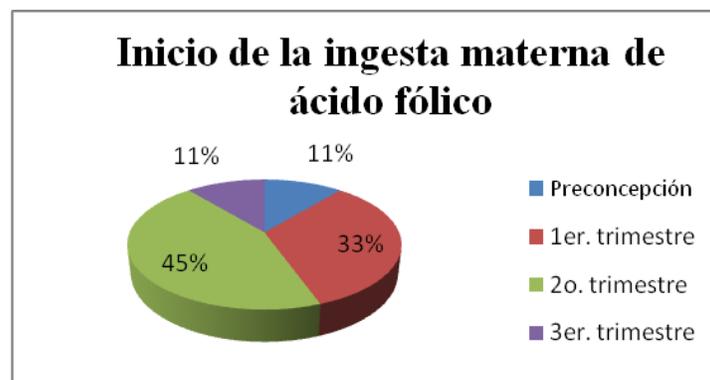
6.1.4. Ingesta de ácido fólico

La ingesta materna de ácido fólico antes o durante el embarazo fue deficiente. La mayoría de las madres de los pacientes en estudio no consumieron ácido fólico en etapa preconcepcional ni durante el embarazo 73%, N=24 (Gráfica 6).



Gráfica 6. Ingesta materna de ácido fólico antes o durante el embarazo.

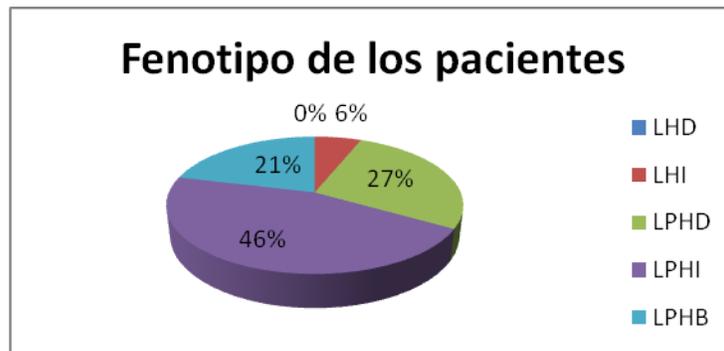
De las madres que consumieron ácido fólico (27% N=9), solo el 11% (N=1) lo realizó de manera preconcepcional y el mayor porcentaje lo ingirió en el segundo trimestre 45% , N=4 (Gráfica 7).



Gráfica 7. Inicio de la ingesta materna de ácido fólico.

6.1.5. Fenotipo de los pacientes

En relación al fenotipo de los pacientes estudiados, se observó el mayor porcentaje para el labio y paladar hendido unilateral (73%, N=24), y en éstos, el lado izquierdo predominó en toda la muestra (46%, N=15). No se observó labio hendido derecho y el labio hendido izquierdo representó el 6%. El labio y paladar hendido bilateral se presentó en 7 pacientes (21%). (Gráfica 8 y Fig. 14).



Gráfica 8. Fenotipo de los pacientes en estudio. LHD: labio hendido derecho, LHI: labio hendido izquierdo, LPHD: labio y paladar hendido derecho, LPHI: labio y paladar hendido izquierdo, LPHB: labio y paladar hendido bilateral.



Figura 14. Fotografías de pacientes que participaron en el estudio. (A) Lactante masculino con fenotipo de labio y alveolo hendido. (B) Labio y paladar hendido unilateral derecho. (C) Adolescente masculino con secuelas de labio y paladar hendido bilateral.

6.2. Análisis molecular

De los pacientes identificados en la primera parte del protocolo de investigación HIM-012-2007 para el polimorfismo de MTHFR, se identificaron las 33 muestras correspondientes. Se evaluaron las concentraciones obtenidas de DNA (Tabla 8) para la realización de PCR y posterior digestión de los productos para la identificación del polimorfismo A2756G del gen *MTR*.

Tabla 8. Concentraciones de DNA genómico

Caso	Concentración de DNA (ng)	Caso	Concentración de DNA (ng)	Caso	Concentración de DNA (ng)	Caso	Concentración de DNA (ng)
1 ^a	418	21A	237	39A	36.5	49A	91
1B	400	21B	104	39B	89	49B	33
3A	140	23A	160	41A	20	51A	184
3B	280	23B	34	41B	13	51B	103
4A	17.5	24A	103	42A	90	52A	175
4B	43	24B	67	42B	65.5	52B	36
5A	268	27A	50	43A	48	56A	34
5B	226	27B	1024	43B	24	56B	80
8A	272	31A	202	44A	35	58A	80
8B	296	31B	144	44B	22	58B	60
9A	417	33A	99	45A	81	59A	29
9B	343	33B	172	45B	121	59B	158
10A	386	35A	135	46A	104.5		
10B	767	35B	196	46B	1485		
15A	35	36A	325	47A	17		
15B	47	36B	684	47B	85		
17A	82	38A	14.5	48A	60		
17B	825	38B	44	48B	104		

Los productos de PCR con una longitud de 498pb (fragmento amplificado sin restricción enzimática) fueron visualizados en gel de agarosa al 2%. Se comprobó que eran del tamaño esperado y una fotografía representativa de uno de los geles se muestra en la figura 15.

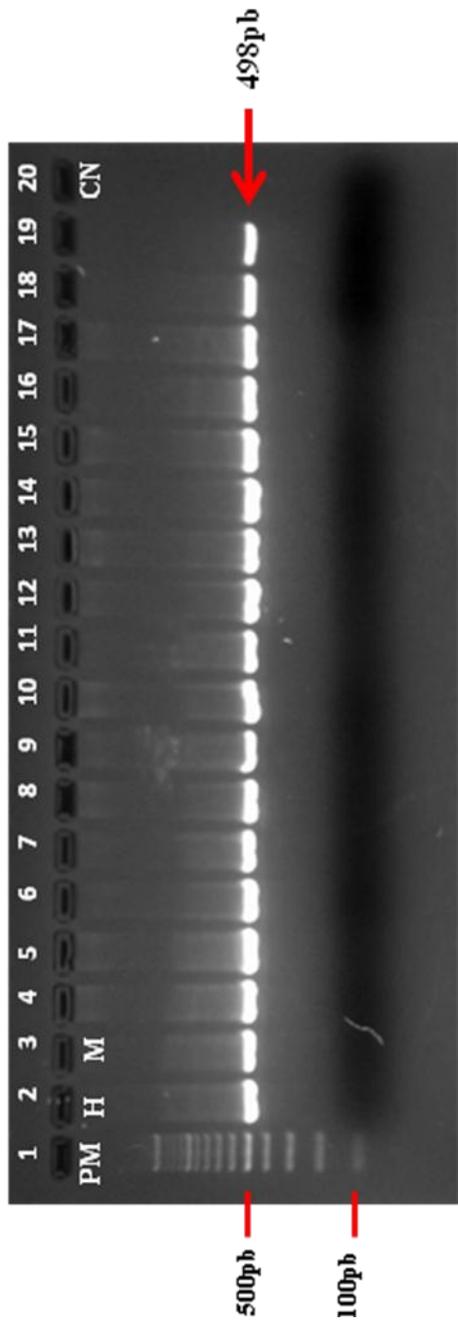


Figura 15. Gel de agarosa al 2% para el producto de PCR sometido a electroforesis. *Columna 1:* marcador de peso molecular (PM) de 100pb. *Columnas 2 a 19:* individuos pareados en estudio, hijo-madre (H-M). *Columna 20:* control negativo (CN).

Posterior a la reacción de restricción enzimática, los productos de la misma fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 4% y sometidos a luz UV para identificar el polimorfismo A2756G de *MTR* (Fig. 16).

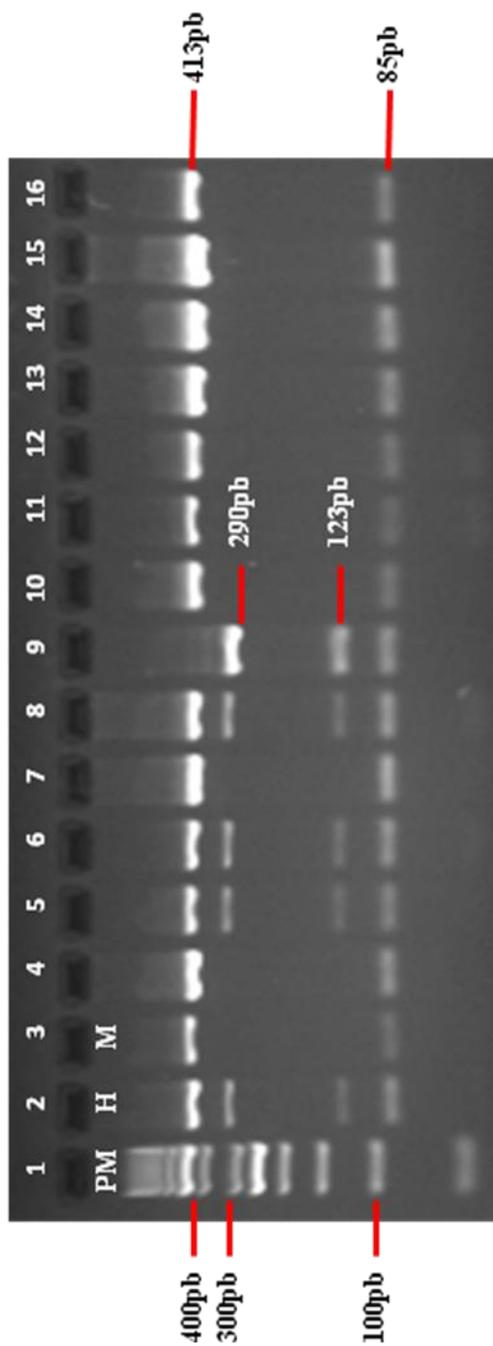
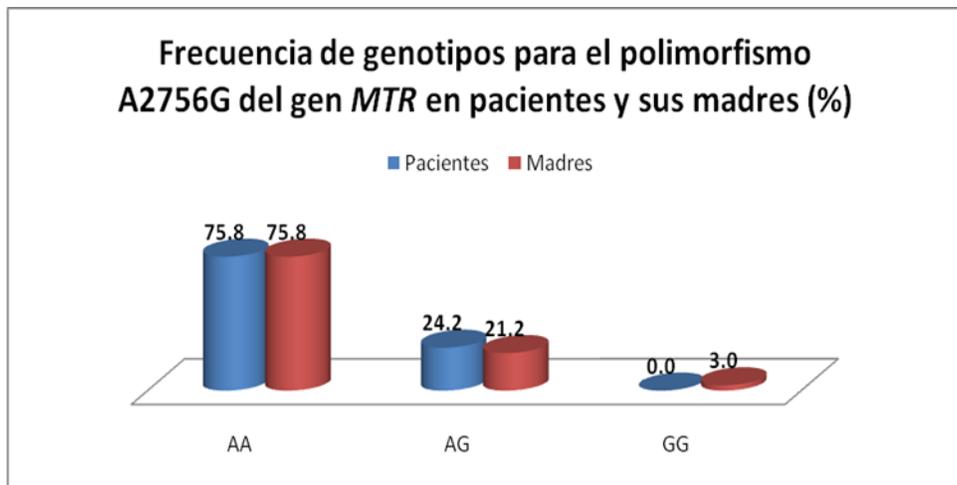


Figura 16. Gel de agarosa al 4% sometido a electroforesis. Análisis del polimorfismo A2756G de *MTR* en los pacientes y sus madres. Columna 1: marcador de peso molecular 50pb. Columnas 3, 4, 7 y 10-16: individuos homocigotos para alelo silvestre AA. Columnas 2, 5, 6 y 8: individuos heterocigotos AG. Columna 9: individuo homocigoto mutado GG.

6.3. Frecuencia del polimorfismo A2756G de *MTR*

Las frecuencias genotípicas del polimorfismo A2756G de *MTR* se muestran en la gráfica 9. La frecuencia del genotipo AA, fue 0.75 (75.8%) tanto en los pacientes como en sus madres. La frecuencia de heterocigotos AG en pacientes y madres fue de .024 (24.2%) y 0.21 (21.2%) respectivamente. No se encontraron pacientes homocigotos GG y este genotipo solo fue observado en una de las madres 0.3 (3%).

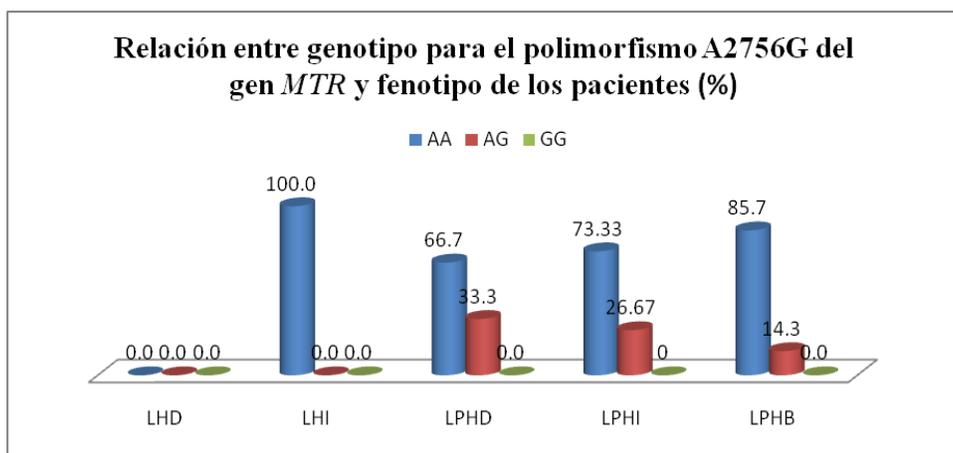
Por otra parte, la frecuencia para el alelo A en los pacientes con LPHNS fue de 0.88 y de 0.12 para el alelo; mientras que en las madres las frecuencias alélicas fueron 0.86 y 0.14 respectivamente.



Gráfica 9. Frecuencias genotípicas del polimorfismo A2756G de *MTR* en pacientes y sus madres.

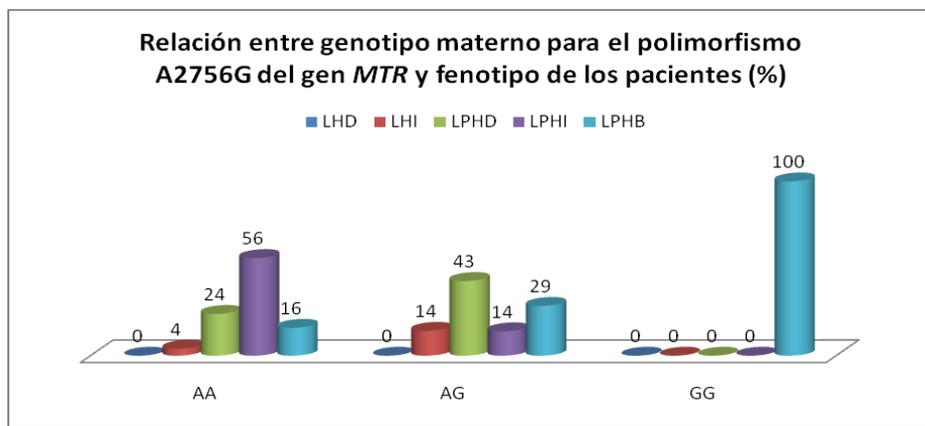
6.4. Relación genotipo-fenotipo

La relación entre genotipos y fenotipos de los pacientes demostró la frecuencia más elevada para el genotipo homocigoto silvestre AA en la mayoría de los fenotipos (Gráfica 10). En el fenotipo de labio hendido y paladar hendido unilateral, el lado derecho presenta una mayor frecuencia de heterocigotos AG (33.3%) comparado con el lado izquierdo (26.7%).



Gráfica 10. Relación entre genotipo y fenotipo en los pacientes.

Al hacer la relación entre genotipo materno y fenotipo de los pacientes, el genotipo homocigoto silvestre materno presentó la mayor frecuencia para el fenotipo de labio y paladar hendido izquierdo (56%). Por otra parte, las madres heterocigotas tuvieron en un 43% el fenotipo de labio y paladar hendido unilateral derecho en sus hijos y el 23% para el fenotipo bilateral (Gráfica 11).



Gráfica 11. Relación entre genotipo materno y fenotipo de los pacientes.

6.5. Determinación del Equilibrio de Hardy-Weinberg

La determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas se calculó mediante el método de la cuenta génica simple, los valores correspondientes se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Cálculo de frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo A2756G del gen *MTR* en la población estudiada.

Pacientes con LPHNS						
Genotipo	Número de individuos	Frecuencia genotípica	Alelos A	Frecuencia de alelo A	Alelos G	Frecuencia de alelo G
AA	25	0.76	50	0.88	0	0.12
AG	8	0.24	8		8	
GG	0	0	0		0	
Total	33		58		8	
Madres de los pacientes						
AA	25	0.76	50	0.86	0	0.14
AG	7	0.21	7		7	
GG	1	0.3	0		2	
Total	33		57		9	
Muestra total (pacientes y sus madres)						
AA	50	0.76	100	0.87	0	0.13
AG	15	0.23	15		15	
GG	1	0.02	0		2	
Total	66		115		17	

Se desarrolló el análisis para determinar si esta población se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg. Los valores correspondientes para cada variable se presentan en las Tablas 9 y 10. En la Tabla 10 se muestran los valores correspondientes, según la fórmula:

$$p^2 + 2pq + q^2 = (p + q)^2 = 1$$

Tabla 10. Equilibrio de Hardy-Weinberg desarrollado

Pacientes con LPHNS			
p= A	0.88	p ²	0.774
		2pq	0.211
q= G	0.12	q ²	0.014
Madres de los pacientes			
p= A	0.86	p ²	0.739
		2pq	0.240
q= G	0.14	q ²	0.019
Muestra total			
p= A	0.87	p ²	0.756
		2pq	0.226
q= G	0.13	q ²	0.016

La prueba χ^2 de Pearson permitió calcular la diferencia entre una distribución observada y otra esperada, indicando en qué medida las diferencias entre ambas son explicadas por azar (Tabla 11), empleando la fórmula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Tabla 11. Valores obtenidos y utilizados para la prueba χ^2 de Pearson

Pacientes con LPHNS	Genotipo	Observado (O)	Esperado (E)	$(O-E)^2/E$	χ^2
	AA	25	25.48	0.009	
	AG	8	7.03	0.134	
	GG	0	0.48	0.485	
					0.628
Madres de los pacientes					
	AA	25	25.48	0.009	
	AG	7	7.03	0.0	
	GG	1	0.48	0.547	
					0.557
Muestra total					
	AA	50	50.07	0.0	
	AG	15	14.83	0.002	
	GG	1	1.10	0.009	
					0.0108

Los resultados de χ^2 (0.628 para pacientes, 0.557 para sus madres y 0.0108 para la muestra total) se buscaron en las tablas de distribución para χ^2 y se encontró un valor de $p > 0.7$, 0.75 y 0.9 respectivamente, concluyendo que la población se halla en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 12).

Tabla 12. Distribución simplificada de χ^2 .

v/p	0,55	0,6	0,65	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	0,975
1	0,3573	0,2750	0,2059	0,1485	0,1015	0,0642	0,0358	0,0158	0,0039	0,0010
2	1,1957	1,0217	0,8616	0,7133	0,5754	0,4463	0,3250	0,2107	0,1026	0,0506
3	2,1095	1,8692	1,6416	1,4237	1,2125	1,0052	0,7978	0,5844	0,3518	0,2158

El rectángulo en rojo (para muestra total) y en azul (para pacientes y sus madres por separado) señala los valores de p utilizados en este análisis.

p = Probabilidad de encontrar un valor mayor o igual que χ^2 tabulado

v = Grados de Libertad (señalado en verde).

VII. DISCUSIÓN

El labio y paladar hendido es una de las principales malformaciones congénitas en la población infantil mexicana. Su etiología es compleja al presentar un patrón de herencia de tipo multifactorial, en donde participan factores tanto genéticos como ambientales. Uno de los factores propuestos para explicar este desarrollo anormal, es la presencia de diferentes polimorfismos en genes implicados en el metabolismo del ácido fólico y de la homocisteína.

La presente tesis tuvo como objetivo principal determinar la frecuencia del polimorfismo A2756G del gen *MTR* en pacientes, que acuden al Hospital Infantil de México Federico Gómez con diagnóstico de labio hendido con o sin paladar hendido no sindrómico, y en sus madres.

Se realizó estudio tanto clínico como molecular y se estableció la relación fenotipo genotipo. Entre los parámetros analizados se encuentra el género de los pacientes. El más afectado en este estudio fue el masculino, ya que 70% de los pacientes fueron varones. Este dato concuerda con lo reportado en la literatura internacional.⁷

La determinación del género más frecuentemente afectado tiene trascendencia por varias razones, entre otras matiza el asesoramiento genético ya que una de las consideraciones para otorgarlo en la herencia multifactorial es que si un género está predominantemente afectado, el riesgo de recurrencia será modificado dependiendo del género del propósito.

La mayoría de los pacientes analizados en esta investigación se encontraba en las etapas preescolar y escolar. Sin embargo, la mayoría de los pacientes estudiados acudieron al HIMFG a diagnóstico y tratamiento desde la etapa neonatal, continuando su tratamiento médico y quirúrgico durante varios años hasta la actualidad.

En el análisis de los antecedentes heredofamiliares se observó que aproximadamente un tercio de los pacientes tenía uno o más familiares con LPHNS. Interesantemente, ninguno de los familiares afectados fue de primer grado, resultado que llama la atención ya que se ha estimado que el riesgo de recurrencia para familiares en primer grado (definido como la prevalencia de hendidura en familiares en primer grado comparada con la prevalencia en la población) va de 24 a 82 veces más⁷² y tal estimación se considera de utilidad en el asesoramiento genético. Lo que podría haberse supuesto es que de haber algún antecedente familiar este fuera en primer grado. Sin embargo, debe considerarse que el tamaño de la muestra es pequeño por lo cual este resultado podría modificarse al analizar más pacientes.

En relación al lugar de origen y residencia de los pacientes que participaron en el estudio predominó la zona centro (Distrito Federal y Estado de México), y solo 2 pacientes provenían de Guerrero y Oaxaca. El dato anterior es lo esperado por la ubicación de nuestra institución ya que atiende principalmente a pacientes de la Ciudad de México y zona conurbada.

Una de las estrategias utilizadas para modificar y disminuir el riesgo de presentación de defectos al nacimiento es la ingesta de ácido fólico. Esta situación se está estudiando en relación al labio y paladar hendido. La asociación de polimorfismos en el gen *MTHFR* con

riesgo aumentado de defectos de tubo neural supone un efecto protector del uso de ácido fólico.⁷³

De manera interesante, un estudio demostró que la prevalencia de hendiduras orofaciales fue más alta en el grupo de mujeres tratadas con ácido fólico a dosis alta (2.5mg) a diferencia del grupo tratado con dosis baja (1mg).⁷⁴ Sin embargo, esta asociación puede ser confundida por otros factores de estilo de vida asociados como el uso de multivitaminas y a que existe un solo estudio con este resultado.³⁵

En México la NOM-034-SSA2-2002 para la prevención y control de los defectos al nacimiento (así como las campañas de promoción de salud) informan sobre los beneficios de la ingesta de ácido fólico para la prevención de defectos congénitos del tipo de alteraciones del tubo neural, estableciendo la toma de 400 microgramos tres meses previos a la concepción y los primeros tres meses del embarazo.⁷⁵

En el presente estudio la mayoría de las madres (73%) no ingirió ácido fólico antes del embarazo ni durante el mismo. El 27% de las madres ingirió ácido fólico generalmente hasta el segundo trimestre. Este dato llama la atención porque se esperaría que esta población estuviera informada y familiarizada con los beneficios del uso de ácido fólico para prevención de defectos al nacimiento.

Durante la actualización de la historia clínica realizada a los pacientes y sus madres nos percatamos de que algunas de ellas ya estaban nuevamente embarazadas y referían no haber ingerido el ácido fólico de manera adecuada, suponiendo que el consumo debía ser durante

el embarazo. Este dato y a pesar del tamaño de la muestra, sugiere que se debe incrementar la conciencia social sobre la función protectora del ácido fólico contra los defectos del tubo neural y trabajar en el marco de la promoción de la salud, tomando en cuenta el componente ambiental involucrado en la etiología del LPHNS.

Los resultados de este estudio en relación a los datos clínicos de labio hendido con o sin paladar hendido demostraron que la presentación más frecuente fue LPHNS unilateral izquierdo, dato que también está de acuerdo a lo reportado en la literatura.^{7,10} No existe todavía una respuesta clara a por qué es más frecuente la presentación unilateral izquierda.

En cuanto al análisis de los genotipos de los pacientes y sus madres, la frecuencias genotípicas encontradas en este estudio para el polimorfismo A2756G del gen *MTR*, y como se describe en la sección de resultados, predominó la presencia de homocigotos silvestres AA tanto en los pacientes como en sus madres (~76%). En relación al genotipo heterocigoto AG, éste fue el segundo más frecuente (Tabla 13), mientras que el genotipo homocigoto mutado GG no fue encontrado en los pacientes y solamente se presentó en una de las madres.

En México, aún no se conoce la frecuencia del polimorfismo A2756G del gen *MTR* en población general pero sí existen diversos estudios llevados a cabo en otros países en donde se establece que en general e independientemente de la población estudiada, la frecuencia del genotipo GG es de 1 a 6%.⁵¹⁻⁵⁹ Si bien no se ha hecho este estudio en nuestra población, una situación hipotética sería que esta frecuencia se encontrara de manera similar en

población mexicana, por lo que quedaría la pregunta de si este genotipo es más frecuente en la población de pacientes y/o sus madres.

La consideración anterior es interesante porque Mostowska⁶⁹ demostró que las madres de hijos con LPHNS presentan una mayor frecuencia del genotipo homocigoto mutado GG, comparadas con madres control en población polaca. En el presente estudio sólo una de las madres presentó el genotipo GG (3%), y ningún paciente presentó este genotipo, por lo que podría suponerse que la presencia de este genotipo a diferencia de lo reportado por el grupo de Mostowska⁶⁹, no es tan frecuente en población de pacientes analizados, sin embargo una limitante del estudio es el tamaño de la muestra (Tabla 13).

La frecuencia de del genotipo homocigoto GG del polimorfismo A2756G del gen *MTR* en las madres fue de 3%, porcentaje similar al que presenta la población general norteamericana, europea y asiática, pero menor a la encontrada en afroamericanos.⁵¹⁻⁵⁹

Tabla 13. Frecuencias genotípicas y alélicas en los pacientes con LPHNS y sus madres, comparadas con las reportadas en otros estudios

	Polimorfismo A2756G <i>MTR</i>	Frecuencia genotípica (%)			Frecuencia alélica	
		AA	AG	GG	A	G
Presente estudio* 33 pacientes y 33 madres	Pacientes	76	24	0	0.88	0.12
	Madres	76	21	3	0.87	0.14
Mostowska ⁶⁹ 122 madres	Pacientes	-	-	-	-	-
	Madres	56.6	38.5	4.9	0.76	0.24
Brandalize ⁷⁰ 114 pacientes y 110 madres	Pacientes	60	37	3	0.79	0.21
	Madres	64	33	3	0.81	0.19

*X² de 0.0108, p 0.95-0.90 con 1 grado de libertad.

Las frecuencias alélicas obtenidas aunque con discreta variación, prácticamente fueron similares a las presentadas en otros estudios realizados en pacientes y en sus madres en otras poblaciones, siendo más frecuente el alelo A (tabla 13). Hasta donde sabemos, solo existe un antecedente de estudio de la frecuencia del polimorfismo A27356G en población mexicana en padres de hijos con anencefalia y población control, reportando una frecuencia del genotipo AA de 0.88 y de 0.20 para el genotipo AG en los casos. Para la población control, la frecuencia de AA fue de 0.67, de AG 0.27 y de GG 0.06. La frecuencia del alelo A y G en los casos fue de 0.90 y 0.10 respectivamente, mientras que para los controles fue de 0.81 y 0.19 respectivamente⁷⁶. Estas frecuencias genotípicas y alélicas en las madres de hijos con malformaciones (LPHNS y anencefalia) resultaron similares a las presentadas en nuestro estudio.

La aplicación de la ley de Hardy-Weinberg permite determinar si una población se encuentra en equilibrio génico. Este análisis se basa en las siguientes hipótesis: la población es panmíctica (todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y el apareamiento es al azar); la población es suficientemente grande para minimizar las diferencias existentes entre los individuos; la población no está sometida a migración, mutación o selección (no hay pérdida ni ganancia de alelos) y finalmente las frecuencias genotípicas se mantienen constantes de generación en generación. El análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas de los pacientes y sus madres que participaron en este estudio, de acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg, demostró que esta población se encuentra en equilibrio génico y que tales frecuencias se mantiene estables de una generación a otra.

En conclusión, en este estudio se analizó a una población de 33 pacientes con diagnóstico de LPHNS y sus madres. El tipo más frecuente fue el LPHNS unilateral izquierdo, con predominio en género masculino, hubo una baja ingesta de ácido fólico por parte de las madres. El antecedente heredofamiliar más frecuente fue familiares en segundo grado (no hubo familiares afectados de primer grado).

Aunque el estudio realizado no nos permite establecer (por el tamaño de la muestra y por no conocerse la frecuencia del polimorfismo en población mexicana) la relación existente entre el polimorfismo A2756G de *MTR* y la presencia de LPHNS, es de suma importancia el análisis de las variantes polimórficas que podrían influir en el metabolismo de folatos, metionina y homocisteína ya que aportarían información nueva sobre los mecanismos patogénicos.

Con los datos obtenidos en el presente estudio y al igual con lo reportado por Brandalize⁵⁰, quien realizó los estudios tanto en población general como en pacientes como LPHNS, los resultados sugieren que dicho polimorfismo no representaría un factor de riesgo para LPHNS en la población de pacientes estudiados en el HIMFG, sin embargo, para obtener una conclusión definitiva sería necesario compararlo con la frecuencia del polimorfismo en población general mexicana y aumentar el tamaño de la muestra.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Adam Z. Basics of dysmorphology: a review. *Ultrasound Rev Obstet Gynecol* 2003;3:227-235.
2. Davies DP, Evans DJR. Clinical dysmorphology: understanding congenital Abnormalities. *Curr Paediatr* 2003;13:288-297.
3. Jurado-García E, Mutchinick O, Urrusti-Sanz J, Vargas-García C. Birth defects. A public health problem in Mexico. *Gac Med Mex* 1996;132:141-182.
4. Gallegos MC, Romero G, Pérez NM, Salazar M. Defectos congénitos mayores y múltiples en neonatos de mujeres atendidas en un hospital de tercer nivel. *Ginecol Obstet Mex* 2007;75:247-252.
5. Valdés-Hernández J, Canún-Serrano S, Reyes-Pablo AE, Navarrete-Hernández E. Mortalidad por defectos al nacimiento en menores de 5 años de edad en México de 1998 a 2006. *Salud Publica Mex* 2009;51:381-389.
6. Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet* 2009;374:1773-1785.
7. Arosarena OA. Cleft Lip and Palate. *Otolaryngol Clin N Am* 2007;740:27-60.
8. Helms JA, Cordero D, Tapadia MD. New insights into craniofacial morphogenesis. *Development* 2005;132:851-861.
9. Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet* 2004;13:R73-R81.
10. Kirschner RE, LaRossa D. Cleft lip and palate. *Otolaryngol Clin North Am* 2000;33:1191-1215.

11. Peña-Alonso YR, Venegas C, Lozano R, Kofman-Alfaro S, Queipo G. Mortalidad por defectos al nacimiento. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2005;60:294-304.
12. Archivo Hospital Infantil de México Federico Gómez 2010.
13. Tessier, P. Anatomical classification of facial, craneofacial and latero-facial clefts. *J Maxillofac Surg* 1976;4:69-92.
14. Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development. *J Dent Res* 2007;86:986-991.
15. Harville EW, Wilcox AJ, Lie RT, Abyholm F, Vindenes H. Epidemiology of cleft palate alone and cleft palate with accompanying defects. *Eur J Epidemiol* 2007; 22:389-395.
16. Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, Korf BR. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. Fifth ed. Churchill Livingstone. United States of America 2007 pag. 3349-3350.
17. Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:270-278.
18. Carinci F, Rullo R, Farina A, Morano D, Festa VM, Mazzarella M, Del Viscovo D, Carls PF, Becchetti A, Gombos. Non-syndromic orofacial clefts in Southern Italy: pattern analysis according to gender, history of maternal smoking, folic acid intake and familial diabetes. *J Craniomaxillofac Surg* 2005;33:91-94.
19. Krost B, Schubert J. Influence of season on prevalence of cleft lip and palate. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;35:215-218.
20. Bille C, Olsen J, Vach W, Knudsen VK, Olsen SF, Rasmussen K, Murray JC, Nybo AM, Christensen K. Oral clefts and life style factors – A case-cohort study based on prospective Danish data. *Eur J Epidemiol* 2007;22:173-181.

21. Asling CW, Nelson MM, Dougherty HD, Wright HV, Evans HM. The development of cleft palate resulting from maternal pteroylglutamic (folic) acid deficiency during the latter half of gestation in rats. *Surg Gynecol Obstet* 1960;111:19-28.
22. Hernandez-Diaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med* 2000;343:1608-1614.
23. Simmons CJ, Mosley BS, Fulton-Bond CA, Hobbs CA. Birth defects in Arkansas: is folic acid fortification making a difference? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004;70:559-564.
24. Canfield MA, Collins JS, Botto LD, et al. Changes in the birth prevalence of selected birth defects after grain fortification with folic acid in the United States: findings from a multi-state population based study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005;73:679-689.
25. Botto LD, Lisi A, Bower C, et al. Trends of selected malformations in relation to folic acid recommendations and fortification: an international assessment. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2006;76:693-705.
26. Yazdy MM, Honein MA, Xing J. Reduction in orofacial clefts following folic acid fortification of the U.S. grain supply. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2007;79:16-23.
27. Ray JG, Meier C, Vermeulen MJ, Wyatt PR, Cole DE. Association between folic acid food fortification and congenital orofacial clefts. *J Pediatr* 2003;143:805-807.
28. Carinci F, Scapoli L, Palmieri A, Zollino I, Pezzetti F. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: An update. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007;71:1509-1519.

29. Ding H, Wu X, Boström H, Kim I, Wong N, Tsoi B, O'Rourke M, Koh GY, Soriano P, Betsholtz C, Hart TC, Marazita ML, Field L, Tam P, Nagy A. A specific requirement for PDGF-C in palate formation and PDGFR- α signaling. *Nat Genet* 2004;36:1111-1116.
30. Clouthier DE. MicroRNAs in facial development. *Nat Genet* 2008; 40:268-269.
31. Eberhart JK, He X, Swartz ME, Yan YL, Song H, Boling TC, Kunerth AK, Walker MB, Kimmel CB, Postlethwait JH. MicroRNA Mirn140 modulates Pdgf signaling during Palatogenesis. *Nat Genet.* 2008;40:290-298.
32. Chevrier C, Perret C, Bahuau M, Zhu H, Nelva A, Herman C, Francannet C, Robert-Gnansia E, Finnell RH, Cordier S. Fetal and Maternal MTHFR C677T Genotype, Maternal Folate Intake and the Risk of Nonsyndromic Oral Clefts. *Am J Med Genet A* 2007;143:248–257.
33. Little J, Gilmour M, Mossey PA, FitzPatrick D, Cardy A, Clayton-Smith J, et al. Folate and clefts of the lip and palate-a u.k.-based case-control study: part II biochemical and genetic analysis. *Cleft Palate Craniofac J* 2008;45:428-438.
34. Ali A, Singh SK, Raman A. MTHFR 677TT alone and IRF6 820GG together with MTHFR 677CT, but not MTHFR A1298C, are risks for non syndromic cleft lip with or without cleft palate in an Indian population. *Genet Test Mol Biomarkers* 2009;13:355-360.
35. Boyles AL, Wilcox AJ, Taylor JA, Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM, Drevon CA, Vollset SE, Lie RT. Folate and one-carbon metabolism gene polymorphisms and their associations with oral facial clefts. *Am J Med Genet A* 2008;146:440-449.
36. van Rooij IALM, Vermeij-Keers C, Kluijtmans LAJ, Ocké MC, Zielhuis GA, Goorhuis-Brouwer SM, van der Biezen JJ, Kuijpers-Jagtman AM, Steegers-

- Theunissen RPM. Does the interaction between maternal folate intake and the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms affect the risk of cleft lip with or without cleft palate?. *Am J Epidemiol* 2003;157:583-591.
37. Johnson CY, Little J. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging?. *Int J Epidemiol* 2008;37:1041-1058.
38. Peña IM. Frecuencia del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en pacientes con labio hendido con o sin paladar hendido no sindrómico. Tesis de especialidad en Genética Médica. Facultad de Medicina, UNAM. México 2008 pag. 1-47.
39. Vázquez ER. Prevalencia de la variante C677T del gen *MTHFR* en pacientes mexicanos con labio/paladar hendido no sindrómico y sus madres. Tesis para obtener título de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química, UNAM. México 2010 pag. 1-166.
40. Eldibany MM, Caprini JA. Hyperhomocysteinemia and thrombosis: an overview. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:872-884.
41. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the *MTHFR* C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:195-201.
42. Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R, Kruger WD. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum Mol Genet* 1996;5:1851-1858.
43. Eichholzer M, Tönz O, Zimmermann R. Folic acid: a public-health challenge. *Lancet* 2006;367:1352-1361.
44. Yamaji T, Iwasaki M, Sasazuki S, Sakamoto H, Yoshida T, Tsugane S. Methionine synthase a2756g polymorphism interacts with alcohol and folate intake to influence

- the risk of colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:267-274.
45. Laird, P. W., and Jaenisch, R. DNA methylation and cancer. *Hum Mol Genet* 1994;3:1487-1495.
46. Leclerc D, Campeau E, Goyette P, et al. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet* 1996;5:1867-1874.
47. Watkins D, Rosenblatt DS. Functional methionine synthase deficiency (cblE and cblG): clinical and biochemical heterogeneity. *Am J Med Genet* 1989;34:427-434.
48. Aléssio ACM, Siqueira LH, Bydlowski SP, Höehr NF, Annichino-Bizzacchi JM. Polymorphisms in the cbs gene and homocysteine, folate and vitamin b12 levels: association with polymorphisms in the mthfr and mtr genes in brazilian children. *Am J Med Genet A* 2008;146:2598-2602.
49. Bae J, Shin SG, Cha SH, Choi DH, Lee S, Kim NK. Prevalent genotypes of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T and A1298C) in spontaneously aborted embryos. *Fertil Steril* 2007;87:351-355.
50. Brandalize APC, Bandinelli E, Almeida dos Santos P, Roisenberg I, Schüler-Faccini L. Evaluation of c677t and a1298c polymorphisms of the mthfr gene as maternal risk factors for down syndrome and congenital heart defects. *Am J Med Genet A* 2009;149A:2080-2087.
51. Harman DL, Shields DC, Woodside JV, et al. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. *Genet Epidemiol* 1999;17:298-309.

52. Morita H, Kurihara H, Sugiyama, et al. Polymorphism of the methionine synthase gene: association with homocysteine metabolism and late-onset vascular diseases in the Japanese population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:298-302.
53. Chen J, Stampfer MJ, Ma J, et al. Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001;154:667-672.
54. Stampfer MJ, Christensen B, et al. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocysteine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:825-829.
55. Johanning GL, Tamura T, Johnston KE, Wenstrom KD. Comorbidity of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase gene polymorphisms and risk for neural tube defects. *J Med Genet* 2000;37:949-951.
56. Christensen B, Arbour L, Tran P, et al. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Med Genet* 1999;84:151-157.
57. Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2004;159:423-443.
58. Zhang G, Dai C. Gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in Chinese patients with occlusive coronary artery or cerebral vascular diseases. *Thromb Res* 2001;104:187-195.
59. Kim OJ, Hong SP, Ahn JY, et al. Influence of combined methionine synthase (MTR 2756A>G) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR 677C>T) polymorphisms to plasma homocysteine levels in Korean patients with ischemic stroke. *Yonsei Med J* 2007;48:201-209.

60. Fang JY, Xiao SD. Folic acid, polymorphism of methylgroup metabolism genes, and DNA methylation in relation to GI carcinogenesis. *J Gastroenterol* 2003;38: 821-829.
61. Gemmati D, Ongaro A, Scapoli GL et al. Common gene polymorphisms in the metabolic folate and methylation pathway and the risk of acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in adults. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:787-794.
62. Skibola CF, Forrest MS, Coppede F et al. Polymorphisms and haplotypes in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004;104:2155-62.
63. Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 2001;293:1068-1070.
64. Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:4632-4642.
65. Steele W, Allegrucci C, Singh R et al. Human embryonic stem cell methyl cycle enzyme expression: modelling epigenetic programming in assisted reproduction? *Reprod Biomed Online* 2005;10:755-766.
66. Doolin MT, Barbaux S, McDonnell M et al. Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida. *Am J Hum Genet* 2002;71:1222-1226.
67. Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G et al. Methionine synthase (MTR) 2756 (A>G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet A* 2003;121:219-224.

68. Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Haddad R, Eberlin MN, Pavarino-Bertelli EC. The MTR A2756G polymorphism is associated with an increase of plasma homocysteine concentration in Brazilian individuals with Down syndrome. *Braz J Med Biol Res* 2008;41:34-40.
69. Mostowska A, Hozyasz KK, Jagodzinski PP. Maternal MTR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population. *Clin Genet* 2006;69:512-517.
70. Brandalize APC, Bandinelli E, Borba JB, Félix TM, Roisenberg I, Schüler-Faccini L. Polymorphisms in genes MTHFR, MTR and MTRR are not risk factors for cleft lip/palate in South Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2007;40:787-791.
71. vander Put NM, van der Molen EF, Kluijtmans LA, et al. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase:relevance to hyperhomocysteinemia in neural-tube defects and vascular disease. *Q J Med* 1997;90:511-517.
72. Sivertsen A, Wilcox AJ, Skjærven R, Vindenes HA, Abyholm F, Harville E, RT Lie. Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population based cohort study of first degree relatives. *BMJ* 2008;336:432-434.
73. Wintner S, Hafner E, Stonek F, Stuempflen I, Metzenbauer M, Philipp K. Association of congenital cardiac defects and the C677T methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism. *Prenat Diagn* 2007;27:704-708.
74. Ulrich M, Kristoffersen K, Rolschau J, Grinsted P, Schaumburg E, Foged N. The influence of folic acid supplement on the outcome of pregnancies in the county of Funen in Denmark, part II: congenital anomalies-a randomised study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;87:111-113.

75. Norma Oficial Mexicana NOM-034-SSA2-2002, para la Prevención y Control de los Defectos al Nacimiento. www.salud.gob.mx
76. Camacho-Molina A, Galaviz-Hernández C, Sánchez-Urbina R, Martínez-Salazar MG, Sierra-Ramírez JA, Izquierdo-González I, García-Cavazos R. Análisis del polimorfismo A2756G del gen de la enzima metionina sintasa (MTR), en parejas con hijo con anencefalia y población control. Memorias del XXIX Congreso Nacional de Genética Humana en: Revista de Salud Pública y Nutrición Edición especial No.5-2005.

ANEXOS

Anexo 1. Extracción de ADN genómico

1. *Lisis de glóbulos rojos*

- Se colocaron 300 μL de sangre periférica en un tubo con 900 μL de la solución de lisis para glóbulos rojos, posteriormente se mezcló e incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente, invirtiendo el tubo varias veces durante la incubación.
- Se centrifugó durante 20 segundos a 13000 revoluciones por minuto (rpm) y posteriormente se eliminó el sobrenadante con la precaución de no eliminar el botón formado.
- Se agitó con vortex para resuspender el botón.

2. *Lisis celular*

- Se llevó a cabo la lisis de los leucocitos presentes en la suspensión resultante del paso 1 para liberar los componentes celulares.
- Se agregaron 300 μL de la solución de lisis celular y se resuspendió utilizando la pipeta hasta obtener una solución homogénea. Los detergentes aniónicos contenidos en la solución de lisis celular disuelven los lípidos que forman la membrana celular.

3. Precipitación de proteínas

- Se agregó solución de precipitación de proteínas al tubo del paso 2, la cual se encarga de precipitar las proteínas presentes para obtener un DNA más puro.
- Enseguida se agitó vigorosamente en vortex a máxima velocidad durante 30 segundos.
- Se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto, observándose la presencia de un precipitado café.

4. Precipitación de DNA

- Se basa en la solubilidad del DNA en distintos solventes. El sobrenadante del paso 3 se transfirió a un tubo nuevo que contenía 300 μ L de isopropanol, se mezcló por inversión durante 50 segundos asegurando la formación de una maraña, correspondiente al DNA, y posteriormente se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm.
- Se decantó el isopropanol y se agregaron 300 μ L de etanol al 70% para lavar el DNA.
- Se centrifuga a 13000 rpm durante 1 minuto y se decanta el etanol cuidando que el botón no se elimine.
- Se colocan los tubos en un desecador a velocidad media durante 15 minutos para eliminar los restos de los solventes anteriores.

5. Hidratación del DNA

- Se resuspende el DNA obtenido del paso 4 en 50 μ L de solución de hidratación y se incuba durante 1 hora a 60°C para su posterior cuantificación y valoración de su integridad.

Cuantificación del DNA

La cuantificación del DNA se realizó mediante espectrofotometría. Debido a los anillos presentes en las bases nitrogenadas del DNA, esta molécula tiene absorbancia máxima a 260 nm. De esta manera, la lectura a 260 nm permite calcular la concentración de DNA en la solución (ya que presenta una absorción máxima a esta longitud de onda), teniendo en cuenta que 1 unidad de densidad óptica (DO) corresponde a 50 µg/mL de DNA de doble cadena.

Para determinar pureza, se utiliza la razón de DNA/proteínas. La abundancia de proteínas residuales en el extracto se determina midiendo absorbancia a 280 nm. Un DNA adecuado en calidad y pureza es áquel cuya relación A_{260}/A_{280} es de 1.7 a 2.0, mientras que valores menores a 1.75 indican presencia de proteínas.

La cuantificación de DNA para este trabajo se realizó mediante el espectrofotómetro NanoDropR de la manera siguiente:

1. Mediante programa ND-1000 V3.2.1 se eligió la opción de ácidos nucleicos.
2. Se cargaron 2 µL de agua inyectable.
3. Posteriormente se limpiaron ambos lentes con agua inyectable y se colocaron 2 µL para el blanco, realizando su medición.
4. Se colocó la muestra y se realizaron las mediciones.

Determinación de la integridad del ADN

La integridad del DNA es necesaria para el adecuado procesamiento de las muestras y la obtención de resultados confiables. Para ello esta prueba de integridad se lleva a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, cuya concentración se utiliza para fragmentos mayores a 1 kb. La electroforesis en gel es una técnica utilizada para separar moléculas como DNA y RNA. Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa. Los geles se comportan como un filtro molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño, van a migrar de forma distinta en el gel. La distancia recorrida por cada fragmento de DNA va a ser inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular, es decir, el desplazamiento de las moléculas de ácidos nucleicos con carga negativa a través del gel de agarosa por un campo eléctrico, donde las moléculas de menor tamaño se mueven a mayor velocidad y migran más lejos hacia el polo positivo.

Anexo 2. Reacción en cadena de polimerasa

La técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) desarrollada por Kary Mullis en los años ochenta, es una técnica de biología molecular que permite producir un enorme número de copias de una secuencia específica del DNA (amplificarla). El método se basa en las características de la estructura química del DNA y su replicación semiconservativa.

Fases de la PCR

1. *Desnaturalización.* En esta fase se aplica una temperatura de 94 a 97°C de 15 a 30 segundos, para romper los puentes de hidrógeno de la doble cadena del DNA y así hacerla accesible al apareamiento con los oligonucleótidos.
2. *Alineamiento.* Consiste en la disminución de la temperatura, generalmente entre 55 a 68°C por 30 a 60 segundos, para permitir que los oligonucleótidos (iniciadores o cebadores) se alineen o hibriden a las secuencias complementarias del DNA blanco. Las condiciones de alineamiento dependen de la concentración, composición de bases y longitud de los oligonucleótidos. Es una fase crítica de la reacción, ya que en ella se obtiene la especificidad adecuada.
3. *Extensión.* Se lleva a cabo a una temperatura intermedia de 68 a 72°C, en la cual la DNA polimerasa copia el DNA entre las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos.

Estas tres etapas de la reacción constituyen un ciclo térmico. El número óptimo de ciclos es dependiente del DNA blanco y usualmente va de 25 a 35 ciclos. Cuando cada ciclo térmico se completa, los fragmentos recientemente sintetizados sirven como DNA molde, y en los ciclos subsecuentes, el producto predominante será una sola clase de fragmento de DNA cuya longitud corresponde a la distancia entre los oligonucleótidos. Así, la repetición de los ciclos origina una acumulación exponencial de la secuencia amplificada.

Componentes de la PCR

- *DNA blanco o molde.* Corresponde al DNA genómico en estudio. La concentración ideal de DNA blanco en la reacción es aproximadamente de 300ng a 1µg.
- *Taq DNA Polimerasa.* Es una enzima termoestable recombinante obtenida a partir de bacterias *Thermus aquaticus*. Tiene un peso molecular de 93,910 Da y su temperatura óptima, en la que se observa su actividad máxima es entre 75 y 80°C. Presenta una tasa de incorporación de nucleótidos (Kcat) de ~150 nucleótidos/seg./enzima. Una preparación típica para PCR de 50 µl debe contener 1.25 unidades de *Taq* DNA polimerasa.
- *Oligonucleótidos.* También llamados iniciadores, cebadores o *primers*, son secuencias complementarias a la cadena molde cuya longitud es de 18 a 25 nucleótidos, muestran un contenido de G + C de 50-60% y delimitan la región de interés para su amplificación. Los cebadores son independientes del volumen de reacción e idealmente la concentración para cada uno es de 0.4 µmol.

- *Amortiguador*. El amortiguador para PCR 10X contiene Tris-HCl (pH 8.4) y KCl. Aporta a la reacción un pH óptimo para la enzima y es un reactivo dependiente del volumen de reacción. Además de que el potasio (catión) contenido se une a grupos fosfato del DNA y neutralizan sus cargas negativas favoreciendo el debilitamiento de las fuerzas de repulsión entre la cadena molde y los oligonucleótidos, estabilizando su hibridación.
- *Desoxirribonucleósidos trifosfatados* (dNTP's, 2'-deoxyribonucleoside-5'-triphosphates). Se utiliza una mezcla de cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) para su incorporación y formación de las nuevas cadenas de DNA. Es un reactivo dependiente del volumen de reacción y concentraciones de 200 μmol proporcionan resultados óptimos.
- *Cloruro de Magnesio* (Mg^{2+}). Es un cofactor de la polimerasa. Este catión proporciona estabilidad al complejo formado por el DNA molde, los oligonucleótidos y los dNTPs en la reacción. Su concentración es dependiente del volumen de reacción y una concentración de 1.5 mmol es adecuada, sin embargo puede ser determinada empíricamente en base a los oligonucleótidos utilizados.

Anexo 3. Gel de agarosa

1. Se disolvió 1 g de agarosa en 100 mL de solución amortiguadora TBE 1X (Tris-boratos-EDTA), para separar fragmentos menores a 1 kb.
2. Se calentó la suspensión resultante hasta formar una solución homogénea.
3. A la solución anterior, se le agregó 1 μ L de bromuro de etidio (0.5 mg). Sustancia que se intercala entre las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta.
4. Posteriormente la solución se vació en un molde con peines para formar los pozos y se dejó polimerizar durante 45 minutos, después se retiraron los peines.

Anexo 4. Electroforesis

1. El gel se colocó en la cámara de electroforesis. Los pozos deben de estar cerca del cátodo (polo negativo, color negro).
2. Se agrego solución de amortiguador TBE 1X hasta cubrir completamente el gel de agarosa.
3. Después se hizo una mezcla de 15 μL de la solución DNA en estudio y 1 μL del amortiguador de carga y se colocó en el pozo correspondiente. El amortiguador de carga permite que la muestra tenga el mismo pH que el amortiguador de la cámara, proporciona mayor densidad a la muestra para que se dirija al fondo del pozo y permite la visualización de las muestras debido al colorante contenido.
4. Se colocó una escalera de marcador de peso molecular para establecer el tamaño aproximado del fragmento visualizado.
5. Se tapó la cámara de electroforesis y se conectaron los electrodos a la fuente de alimentación. Se programó la fuente a 100 voltios y 90 minutos.
6. Una vez terminada la electroforesis se visualizan los fragmentos de DNA mediante luz UV y se capturó la imagen.

Anexo 5. Carta de consentimiento informado

“FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO C677T DEL GEN *MTHFR* Y NIVELES DE HOMOCISTEÍNA EN PACIENTES CON CARDIOPATIAS CONGÉNITAS Y PACIENTES CON LABIO HENDIDO CON O SIN PALADAR HENDIDO NO SINDRÓMICOS”

INVESTIGADORES

Dra. Constanza García Delgado.
Investigador Principal
Departamento de Genética

Dr. Alfredo Vizcaíno Alarcón
Investigador Suplente
Departamento de Cardiología

Estimado paciente y/o tutor:

Por medio de esta carta, lo invitamos a participar en el estudio mencionado arriba, el cual es una investigación que pretende conocer y entender mejor porque se presenta la enfermedad que tiene su hijo. Esta investigación estudia las características y los cambios que pudiera haber en el material hereditario que contiene la información para un desarrollo adecuado del corazón y del labio hendido con o sin paladar hendido, y que, al haber cambios puedan éstos causar alteraciones en este desarrollo. Por ello esta investigación puede proporcionarnos conocimientos que ayuden a otras personas en un futuro.

Queremos que usted sepa que participar en esta investigación es totalmente voluntario y que usted puede decidir no participar en el estudio y en este caso no perdería ninguna prestación a la que tiene derecho.

Si ustedes están de acuerdo en participar y dependiendo de la edad y condiciones de su hijo, además de explicarles a ustedes las características del estudio podemos también explicarle a él o a ella, las características del referido estudio y solicitar también su consentimiento.

En los párrafos siguientes se describe el estudio.

FINALIDAD DEL ESTUDIO: Su hijo tiene una alteración del desarrollo que aparece como una enfermedad del corazón presente desde el nacimiento (cardiopatía congénita), o labio hendido con o sin paladar hendido. Se sospecha que estas enfermedades tienen varias causas y una de ellas tiene que ver con alteraciones en el material hereditario, este material

contiene la información para desarrollarnos. A la manera en que está arreglada esta información se le llama gen y en el caso de las enfermedades mencionadas se piensa que un gen llamado *MTHFR* podría estar alterado o con cambios llamados polimorfismos, en especial el polimorfismo C677T y esto contribuiría a que se presentara la enfermedad. El propósito de este estudio es buscar los posibles cambios en el material genético de su hijo y el de ustedes, y saber si este gen está alterado, lo que nos ayudará a saber si realmente este gen tiene alguna participación en causar este tipo de enfermedades.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO:

Para este estudio, necesitamos tomarle a su hijo y a usted, una muestra de sangre, mediante el siguiente procedimiento:

- 1.- Con una jeringa desechable se le tomará a su hijo y a Usted una muestra de sangre de la vena del brazo, aproximadamente 2ml. Esta muestra será usada para el análisis de la molécula que contiene nuestros genes y se llama ADN.
- 2.- Queremos que sepa, que no daremos a conocer ninguna información acerca de usted ni de su familia que los pueda identificar, debido a que la información que se recabe es absolutamente confidencial y con fines de investigación y esta sí se publicará en revistas científicas internacionales.

BENEFICIOS: Se les dará a ustedes asesoramiento genético con toda la información que llegue a integrarse. Su colaboración permitirá obtener conocimiento que tal vez ayudará a otras familias que presenten problemas similares en un futuro.

RIESGOS Y MOLESTIAS: Los posibles riesgos de la extracción de sangre son los siguientes: molestia leve en el sitio por donde se le extrajo la sangre; a veces, la formación de moretones, desmayos y rara vez infección.

COSTOS: Tanto la extracción de muestras de sangre como las pruebas y cualquier consulta que usted tenga con el médico para hablar del estudio de investigación, así como los resultados no tendrán ningún costo para usted.

Si surgiera algún problema o tuviese usted una pregunta con respecto a este estudio, a sus derechos como participante en la investigación o a cualquier lesión relacionada con la investigación, deberá usted comunicarse con los médicos del departamento de cardiología o genética o con el investigador principal al teléfono 52 28 99 17 ext. 1495. Si deseara hablar con alguien más acerca del protocolo, aparte de los investigadores relacionados, puede usted dirigirse a la Subdirección de Investigación a la ext. 1482. O con la Dra. Verónica Morán, Jefe del Departamento de Genética a la extensión 1495 o al celular 04455 3075 6732

Le sugerimos que conserve una copia de este documento para consultarla si es necesario.

He leído las explicaciones acerca de este estudio y se me ha dado la oportunidad de discutirlos y de hacer preguntas. Por este medio otorgo mi consentimiento para participar en el estudio.

México, D.F. _____ de _____ del _____

Nombre y firma del paciente _____ (De ser el caso)

Nombre y firma de la Madre

Nombre y firma del Padre

Nombre y firma de testigo 1

Parentesco con el paciente

Dirección

Nombre y firma de testigo 2

Parentesco con el paciente

Dirección

EL PRESENTE DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO HA SIDO APROBADO PARA USARSE ENTRE LOS AÑOS DE 2007 Y DE 2010.