



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Asociación de los polimorfismos rs13306560 y rs1801133 del gen *MTHFR* con hipertensión arterial esencial en población infantil y adulta mexicana”

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias Bioquímicas**

PRESENTA:

Q.F.B. Luis Javier Cano Martínez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Ileana Patricia Canto Cetina
Facultad de Medicina (UNAM)

COMITÉ TUTOR

Dra. Marta Menjivar Iraheta
Facultad de Química (UNAM)

Dr. Samuel Canizales Quinteros
Facultad de Química (Unidad periférica INMEGEN UNAM)

MÉXICO, D. F. Marzo, 2015



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.

*Dedicada a
Paola Elizabeth Villeda Mandujano
Diego Cano Villeda
Fernando Cano Villeda*

*Todo lo que hagas en la vida será insignificante,
pero es importante que lo hagas,
por que nadie más lo hará.*

Mahatma Gandhi

*“Cuando quieras emprender algo,
habrá un montón de gente que te dirá que no lo
hagas. Cuando vean que no te pueden detener,
te dirán como lo tienes que hacer y,
cuando finalmente lo logres,
dirán que siempre han creído en ti”*

Dante Gebel

Agradecimientos

- Se le da un atento agradecimiento al Consejo Nacional De Ciencia Y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca durante la realización de mis estudios de maestría (número de registro 288798).
- Este trabajo pudo ser llevado a cabo por el financiamiento otorgado por el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SS/IMSS/ISSSTE-CONACYT, referencia 161909.
- Se agradece al “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado” por darme apoyo económico, para asistir al XXXVIII Congreso Nacional de Genética Humana en donde presente parte de mis resultados experimentales.

Agradecimientos

- Agradezco en primera instancia a la Dra. Ileana Patricia Canto Cetina por su apoyo, orientación y por permitirme participar en este gran proyecto. Gracias Dra. Canto.
- Al Dr. Ramón Coral por el apoyo que me brindó en el laboratorio por sus sugerencias y consejos.
- A los miembros de mi comité tutor, la Dra. Marta Menjivar Iraheta y al Dr. Samuel Canizales Quinteros, que siempre me dieron consejos y recomendaciones para este trabajo.
- Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa, a la Dra. María Cristina Fernández Mejía, al Dr. Jaime Mas Oliva, al Dr. Rafael Villalobos Molina y al Dr. José Pedraza Chaverri por revisar este escrito y realizar las correcciones, sugerencias y comentarios pertinentes.
- A mis compañeros y amigos de laboratorio MVZ Agustín Coronel, M. en C. Jorge Palomino y al Dr. Bladimir Roque por los consejos y comentarios que compartimos siempre a favor de la ciencia.

Dedicatoria

- Este trabajo se lo dedico a toda mi familia que siempre ha apoyado.
- En especial a mis padres Luis Cano y Giovanna Martínez que siempre han confiado en mí. Gracias.
- A mí hermano David Cano que alguna vez se intereso en la ciencia y en mí trabajo.
- A mí esposa Paola Villeda que me ha apoyado en las buenas y en las malas. A mis hijos Diego Cano y Fernando Cano por su amor y cariño.
- A mis amigos que siempre me han apoyado. Arturo (tío), Oscar, Cesar, Gabriel, Soon, José, Paco, Daniel, Armando y todos los que me faltaron muchas gracias por su apoyo.
- Al Sr. Julio Villeda y la Sr. María del Refugio Mandujano gracias por su apoyo.
- Y a toda mí familia, mí abuelita Juanita y a todos mis tíos, primas, etc gracias.

La presente tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la División de Investigación Biomédica, Subdirección de Enseñanza e Investigación del centro Médico Nacional "20 de Noviembre ", Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE).

I. Índice general

I. INDICE GENERAL.....	I
II. INDICE DE FIGURAS.....	III
III. INDICE DE TABLAS.....	III
IV. LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
1. RESUMEN.....	1
2. GENERALIDADES.....	1
2.1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL.....	2
2.2. CLASIFICACIÓN DE HIPERTENSIÓN.....	3
2.3. EPIDEMIOLOGÍA.....	4
2.4. HIPERTENSIÓN ARTERIAL ESENCIAL.....	4
2.5. ETIOLOGÍA.....	5
2.6. LA PRE-HTA EN NIÑOS Y ADOLESCENTES.....	5
2.7. FISIOPATOLOGÍA.....	5
2.8. ESTRÉS OXIDATIVO.....	6
2.9. HOMOCISTEÍNA.....	7
2.10. METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA.....	8
2.11. ENZIMA MTHFR.....	11
2.12. GEN MTHFR.....	11
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	15
5. JUSTIFICACIÓN.....	16
6. HIPÓTESIS.....	17
7. OBJETIVO GENERAL.....	17
8. OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
9. DISEÑO METODOLÓGICO.....	18

10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
11.	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	23
12.	DIAGRAMA METODOLÓGICO.....	24
13.	DISEÑO METODOLÓGICO	25
13.1	EXTRACCIÓN DE DNA	25
13.2	GENOTIPIFICACIÓN POR SONDAS TAQMAN®	25
13.3	ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR.....	26
14.	RESULTADOS.....	26
15.	DISCUSIÓN.....	32
16.	CONCLUSIONES.....	38
17.	PERSPECTIVAS	39
18.	ARTÍCULO.....	40
	REFERENCIAS	42
	ANEXOS.....	49
	ANEXO 1. EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL.....	49
	ANEXO 2. CUANTIFICACIÓN DE AND.....	50
	ANEXO 3. INTEGRIDAD DEL AND.....	51
	ANEXO 4. FUNDAMENTO DE SONDAS TAQMAN®.....	52
	ANEXO 5. CONDICIONES DE PCR.....	53
	ANEXO 6. CARTA DE CONSENTIMIENTO CONTROLES.....	54
	ANEXO 7. CARTA DE CONSENTIMIENTO PACIENTES.....	56

II. Índice de figuras

Figura 1. Vía metabólica de la homocisteína y el ciclo del ácido fólico.	10
Figura 2. Mapa HGDP que muestra la distribución de la variante rs1801133.....	12
Figura 3. Concentración de homocisteína en plasma.....	13
Figura 4. Mapa HGDP que muestra la distribución de la variante rs13306560.....	12
Figura 5. Posiciones de las variantes rs1801133 y rs13306560 en el gen MTHFR.....	13
Figura 6. Gráficos de discriminación alélica.....	28
Figura 7. Diagrama esquematizado de la región promotora del gen MTHFR.....	35
Figura 8. Grafico de Haploview de desequilibrio de ligamiento.....	36
Figura 9. Fundamento de sondas Taqman®.....	52

III. Índice de tablas

Tabla 1. Valores de referencia para presión arterial.....	2
Tabla 2. Valores de referencia en percentiles.....	3
Tabla 3. Estadios de la hipertensión en adultos.....	3
Tabla 4. Estadios de la hipertensión en niños y adolescentes.....	4
Tabla 5. Parámetros clínicos y bioquímicos en niños.....	27
Tabla 6. Parámetros clínicos y bioquímicos en adultos.....	28
Tabla 7. Asociación de rs1801133 con hipertensión.....	31
Tabla 8. Asociación de rs13306560 con hipertensión.....	31
Tabla 9. Frecuencias de haplotipos.....	31

Lista de abreviaturas

Abreviatura	
HTA	Hipertensión arterial
PAS	Presión arterial sistólica
PAD	Presión arterial diastólica
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
HPT	Homocisteína plasmática total
NO	Óxido nítrico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
MTHFR	Metiltetrahidrofolato reductasa
CBS	Cistationina β -sintasa
MS	Metionina sintasa
MAT	Metionina adenosil transferasa
SAM	S-adenosil metionina
MT	Ado-met dependiente de transaminación
SAH	S-adenosil homocisteína
AH	Adenosil homocisteínasa
CSE	5 γ -cistationasa
THF	Tetrahidrofolato
SHM	Serina hidroximetilasa
5,10-MTHF	5,10-metiltetrahidrofolato
10-MTHF	10-metiltetrahidrofolato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GWAS	Análisis de secuencia de genoma completo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
HWE	Equilibrio de Hardy-Weinberg

1. Resumen

En México la prevalencia de la hipertensión arterial (HTA) en adultos es de 31.5% (ENSANUT 2012). La HTA esencial representa más del 90% del total de pacientes con esta patología, de la cual aún no se conoce la etiología. Sin embargo, se han descrito diversos polimorfismos en el gen *MTHFR* que se encuentran asociados con HTA esencial en diversas poblaciones. Uno de los polimorfismos más estudiado es el rs1801133 el cual produce un cambio de citosina por timina en la posición 677 (C677T) en el exón 4 del gen, lo que genera una versión termolábil de la enzima MTHFR, reduciendo su actividad e incrementando la concentración en plasma de homocisteína, aminoácido no proteico relacionado con el desarrollo de HTA esencial. Por otro lado, un estudio de análisis de secuencia de genoma completo (GWAS) de variantes comunes (>30000) y variantes poco comunes (>2000), reveló una fuerte asociación entre el incremento de la presión arterial distólica (PAD) y presión arterial sistólica (PAS) de 24 h con el alelo A de la variante rs13306560 en población caucásica, esta variante se sitúa en la región promotora del gen *MTHFR*. Es por ello, que nosotros decidimos evaluar si una o ambas variantes se encuentran asociadas a HTA esencial en población adulta e infantil mexicana. Los resultados de nuestro estudio revelan que la población mexicana presenta una frecuencia alélica de 52.8% para el alelo T de la variante rs1801133, siendo diferente a lo reportado en población europea (31%), y asiática (36%) por el HAPMAP. Mientras que para la variante rs13306560 la frecuencia alélica del alelo A es de 2.3%, similar a lo reportado a nivel mundial por el HAPMAP en población mexicana (2%) y mundial (3%). El análisis estadístico hace evidente que la variante rs1801133 no presenta una asociación con HTA esencial en población infantil mexicana ($p=0.5020$), sin embargo en población adulta existe una diferencia significativa ($p=0.0165$), encontrándose el alelo T con mayor frecuencia en la población normotensa. Por otro lado la variante rs13306560 presenta una asociación con HTA esencial en la población adulta mexicana ($p=0.0008$), mientras que en población infantil parece existir una tendencia ($p=0.0732$). El análisis en Haploview y *Phase* revela que las variantes se encuentran en desequilibrio de ligamiento y que el haplotipo AC se encuentra asociado con el incremento en la PAD y PAS en población adulta ($p=0.001$) pero no en población infantil.

2. Generalidades

2.1. Hipertensión arterial

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, a la Asociación Americana del corazón y a la Eighth Joint National Committee (JNC 8), la hipertensión arterial (HTA) es definida como el incremento sostenido en la presión arterial sistólica (PAS) y/o diastólica (PAD) en tres mediciones distintas (Tabla 1) (Mancias y cols., 2013; Rosas y cols., 2004).

Tabla 1 Valores de referencia para presión arterial e hipertensión en adultos.

Categoría	Presión sistólica (mm Hg)	Presión diastólica (mm Hg)
Nivel óptimo	<120	<80
Normal	120 – 129	80 – 84
Normal alta	130 – 139	85 – 89
Hipertensión	140 o más	90 o más

Tomado y modificado de Mancias y cols, 2013.

Por otro lado, en niños y adolescentes no se presentan los mismos criterios, en ellos se debe tomar en cuenta la edad, el sexo y la altura, debido a que se encuentran en crecimiento. De acuerdo con “**The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents**” la definición de niño o adolescente hipertenso se basa en la distribución normal de la presión arterial en niños sanos. La presión arterial normal se define como la PAS y PAD reportada en por lo menos tres mediciones que tienen un percentil <90th con relación a la edad, sexo y altura. La hipertensión en niños y adolescentes se define como el incremento de la PAS y/o PAD en la medición de por lo menos tres ocasiones y que tienen un percentil >95th con relación a la edad, sexo y la altura. Los niños y adolescentes con niveles intermedios de PAS o PAD que son percentil >90th pero <95th y con un nivel de PA \geq 120/80 mm Hg se consideran individuos pre-hipertensión de acuerdo a la **The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure** (JNC 7) (Tabla 2) (Ellis y Miyashita, 2011).

Tabla 2 Valores de referencia en percentiles para valores de presión arterial en niños y adolescentes.

Niños y adolescentes	
	PAS o PAD Percentiles
Normal	<90th
Normal alta	≥90th <95th
Hipertensión	≥95th

Abreviaturas, presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD). Tomado y modificado de National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents, 2004.

2.2. Clasificación de hipertensión

Los pacientes adultos diagnosticados como hipertensos se clasifican en base a las cifras de presión arterial en milímetros de mercurio (mm Hg) registrados tanto en la PAD como en la PAS (Tabla 3). Otro criterio de clasificación es el de predominio de la HTA en los pacientes. Existe HTA de predominio diastólico, o incluso diastólicos puros, lo cual se ha asociado con un aumento de la resistencia vascular periférica (característica de la HTA idiopática en jóvenes y adultos-jóvenes). También se puede presentar la HTA de predominio sistólico o sistólico puro, el cual se ha relacionado con la compliancia debido a la edad, que puede provocar otros padecimientos como isquemia coronaria e insuficiencia cardíaca (Franklin, 2007).

Tabla 3 Estadios de la hipertensión en adultos.

Categoría	Presión sistólica (mm Hg)	Presión diastólica (mm Hg)
Estadio I	140 – 159	90 - 99
Estadio II	160 - 179	100-109
Estadio III	≥180	≥110

Tomado y modificado de la J Eighth Joint National Committee (JNC 8).

Los niños y adolescentes diagnosticados como hipertensos se clasifican de acuerdo al valor de percentiles obtenidos del promedio de PAS y PAD en relación con la edad, el sexo y la altura (Tabla 4).

Tabla 4 Estadios de la hipertensión en niños y adolescentes.

Niños y adolescentes	
	PAS o PAD Percentiles
Hipertensión estadio I	≥95th < 99th
Hipertensión estadio II	≥99th

Tomado y modificado de National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Adolescents, 2004. Children and Adolescents.

2.3. Epidemiología

En todo el mundo, aproximadamente mil millones de personas sufren HTA. En México de acuerdo a la **Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012** (ENSANUT 2012), la prevalencia de HTA es de 31.5% en adultos, además de colocar a la obesidad y diabetes como *factores de riesgo* para esta enfermedad. La ENSANUT 2012 registro una prevalencia mayor ($p < 0.05$) en la región norte del país (36.4%) en comparación con el sur (28.5%). En México, por sus características de distribución poblacional, donde aún la mayor parte de la población entre 20 y 69 años la conforman sujetos <50 años (distribución piramidal) (Barquera y cols., 2010), la mayor prevalencia de hipertensión arterial es de predominio diastólico (Wolf-Mater y cols., 2003).

A nivel mundial la prevalencia de HTA en niños y adolescentes ha sido poco estudiada algunos reportes sugieren que esta va del 7.6% a 26% y esta puede aumentar hasta 30% en niños y adolescentes con obesidad (Stabouli S. y cols., 2005; Bassareo y Mercurio, 2014). En México la ENSANUT 2012 no reportó la prevalencia en población infantil, sin embargo algunos autores proponen que la prevalencia en población mexicana va del 5.4% al 21% (Urrutia-Rojas y cols., 2006).

2.4. Hipertensión arterial esencial

La HTA esencial o de causa desconocida representa más del 90% de los casos de hipertensión, el porcentaje restante se define como hipertensión arterial secundaria y esta puede ser causada por diversos factores como lo son las alteraciones endocrinas

(hiperaldosteronismo primario), enfermedad renal (Glomerulonefritis), entre otras causas. (Oparil y cols., 2003).

2.5. Etiología

En la actualidad no se conoce la etiología de la HTA esencial, se sabe que es una enfermedad multifactorial que guarda estrecha relación con la edad, el medio ambiente, el estilo de vida, el sexo, predisposición genética, el estrés oxidativo (Oparil y cols., 2003; Conen y cols., 2009) y factores co-mórbidos, tales como diabetes, obesidad y dislipidemias (Carretero y Oparil, 2000).

2.6. La pre-hipertensión en niños y adolescentes

El desarrollo de la HTA es lento y su patogenia generalmente inicia en la infancia (Bassareo y Mercurio, 2014). En otras palabras, la presión arterial elevada en la infancia predice el resultado en la vida futura de un individuo.

Algunos estudios proponen que el aumento en la PAS en los niños predice la formación de arterias más rígidas en la edad adulta. Un estudio longitudinal realizado en a 138 niños finlandese a diferentes edades (6 meses, 7 años y 15 años), reveló que el 14% de los adolescentes diagnosticados con pre-hipertensión desarrollarán 2 años más tarde HTA y entre los adolescentes con pre-hipertensión y obesidad, el 68% de los hombres y el 43% de las mujeres desarrollaron HTA 2 años más tarde, concluyendo que la obesidad y el sexo (masculino) en la adolescencia se asocian con el desarrollo de HTA en la edad adulta (Fuentes, 2002).

2.7. Fisiopatología

La presión arterial sistémica está determinada principalmente por el gasto cardíaco y la resistencia periférica total, que son controlados por una red compleja de sistemas que

interactúan entre ellos como lo son: del sistema renal, el sistema nervioso, el sistema endocrino, el sistema vascular entre otros (Padmanabhan et al., 2008).

Hasta el momento son muchos los sistemas que han sido implicados en el desarrollo de la HTA, como lo es el aumento de la actividad del sistema nervioso simpático (posiblemente relacionado con una mayor exposición a la respuesta al estrés psicosocial), la sobreproducción de hormonas de retención de sodio y vasoconstrictores; alto consumo de sodio a largo plazo, la ingesta alimentaria inadecuada de potasio y calcio; la secreción de renina desregulada, las deficiencias de vasodilatadores (como puede ser la prostaciclina, el óxido nítrico y los péptidos natriuréticos) y alteraciones en la expresión del sistema caliceína-quinina (las cuales afectan el tono vascular y el manejo renal de sal) (Calhoun y cols., 2000; Oparil y cols., 2003; Carretero y Oparil., 2000), así como el incremento en la formación de *especies reactivas de oxígeno* (ROS) las cuales pueden provocar la pérdida de la homeostasis vascular. Es por ello, que se ha relacionado a genes que codifican a las proteínas que regulan o participan en estos sistemas como posibles marcadores de riesgo para esta enfermedad.

2.8. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es definido como una excesiva producción de ROS que desbanca a los mecanismos de defensa antioxidante. En condiciones fisiológicas normales, la concentración de antioxidante es en órdenes de magnitud superior a la de ROS sobre la que estos actúan. Sin embargo, ciertas circunstancias pueden incrementar la concentración de ROS provocando peroxidación lipídica de las membranas celulares dañando su estructura, fluidez y permeabilidad, particularmente de las células endoteliales.

Por otro lado, las ROS también pueden re-orientar la vía del ácido araquidónico celular de prostaglandina 2 a tromboxano A₂, además de disminuir la acción de la sintasa de óxido nítrico, lo que generaría vasoconstricción y activación del sistema de la coagulación (Pacheco, 2003).

2.9. Homocisteína

La tercera **Encuesta Nacional de Salud y Nutrición** (NHANES III) en Estados Unidos, informó un incremento en la prevalencia de HTA (2 a 3 veces) en personas adultas con un nivel elevado de homocisteína en plasma, comparadas con adultos que tienen niveles normales de homocisteína. Los niveles de homocisteína se incrementan por factores nutricionales, como lo es la falta de folato, vitamina B₆ y B₁₂ en la dieta (Viridis y cols., 2003; Lim y Cassano, 2002; Stipanuk, 1998). Por otro lado, factores genéticos se han asociado con alteraciones en la vía metabólica de la homocisteína, lo cual lleva a un aumento moderado en su concentración plasmática (Guéant- Rodríguez y cols., 2006).

Por otro lado, estudios realizados en niños y adolescentes del norte de Grecia reveló una correlación positiva entre los niveles elevados de homocisteína (>10 micromoles / L) y el índice de masa corporal, circunferencia de cintura, PAS y PAD, mientras que la vitamina B₁₂ y el folato se correlacionaron negativamente (Papandreou, 2006).

Otro estudio realizado en 52 niños sanos residentes de la zona metropolitana de Monterrey (México) determinó la concentración de homocisteína en plasma por cromatografía líquida de alta resolución. Revelando que los niveles de homocisteína plasmática es mayor en los niños mexicanos estudiados (9.78 ± 1.73 micromoles / L) que a lo reportado en poblaciones europeas; del norte de Grecia (7.8 micromoles / L) (Papandrou, 2006).

La homocisteína es un aminoácido azufrado no proteico, que se origina a partir de la metionina, aminoácido que proviene de la dieta (Figura 1). La homocisteína existe en el plasma humano en diversas formas. La mayoría de los estudios clínicos con homocisteína se basan en la medición de homocisteína plasmática total que incluyen homocisteína y sus derivados disulfuros (disulfuros mixtos, homocisteína unida a tiolactona o unida a proteínas). La concentración normal de homocisteína total de plasma es de 5 a 15 μ M en ayuno (Mayer y cols., 1996). Los valores elevados se clasificaron arbitrariamente como leves (15-30 μ M),

intermedio (30-100 μM) y severo ($>100\mu\text{M}$) en homocisteína total de plasma (Kang y cols., 1992).

La acumulación de homocisteína puede elevar la presión arterial a través de múltiples mecanismos, incluyendo su efecto sobre la integridad del endotelio vascular (Kang y cols., 1992). Se ha demostrado que la administración de homocisteína causa daño tanto a células endoteliales *in vitro* (Kang y cols., 1992) como en animales (Mayer y cols., 1996). En otros estudios en cultivos celulares, sea observado que altas concentraciones de homocisteína inducen estrés oxidativo en el endotelio y la disminución de óxido nítrico disponible, el cual es un potente vasodilatador por lo que se afecta la vasodilatación del endotelio (Nappo y cols., 1999). Esto se debe a que una pequeña fracción de homocisteína permanece reducida, mientras que cerca del 98% se encuentra presente en forma oxidada, debido a que contiene un grupo sulfhidrilo, el cual puede sufrir una rápida auto-oxidación en presencia de iones de oxígeno y metálicos (hierro y cobre) generando ROS. Estas ROS altera la función endotelial, media la proliferación celular de musculo liso y promueve la activación de plaquetas y leucocitos, alterando la homeostasis vascular (Steed y Tyagi, 2011). Además se han asociado diversas variantes con alteraciones en la producción de óxido nítrico (ON) en pacientes con HTA esencial (Benjafield y Morris, 2000).

2.10. Metabolismo de la homocisteína

La homocisteína forma parte del ciclo del metilo activo en donde es metabolizada para ser reutilizada y generar metionina (un aminoácido esencial) o para ser eliminada en forma de cisteína por la vía urinaria. Para que la homocisteína pueda ser reutilizada es necesario que se lleve a cabo una reacción de re-metilación, lo cual puede suceder por dos vías. La reacción de re-metilación más importante es catalizada por la metionina sintasa (MS), que utiliza como sustrato el 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) y como coenzima a la metil-cobalamina (vitamina B12) para generar metionina (Finkelstein, 1998). La segunda vía de re-metilación se localiza principalmente en el hígado y riñón, es catalizada por la betaína-homocisteína metiltransferasa (BHMT) (Matadamas y cols., 2002) la cual utiliza como dador de grupo metilo a la betaína, la cual proviene del metabolismo de la colina (Figura 1). Sin embargo, se ha observado que la suplementación con colina no ayuda a

disminuir la concentración de homocisteína en plasma en hombres mexico-americanos (Veenema y cols., 2008).

Existe una compleja interacción entre múltiples factores genéticos, metabólicos y ambientales que deben permanecer en equilibrio para mantener la concentración homocisteína en niveles normales. Existen cuatro alteraciones que explican el aumento de homocisteína en plasma: (1) la dieta rica en metionina, (2) la deficiencia de vitaminas (B₆, B₁₂ y ácido fólico), (3) alteraciones genéticas en las enzimas que regulan el metabolismo de homocisteína como: la cistationina β sintasa (CBS), metionina sintasa (MS) y la metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y (4) la disminución de la función renal (Steed y Tyagi, 2011). Diversos estudios han reportado que las anomalías genéticas en las enzimas responsables del metabolismo de la homocisteína, como los son: CBS, MS y MTHFR, son capaces de producir una elevación en los niveles de homocisteína plasmática, la gravedad depende del sitio de las mutaciones genéticas (Steed M. y Tyagi S, 2011).

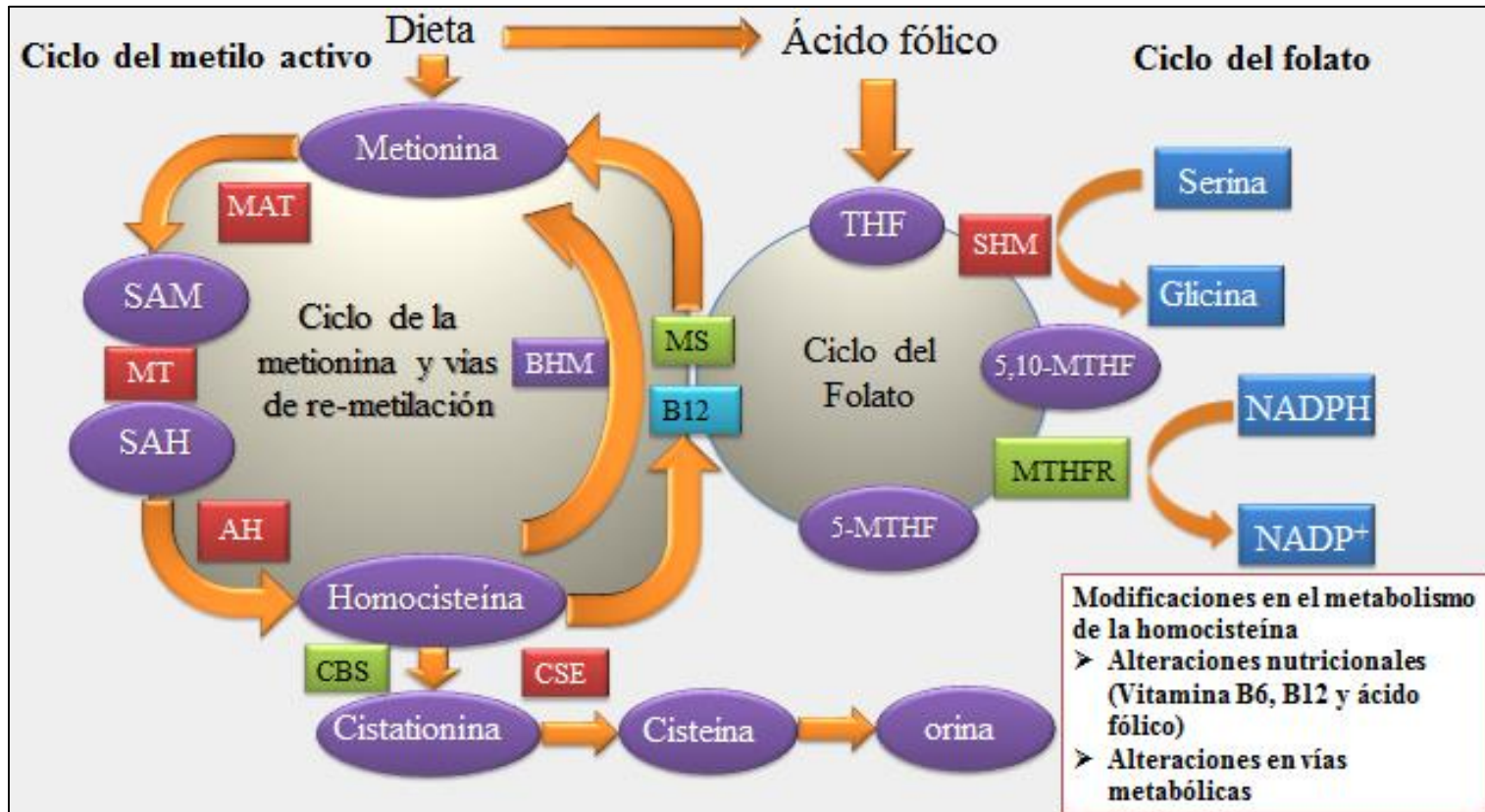


Figura 1. Vía metabólica de la metionina-homocisteína y ciclo del ácido fólico. Las alteraciones nutricionales como la deficiencia de vitamina B6, B12 o ácido fólico, así como a . Abreviaturas: metionina adenosil transferasa EC 2.5.1.6 (MAT); S-adenosil metionina (SAM), Ado-met dependiente de transaminación (MT); S-adenosil homocisteína (SAH); adenosil homocisteínasa EC 3.3.1.1(AH); cistationina β sintasa EC 4.2.1.22 (CBS); 5 γ-cistationasa EC 4.4.1.1 (CSE); tetrahidrofolato (THF); serina hidroximetilasa EC 2.1.2.1(SHM); 5,10-metiltetrahidrofolato (5,10.MTHF); metiltetrahidrofolato reductasa EC 1.7.99.5 (MTHFR); 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF); metionina sintasa EC 2.1.1.13 (MS).

2.11. Enzima MTHFR

La enzima metiltetrahidrofolato reductasa MTHFR (EC 1.7.99.5) (OMIN: 607093) tiene un papel indirecto, pero básico, en la re-metilación de la homocisteína, ya que participa en la reducción de 5,10-MTHF a 5-MTHF, el cual es utilizado como sustrato por la enzima MS en la re-metilación de la homocisteína (Finkelstein, 1998). Se ha reportado que afectación en esta enzima puede modificar el metabolismo de la homocisteína.

2.12. Gen MTHFR

El gen *MTHFR* se localiza en la región cromosómica 1p36.3 en el humano. Está constituido por 11 exones y codifica para una enzima de 656 aminoácidos. La variante polimórfica más estudiada de este gen es la variante rs1801133 de la cual se han realizado diversos estudios de asociación con enfermedades cardiovasculares (Frederiksen y cols., 2004)

Esta variante (rs1801133) produce un cambio de citosina (C) por timina (T) en la posición 677 (C677T) del exón 4 causando un cambio en el marco de lectura, lo cual modifica la secuencia de residuos de aminoácidos (alanina por valina) en la proteína. Este cambio da lugar a una enzima MTHFR termolábil con una actividad específica disminuida y residual en experimentos *in vitro* (Frosst y cols., 1995).

La variante rs1801133 tiene una gran heterogeneidad a nivel mundial. Mientras que países del norte de Europa, Asia y de África presentan una frecuencia alélica mayor para el alelo C (>70%), en algunos países centro y sudamérica la frecuencia alélica para el alelo C es menor (58%) según lo informado en el Proyecto Internacional de Hapmap y el Proyecto de la Diversidad del Genoma Humano (HGDP) (Figura 2), sin embargo, existen varios estudios en población mexicana que han reportado incluso una frecuencia alélica menor y una frecuencia mayor del alelo T (55%) (Guéant-Rodríguez y cols., 2006; Canto y cols., 2007; Coral-Vázquez y cols. 2013).

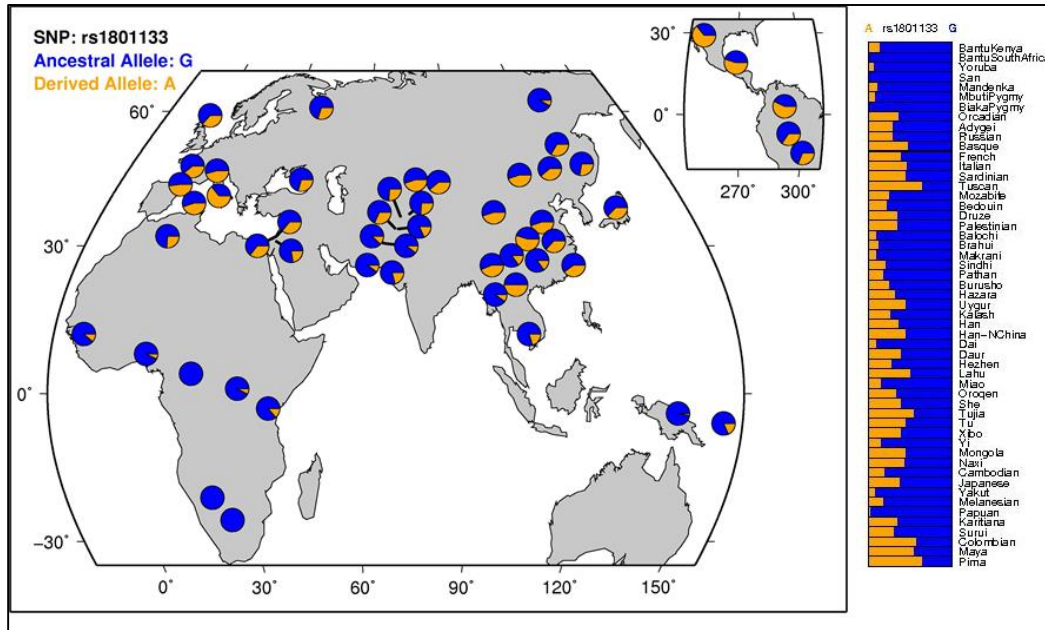


Figura 2. Mapa HGDP que muestra la distribución de la variante rs1801133 en diferentes grupos étnicos. Tomado y modificado del HGDP <http://www.hagsc.org/>

En estudios realizados en población mexicana existe controversia, debido que algunos autores han asociado a esta variante (T) con enfermedades cardiovasculares como trombofilia (Parra, 2007) sin embargo, otros estudios han reportado que esta variante presenta un factor protector contra preeclampsia severa (Canto y cols., 2007).

Guéant-Rodriguez y colaboradores reportaron la asociación de los homocigotos TT de la variante (rs1801133) con el aumento en la concentración plasmática de la homocisteína en población del oeste de África, del norte de Italia y del noreste y este de Francia. Sin embargo, no encontraron esta asociación en población del centro de México. Los autores proponen la participación de ácido fólico como modulador de la concentración de homocisteína, mientras menor es la ingesta de ácido fólico la asociación de la variante (T) con el incremento de homocisteína en plasma es significativa ($p < 0.05$). De esta manera sugieren la hipótesis gen-nutriente entre el gen *MTHFR* y el ácido fólico, en donde a mayor ingesta de ácido fólico el efecto de la variante T como factor de riesgo es menor (Figura 3) (Guéant-Rodriguez y cols., 2006).

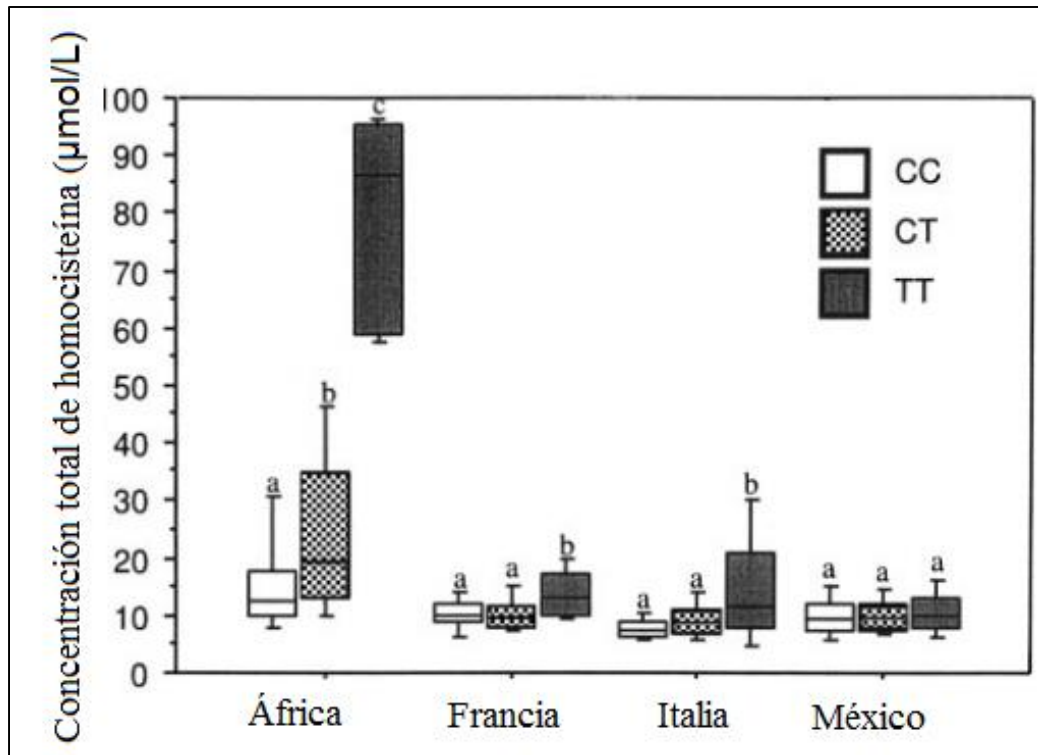


Figura 3. Concentración de homocisteína en plasma de acuerdo a los genotipos de rs1801133 del gen *MTHFR* en poblaciones de África, Francia, Italia y México. Se observa que en población africana la presencia del genotipo CC se asocia al incremento en la concentración de homocisteína en plasma, no así en población mexicana. El cambio de letra en las columnas se refiere a diferencia significativa (a no es significativa y b es significativa) ($p < 0.005$). Tomado y modificado de Guéant-Rodríguez y cols., 2006.

Por otro lado, Tomaszewski y colaboradores (2010), llevaron a cabo un estudio de “genome-wide association study” (GWAS) a gran escala de individuos de origen étnico caucásico con variaciones de la presión sanguínea ambulatoria en 24h. Los investigadores describieron una fuerte asociación del polimorfismo rs13306560 y la media de la presión sanguínea diastólica en 24h y posteriormente replicaron estos resultados en relación a la presión diastólica sanguínea media en dos cohortes adicionales ($N > 6000$) (Tomaszewski y cols., 2010).

Este polimorfismo se localiza en la región promotora del gen *MTHFR* (Figura 4). El alelo ancestral de este polimorfismo se encuentra en el centro de la parte más conservada del promotor tanto en primates y otros mamíferos como en vertebrados superiores. Lo cual hace referencia a la relevancia biológica de dicha variante genética en la fisiología humana. La

variante rs13306560 representa un cambio de guanina (G) por adenina (A), aproximadamente a -23pb rio arriba del sitio de inicio de la transcripción, la frecuencia alélica de la variante (G) es de 98% y la variante A solo el 2% a nivel mundial, en México la frecuencia alélica es muy parecida 97% para la variante (G) y 3% para (A) en población general (HAPMAP).

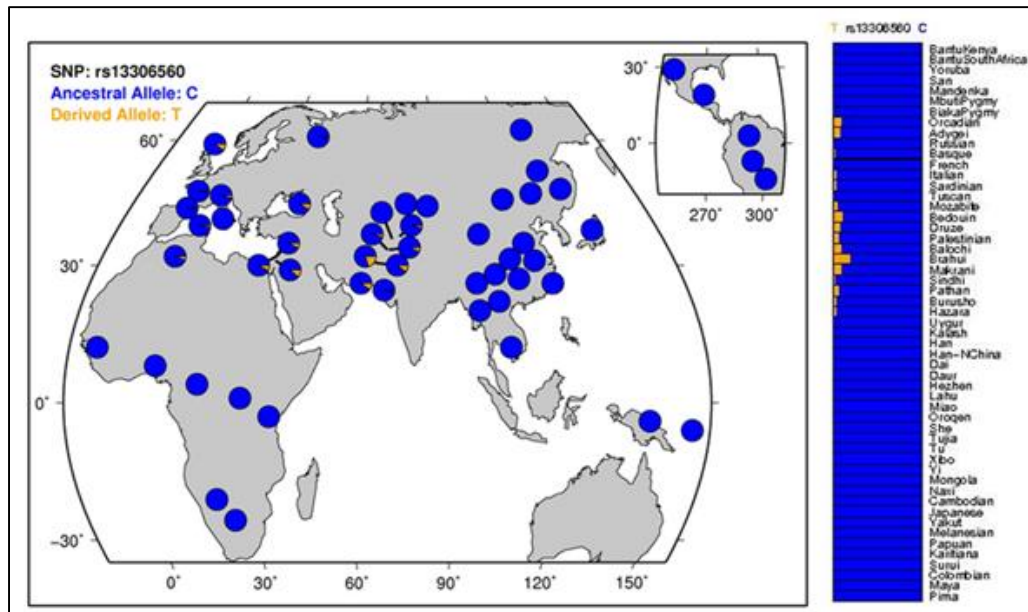


Figura 4. Mapa HGDP que muestra la distribución de la variante rs13306560 en diferentes grupos étnicos. Tomado y modificado de HGDP <http://www.hagsc.org/>

En diferentes estudios las variantes rs1801133 y rs13306560 del gen *MTHFR* (Figura 5) han sido asociado con cambios en la presión arterial en diversas poblaciones, por lo que es importante analizar si estas variantes se encuentran asociadas a HTA esencial en nuestra población.

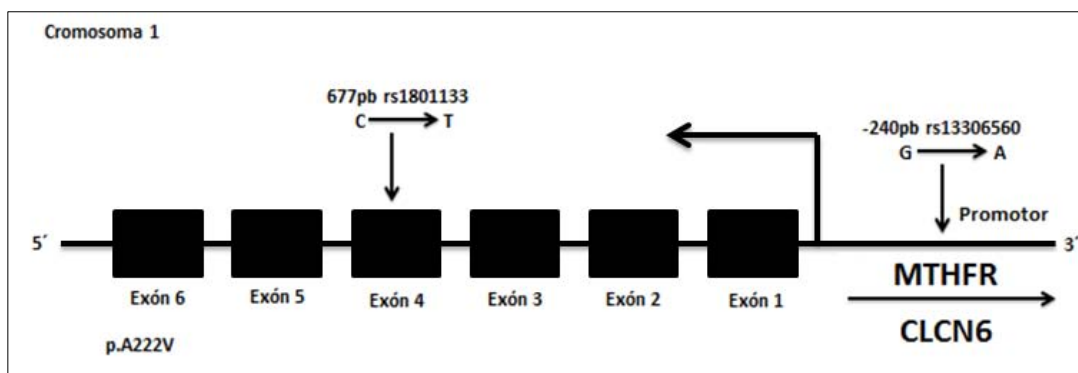


Figura 5. Posiciones de las variantes rs1801133 y rs13306560 en el gen *MTHFR*

3. Planteamiento del problema

En México de acuerdo a la ENSANUT 2012 cerca del 31.5% de la población adulta es afectada por la HTA. Se sabe que los niños también pueden presentar HTA, sin embargo no existe un dato oficial sobre la prevalencia de esta enfermedad en población mexicana, algunos autores proponen que esta puede ser entre el 5-21%. De ellos más del 90% corresponde a HTA esencial. Hasta el momento, no se conoce la etiología de la HTA esencial. Sin embargo, se ha propuesto que el estrés oxidativo puede ser uno de los mecanismos que participan en el desarrollo de la HTA esencial. Se sabe que las variantes genéticas pueden modificar la expresión o el marco de lectura de genes que codifican para las proteínas responsables de la regulación del estrés oxidativo. Como lo es la enzima MTHFR que se encarga de regular el metabolismo de la homocisteína un metabolito secundario que puede sufrir una rápida auto-oxidación en presencia de iones metálicos y oxígeno, y generar ROS que se han asociado con estrés oxidativo y el desarrollo de HTA esencial. Por lo que nos hacemos la siguiente pregunta de investigación.

4. Pregunta de investigación

- ¿Las variantes rs13306560 y rs1801133 del gen *MTHFR* se encuentra asociados con la presencia de HTA esencial en población infantil y adulta mexicana?

5. Justificación

La HTA es una enfermedad multifactorial que afecta cerca del 26% de la población mundial. En México esta enfermedad afecta a más del 30% de la población, por lo cual es considerada un problema de salud pública. Hasta el momento no se conoce la etiología de esta enfermedad, sin embargo estudios genómicos han asociado a variantes en el gen *MTHFR* (rs1801133) con el desarrollo de HTA esencial en población caucásica y asiática. Por otro lado, la variante rs13306560 del mismo gen se ha asociado con el incremento de la PAD y PAS en población caucásica. Por lo que es importante, conocer si estas variantes también se asocian con el incremento en la presión arterial en la población adulta e infantil mexicana. Para poder contar con marcadores genéticos que puedan predecir el riesgo de a desarrollar HTA esencial en la población mexicana.

6. Hipótesis

El alelo A de la variante rs13306560 y el alelo C de la variante rs1801133 del gen *MTHFR* se encuentra(n) asociado(s) con la presencia de HTA esencial en población infantil y adulta mexicana.

7. Objetivo general

- Analizar si la variante rs13306560 y rs1801133 del gen *MTHFR* se asocia a la presencia de HTA en población infantil y adulta mexicana.

8. Objetivos particulares

- Estimar la frecuencia alélica y genotípica de cada uno de los alelos que se presentan en la variante rs13306560 del gen *MTHFR* en la población infantil y adulta mexicana.
- Estimar la frecuencia alélica y genotípica de cada uno de los alelos que se presentan en la variante rs1801133 del gen *MTHFR* en la población infantil y adulta mexicana.
- Realizar el análisis estadístico para ambas variantes (rs13306560 y rs1801133) para determinar la posible asociación con HTA esencial en la población infantil y adulta mexicana.
- Realizar el análisis de los haplotipos formados por los alelos de ambas variantes genéticas, para poder determinar si éstas, se encuentran en desequilibrio de ligamiento o no.
- Realizar el análisis de los haplotipos formados por ambas variantes genéticas, para poder determinar si algunos de los haplotipos se encuentran asociados a HTA esencial en la población infantil y adulta mexicana.

9. Diseño metodológico

9.1. Tipo de estudio

Estudio observacional de casos y controles, transversal y analítico.

9.2. Sujetos

1. El presente estudio se llevó a cabo en una población de 1,214 individuos en total, obtenidos del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del ISSSTE, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chavez” y del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). La población infantil fue conformada por 209 niños normotensos (controles) y 209 niños hipertensos (casos), estas muestras se pararon por sexo y edad. Para determinar a la población infantil hipertensa tomamos como referencia “*The Fourth Report on the Diagnosis Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents*”. Para la población adulta contamos con 404 adultos normotensos (control) y 392 adultos hipertensos (casos). Tanto a los individuos control como a los individuos con HTA, se les aplicó una historia clínica completa, se evaluó el riesgo cardiovascular y se tomó la presión arterial de acuerdo a los lineamientos establecidos por la OMS. El diagnóstico de HTA se llevó a cabo siguiendo los los criterios establecidos por la OMS y la Asociación Americana del Corazón (AHA, siglas en ingles) aceptados por la Secretaría de Salud.

9.3. Criterios de inclusión de controles infantiles

1. Niños y niñas mexicanos de 5 a 12 años.
2. Niños y niñas mexicanos con presión arterial normal de acuerdo a los criterios previamente descritos.
3. Que el padre o tutor acepte que el niño o la niña participe en el estudio y firmen la carta de consentimiento informado.

9.4. Criterios de exclusión de controles infantiles

1. Niños y niñas mexicanos que presenten obesidad severa (percentil ≥ 99).
2. Que el padre o tutor no acepte que el niño o la niña participe en el estudio y firmen la carta de consentimiento informado.

9.5. Criterios de inclusión de infantiles con hipertensión

1. Niños y niñas mexicanos que sean hipertensos según los criterios previamente descritos.
2. Niños y niñas mexicanos de 5 a 12 años.
3. Que el padre o tutor acepte que el niño o la niña participe en el estudio y firmen la carta de consentimiento informado.

9.6. Criterios de exclusión de infantiles con hipertensión

1. Individuos con diagnóstico de HTA secundaria a:
 - Patología Renal: enfermedad renal de origen parenquimatoso, glomerulonefritis aguda, nefritis crónica, enfermedad poliquística, nefropatía diabética, hidronefrosis, enfermedad renovascular, estenosis de la arteria renal, vasculitis intrarrenal, tumores productores de renina, retención primaria de sodio (Síndrome de Liddle).
 - Patología de tipo endócrino: Acromegalia, hipotiroidismo e hipertiroidismo, hipercalcemia, hiperparatiroidismo, trastornos suprarrenales: feocromocitoma, hiperaldosteronismo primario, síndrome de Cushing, tumores cromafines extra-suprarrenales, carcinoide, hormonas exógenas (estrógenos, glucocorticoides, mineralocorticoides, simpaticomiméticos, eritropoyetina).
 - Tratamiento con quimioterapia y radioterapia menor de 6 meses por cualquier tipo de cáncer.
 - Insuficiencia cardíaca crónica.
 - Coartación de la aorta.
 - Hipertensión pulmonar.
 - Ingesta crónica de esteroides.

- Hipertensión portal.
- 2. Niños y niñas mexicanos que presenten obesidad severa (percentil ≥ 99).
- 3. Niños y niñas mexicanos que se encuentren bajo tratamiento farmacológico.
- 4. Que el padre o tutor no acepte que el niño o la niña participe en el estudio.

9.7. Criterios de inclusión de controles adultos

1. Hombres y mujeres mexicanos con PA normal realizado por Médico Cardiólogo de acuerdo a los criterios establecidos por la OMS y la Asociación Americana del Corazón (AHA siglas en Ingles) aceptados por la Secretaría de Salud.
2. Hombres y mujeres mexicanos mayores de 29 años de edad.
3. Hombres y mujeres mexicanos que acepten participar en el estudio y firmen la carta de consentimiento informado.

9.8. Criterios de exclusión de controles adultos

1. Hombres y mujeres mexicanos que presenten obesidad severa con índice de masa corporal ≥ 40 .
2. Mujeres embarazadas.
3. Hombres y mujeres mexicanos que no acepten participar en el estudio y firmen la carta de consentimiento informado.

9.9. Criterios de inclusión de individuos adultos con hipertensión

1. Hombres y mujeres mexicanos con diagnóstico de HTA realizado por Médico Cardiólogo de acuerdo a los criterios establecidos por la OMS y la Asociación Americana del Corazón (AHA siglas en Ingles) aceptados por la Secretaría de Salud.
2. Hombres y mujeres mexicanos mayores de 29 años de edad.
3. Hombres y mujeres mexicanos que acepten participar en el estudio y firmen la carta de consentimiento informado.

9.10. Criterios de exclusión de individuos adultos con hipertensión

1. Individuos con diagnóstico de HTA secundaria a:
 - Patología Renal: enfermedad renal de origen parenquimatoso, glomerulonefritis aguda, nefritis crónica, enfermedad poliquística, nefropatía diabética, hidronefrosis, enfermedad renovascular, estenosis de la arteria renal, vasculitis intrarrenal, tumores productores de renina, retención primaria de sodio (Síndrome de Liddle).
 - Patología de tipo endócrino: Acromegalia, hipotiroidismo e hipertiroidismo, hipercalcemia, hiperparatiroidismo, trastornos suprarrenales: feocromocitoma, hiperaldosteronismo primario, síndrome de Cushing, tumores cromafines extra-suprarrenales, carcinoide, hormonas exógenas (estrógenos, glucocorticoides, mineralocorticoides, simpaticomiméticos, eritropoyetina).
 - Tratamiento con quimioterapia y radioterapia menor de 6 meses por cualquier tipo de cáncer.
 - Insuficiencia cardíaca crónica.
 - Coartación de la aorta.
 - Hipertensión pulmonar.
 - Ingesta crónica de esteroides.
 - Hipertensión portal.
2. Individuos con trastornos neurológicos: hipertensión endocraneana, apnea del sueño, porfiria aguda, disautonomía familiar, intoxicación por plomo, síndrome de Guillain-Barré.
3. Individuos con cardiopatía isquémica.
4. Individuos con tratamiento crónico por hipotensión arterial.
5. Obesidad mórbida con índice de masa corporal ≥ 40 .
6. Hombres y mujeres mexicanos que no acepten participar en el estudio.

10. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevo a cabo en el programa SPSS versión 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). El tamaño de muestra para tener un poder estadístico de 80 fue claculado con el software *Quanto* (<http://hydra.usc.edu/GxE/>).

10.1. Estadística descriptiva

Se realizó la prueba de *K-S* para conocer la distribución de la población, para las variables cuantitativas se obtuvieron las medias y la desviación estándar para los valores con distribución normal y las medianas y rangos para los valores con distribución no normal. Se realizó las pruebas de *t de Student* o *U de Mann Whitney* para calcular el valor de significancia de los valores antropométricos y bioquímicos utilizando *IBM SPSS Statistic 20*. Para las variables categóricas: Diabetes tipo 2 y antecedentes familiares de hipertensión se utilizo la prueba de chi cuadrada. Para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) de las frecuencias genotípicas se utilizo la prueba de chi cuadrada.

Asociación de los polimorfismos del gen *MTHFR* e HTA: Comparamos a individuos con HTA contra individuos sin HTA por genotipo de los polimorfismos rs1801133 y rs13306560. Posteriormente realizamos una regresión binomial, para ajustar a las variantes confusoras para determinar su RM utilizando *IBM SPSS Statistic 20*.

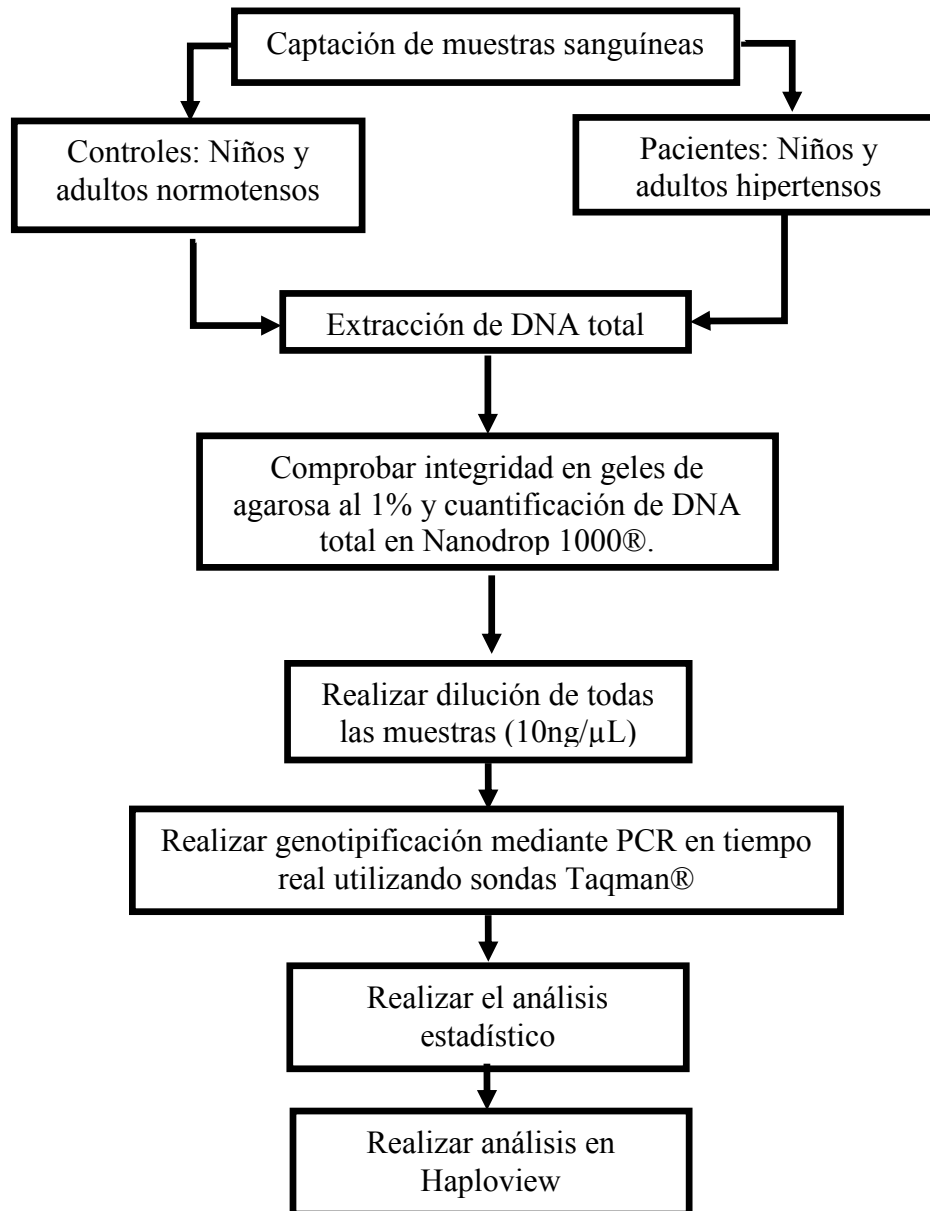
Asociación de haplotipos de *MTHFR*: utilizamos el programa *PHASE 2.02* para obtener los haplotipos individuales, y posteriormente en *IBM SPSS Statistic 20* se realizó la asociación entre haplotipos e HTA esencial.

Asociación de Haplotipos de *MTHFR*: Utilizamos el programa *Haploview* y *Phase 2.0.2*, para determinar la frecuencia de haplotipos y posteriormente su asociación con HTA esencial.

11. Consideraciones éticas

Para la realización de este estudio, se obtuvo la aprobación tanto del Comité de Investigación Científica como de la Comisión de Ética en Investigación en Salud, del C.M.N., 20 de Noviembre, ISSSTE, del Instituto Nacional de Medicina Genómica y del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chavez”. Todos los participantes firmaron previamente una carta de consentimiento informado que permitirá disponer de la información y las muestras de DNA (carta de consentimiento anexo 4 y 5). La carta de consentimiento informado se estructuró acorde con las disposiciones de la Secretaría de Salud en materia de investigación en humanos.

12. Diagrama metodológico



13. Diseño metodológico

13.1 Extracción de DNA

La extracción de DNA de muestras sanguíneas se llevó a cabo mediante la técnica de *salting out* (Anexo 1) para las muestras procedentes del CMN “20 de Noviembre”. La cuantificación de DNA se llevó a cabo en el equipo nanodrop (Anexo 2) y se determinó la integridad de la muestras en un gel de agarosa 2% (Anexo 3).

13.2 Genotipificación por sondas Taqman®

La genotipificación se realizó mediante sondas Taqman® específicas para cada alelo de cada variante siguiendo las recomendaciones del fabricante (Applied Biosystems). Para conocer el fundamento de las sondas Taqman® ver Anexo 4. Las sondas utilizadas son las siguientes:

➤ rs13306560

- VIC

CATGTGACGCGAGTCCTCGCCCCAC[C]CGTCTGCAGCCACTCCTGGTCTCAG

- FAM

CATGTGACGCGAGTCCTCGCCCCAC [T]CGTCTGCAGCCACTCCTGGTCTCAG

➤ rs1801133

- VIC

GAAAAGCTGCGTGATGATGAAATCG [G] CTCCCGCAGACACCTTCTCCTTCAA

- FAM

GAAAAGCTGCGTGATGATGAAATCG [A] CTCCCGCAGACACCTTCTCCTTCAA

13.3 Estandarización de la PCR

La estandarización de la PCR en tiempo real para la genotipificación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la División de Investigación Biomédica, Subdirección de Enseñanza e Investigación del centro Médico Nacional "20 de Noviembre", Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE). Para ver las condiciones de la reacción ver (Anexo 5).

14. Resultados

Se analizaron en total 1,214 individuos: 418 niños y 404 adultos. La población infantil abarcó 209 niños normotensos (controles) y 209 niños hipertensos (casos). Los individuos adultos se dividieron en 404 adultos normotensos (controles) y 392 adultos hipertensos (casos).

Para la población infantil los niños o niñas que presentaban un percentil <90th se consideraron como controles y los niños y niñas que presentaban un percentil ≥ 90 se consideraron casos (en este grupo también se incluyó a los niños con criterios de pre-hipertensos) (Tabla 5). Los datos clínicos y bioquímicos de la población infantil se muestra en la Tabla 6. Se realizó la prueba estadística (*t de student* o *U de Mann Whitney*) adecuada para cada rubro, para conocer si existía diferencia significativa entre ambos grupos (controles y casos).

Para la población adulta se determinó a los grupos control y casos siguiendo los criterios previamente mencionados. Los datos clínicos y bioquímicos de la población adulta se presentan en la Tabla 8. Se realizó la prueba estadística (*t de student* o *U de Mann Whitney*) adecuada para cada rubro, para conocer si existía diferencia significativa entre ambos grupos (controles y casos) (Tabla 7).

Tabla 5. Parámetros establecidos

Niños		PAS o PAD Percentiles*	niñas	niños
Control	Normal	<90th	110	99
Casos	Pre-hipertensión	90th a <95th	53	39
	Hipertensión estadio I	95th a 99th	48	46
	Hipertensión estadio II	>99th	9	14

* Los percentiles son en relación a la edad, sexo y altura.

Tabla 6. Parámetros clínicos y bioquímicos en niños

	No hipertensos	Hipertensos	P-value
Niños			
N (418)	209	209	-
Niños (%)	99 (47%)	99 (47%)	-
PAS (mmHg)	102.5 ± 8.2	118.5 ± 8.9	< 0.00
PAD (mmHg)	61.1 ± 6.4	70.9 ± 10.2	< 0.00
Edad (años)	8.86 ± 1.99	8.86 ± 1.99	>0.05
z-score BMI	0.84 ± 0.96	1.35 ± 0.92	< 0.00
Cintura/cadera	0.89 (0.74-1.07)	0.90 (0.62-2.26)	>0.05
Glucosa (mg/dL)	88 (53-128)	90 (60-144)	>0.05
Triglicéridos (mg/dL)	92 (16-373)	118 (18-380)	<0.00
Colesterol (mg/dL)	173 (38-254)	179 (101-317)	<0.00
LDL (mg/dL)	102 (40-158)	109 (52-257)	>0.05
HDL (mg/dL)	46.5 (25-92)	44 (23-89)	>0.05

PAS: presión arterial sistólica. PAD: presión arterial diastólica. IMC: índice de masa corporal. Medias ± desviación estándar o mediana (rangos).

Tabla 7 Parámetros Clínicos y Bioquímicos en adultos

	No hipertensos	Hipertensos*	Valor de P
Adultos			
N (796)	391	373	
Hombres (%)	166 (41%)	210 (53%)	-
PAS (mmHg)	108 ± 10.3	133 ± 19.1	-
PAD (mmHg)	67 ± 7.1	80 ± 10.3	-
Edad (años)	53.6 ± 8.1	57.4 ± 8.9	>0.05
IMC (Kg/m²)	27.3 ± 3.4	29.5 ± 3.9	>0.05
Glucosa N DM (mg/dL)	88 ± 7.9	91 ± 8.2	>0.05
Glucosa DM (mg/dL)	127 (79-391)	131 (77-281)	>0.05
Triglicéridos (mg/dL)	139 (43-420)	157 (50-569)	< 0.00
Colesterol (mg/dL)	190.2 ± 33.5	192.4 ± 36.1	>0.05
LDL (mg/dL)	116 ± 29.0	117 ± 32.1	>0.05
HDL (mg/dL)	47.1 ± 12	44.2 ± 11	>0.05
Diabetes tipo II [n(%)] (sí)	62	93	0.003
Historia fam. [n(%)] (sí)	147	204	< 0.00

Abreviaturas: Presión arterial sistólica (PAS); Presión arterial diastólica (PAD); Índice de masa corporal (IMC). Medias ± desviación estándar o mediana (rangos). *Los pacientes se encuentran bajo tratamiento farmacológico.

Para las muestras recolectadas en el Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE, se llevó a cabo la extracción de DNA total por el método de *salting out* (Anexo 1). La integridad del DNA total se confirmó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (Anexo 2). Para la cuantificación del DNA de cada muestra se utilizó el equipo ND-1000 (anexo 3), en donde debían presentar un cociente de densidad óptica 260/280 nm de 1.8.

La genotipificación de las variantes rs1801133 y rs13306560 del gen *MTHFR* se realizó mediante PCR-Tiempo Real (RT-PCR) utilizando sondas taqman®, esta técnica permitió llevar a cabo la amplificación de los fragmento de interés en el gen *MTHFR* y la discriminación alélica para ambas variantes. El software del equipo informa los resultados agrupado en un gráfico las fluorescencias, en donde el eje Y se tiene a las muestras que emiten fluorescencia con rango de emisión de 533-580 (sonda VIC) y en eje de las X a las que emiten en un rango de 465-510 (sonda FAM) (Figura 6).

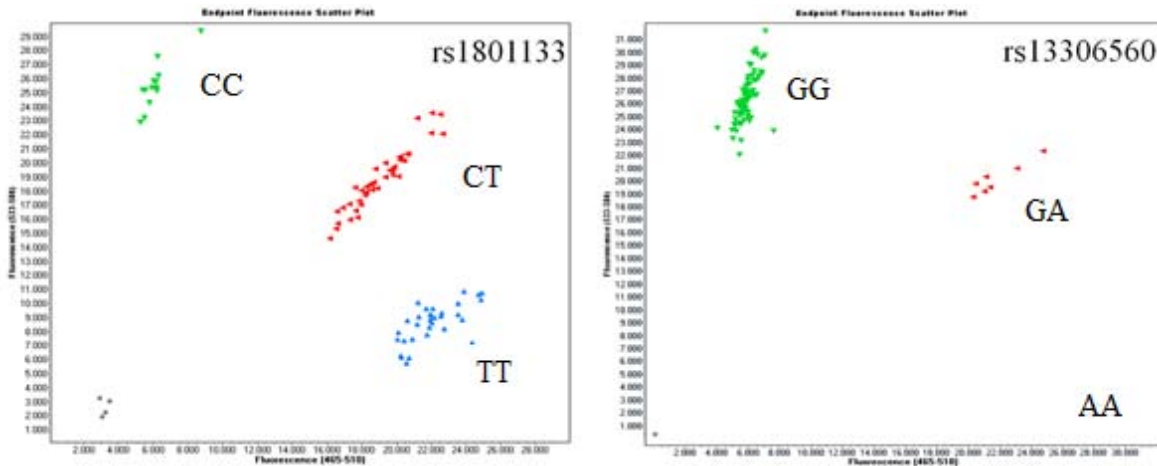


Figura 6. Gráficos de discriminación alélica de las variantes rs1801133 y rs13306560 de pacientes mexicanos con HTA.

Se calculó equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) para ambas variantes (rs1801133 y rs13306560) obteniendo una $P > 0.05$ en ambas poblaciones. Para ambas variantes (rs1801133 y rs13306560) se calculó la frecuencia genotípica y alélica. Se encontró mayor frecuencia del alelo T para la variante 180113 en ambas poblaciones, mientras que para la variante rs13306560 el alelo G es el que se encuentra con mayor frecuencia en las poblaciones (Tabla 8 y 9).

Se comparó a la población infantil normotensa contra la hipertensa para ambas variantes. Para la variante rs1801133 se obtuvo un valor de $p=0.3772$ con una razón de momios (RM) de 1.036 y un intervalo de confianza del 95% de 0.616- 1.740 y para la variante rs13306560 el valor de $p=0.0539$ con una RM de 2.706 y un intervalo de confianza del 95% de 0.947-7.732. Se realizó el análisis de regresión logística binomial para ajustar por

IMC z-score, triglicéridos, colesterol, LDL y medida de cintura obteniendo un valor de $p=0.5020$ con una RM de 1.107 y un intervalo de confianza del 95% de 0.812-1.508 para la variante rs1801133. Mientras que para la variante rs13306560 se obtuvo un valor de $p=0.0732$ con una RM de 2.952 y un intervalo de confianza del 95% de 0.903-9.646 (Tabla 8 y 9).

De igual forma se comparó a la población adulta normotensa contra la hipertensa para ambas variantes. Para la variante rs1801133 se obtuvo un valor de $p=0.0285$ con una RM de 0.711 y un intervalo de confianza del 95% de 0.518 – 0.977, mientras que para la variante rs13306560 el valor de $p=0.0004$ con una RM de 3.662 y un intervalo de confianza del 95% de 1.643-8.163. Se realizó el análisis de regresión logística binomial para ajustar por triglicéridos, IMC, Diabetes millitus tipo 2 e historia familiar obteniendo un valor de $p=0.01650$ con una RM de 0.775 y un intervalo de confianza del 95% de 0.630-0.955 para la variante rs1801133. Mientras que para la variante rs13306560 se obtuvo un valor de $p=0.0008$ con una RM de 4.424 y un intervalo de confianza del 95% de 1.843-10.620 (Tabla 9 y 10).

Se realizó el análisis de desequilibrio de ligamiento en el software *Haploview* (Figura 8). Posteriormente se analizó cada uno de los haplotipos con el software *PHASE*, al realizar el análisis se encontró que el haplotipo **AC** presenta una diferencia significativa entre adultos normotensos e hipertensos, mientras que en la población infantil no se encontró diferencia significativa (Tabla 10).

Tabla 8. Asociación de rs1801133 con hipertensión en población infantil y adulta mexicana

rs1801133	Frecuencia genotípica (%)			Frecuencia alélica (%)		RM(95%CI)	P
	CC	CT	TT	C	T		
Niños							
No hipertensos	35 (17.5)	108 (54.3)	56 (28.1)	44.7	55.2		
Hipertensos	34 (17.1)	98 (49.2)	67 (33.6)	41.7	58.2	1.107 (0.812-1.508)	0.50203
Adultos							
No hipertensos	90 (23.0)	200 (51.2)	101 (25.7)	48.5	51.4		
Hipertensos	112 (30.0)	174 (46.6)	87 (23.3)	53.3	46.6	0.775 (0.630-0.955)	0.01650

Datos (%). En niños la razón de momios RM, y el valor de *P* fueron ajustados por IMC z-score, triglicéridos y colesterol. En adultos la razón de momios RM, y el valor de *P* fueron ajustados por triglicéridos, Diabetes millitus tipo 2 e historia familiar, en ambos casos utilizando un análisis de regresión logística multinomial. Los valores de *P* sin ajustar en niños es 0.3772 y en adultos de 0.0285.

Tabla 9 Asociación de rs13306560 con hipertensión en población infantil y adulta mexicana

rs13306560	Frecuencia genotípica (%)			Frecuencia alélica (%)		RM(95%CI)	P
	GG	GA	AA	G	A		
Niños							
No hipertensos	204 (97.6)	5 (2.3)	0 (0)	98.7	1.2		
Hipertensos	196 (93.7)	13 (6.2)	0 (0)	96.7	3.2	2.952 (0.903-9.646)	0.07323
Adultos							
No hipertensos	384 (98.2)	7 (1.8)	0 (0)	99.0	0.9		
Hipertensos	347 (92.8)	26 (7.2)	0 (0)	96.4	3.5	4.424 (1.843-10.620)	0.0008

Datos (%). En niños la razón de momios RM, y el valor de *P* fueron ajustados por IMC z-score, triglicéridos y colesterol. En adultos la razón de momios RM, y el valor de *P* fueron ajustados por triglicéridos, Diabetes millitus tipo 2 e historia familiar, en ambos casos utilizando un análisis de regresión logística binomial. Los valores de *P* sin ajustar en niños es 0.053 y en adultos de 0.0004.

15. DISCUSIÓN

La HTA es una enfermedad multifactorial que presenta una elevada prevalencia en la población mexicana. Hasta el momento no se conoce la etiología de esta enfermedad sin embargo, se piensa que factores genéticos pueden interactuar con factores ambientales y nutricionales, que en conjunto favorecerían el desarrollo de la HTA esencial. Un factor importante en el desarrollo de esta enfermedad es el incremento en la concentración de homocisteína en el plasma. Lo anterior, puede ser provocado por alteraciones nutricionales (deficiencias en B₆, B₁₂ y ácido fólico) o afectaciones genéticas en las enzimas responsables (MTHFR, CBS y MS) de regular el metabolismo de la homocisteína (Chen y cols. 2001).

Uno de los genes más estudiados en diversas poblaciones y que se ha asociado con enfermedades cardiovasculares es el gen *MTHFR*, en particular la variante rs1801133 (C677T) se ha asociado a diferentes enfermedades cardiovasculares (Guéant-Rodriguez y cols., 2006).

Variante rs1801133

La variante rs1801133 (C677T) presente en el exón 4 del gen *MTHFR*, da lugar al cambio de una C por T en la posición 677, lo que origina un cambio no sinónimo de aminoácidos (alanina por valina). Estudios *in vitro* han sugerido que este alelo T da lugar a una enzima termolábil, que se caracteriza por una disminución en su actividad (Frosst et al., 1995); por lo que se ha propuesto que esta variante puede participar en el incremento de la concentración de homocisteína en plasma, y por lo tanto pudiera ser un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares (Frederiksen et al., 2004). En diversos estudios se ha descrito que el alelo T se asocia a diversas enfermedades cardiovasculares como trombosis, infarto al miocardio, enfermedades vasculares e HTA esencial (Cai y cols., 2000). Un meta-análisis en 10, 450 individuos que incluía población china, caucásica y árabe reporto una asociación muy significativa entre esta variante e HTA esencial (Yank, 2014).

De acuerdo al Hapmap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) el alelo C se ha establecido como la variante ancestral tanto en población caucásica (69%) como asiática (64%); sin embargo, a diferencia de lo descrito para esas poblaciones, estudios realizados en la población mestiza mexicana se ha informado que la variante T se encuentra con mayor frecuencia (Guéant-Rodríguez y cols., 2006; Coral-Vázquez y cols. 2013). Un estudio realizado en diferentes estados de la República Mexicana (Sonora, Zacatecas, Guanajuato, Guerrero, Veracruz y Yucatan) y ciertos grupos étnicos (Nahuas, Zapotecos y Totonacas), han revelado que la frecuencia alélica en general en la población mexicana es del 50%, mientras que la frecuencia genotípica TT en los diferentes estados va de el 17% (Sonora) al 33% (Guerrero), mientras en grupos étnicos Nahuas y Zapotecos es de 59 y 62% y en los Totonacas de 36%, respectivamente (Binia y cols., 2014).

En el presente estudio se encontró una mayor frecuencia alélica de la variante T del 54%, mientras que la variante C se presentó en el 46% en la población en general, con excepción del grupo de adultos hipertensos que presentaron una mayor frecuencia alélica de la variante C (53.3%) (Tabla 9).

Los análisis estadísticos realizados para la variante rs1801133 en la población infantil, nos muestran que no existe diferencia estadística entre los grupos de no hipertensos e hipertensos ($p=0.3772$), tampoco cuando el análisis es ajustado por IMC z-score, triglicéridos y colesterol ($p=0.5020$) (Tabla 8). Mientras que en población adulta existe una diferencia significativa ($p=0.0285$) entre los grupos en estudio (no hipertensos contra hipertensos) y que aún se mantiene cuando se ajusta por DM tipo 2, triglicéridos e historia familiar ($p=0.0165$) (Tabla 9).

En un estudio realizado en mujeres mestizas mayas, se encontró que las mujeres que presentan la variante T presentan un menor riesgo de padecer preeclampsia en su embarazo (Canto y cols., 2007).

Algunos autores proponen que factores nutricionales, como lo es el consumo adecuado de ácido fólico puede regular el efecto genético causado por la variante rs1801133 (C677T) (Guéant-Rodríguez y cols., 2006). Un estudio realizado en diferentes poblaciones,

revela que la población mexicana, presenta una mayor concentración de folatos en plasma en comparación con países europeos y africanos (Guéant-Rodriguez y cols., 2006). Se ha propuesto que los factores nutricionales (consumo suficiente de ácido fólico y vitamina B₂) pueden regular de una mejor manera el metabolismo del ácido fólico y la reconversión de homocisteína a metionina, por lo que los individuos que presentan el genotipo TT se verían beneficiados al aumentar el consumo de estos nutrientes, mejorando su niveles de homocisteína en plasma y de presión arterial (Horigan y cols., 2010; McNulty y cols., 2006; Wilson y cols., 2012). Por otro lado, los individuos con el genotipo TT que presenten desnutrición o una mala alimentación, podría presentar un riesgo importante de desarrollar enfermedades cardiovasculares.

Variante rs13306560

La variante rs13306560 se localiza en la región promotora del gen *MTHFR* y presenta un cambio de una G por A en la región promotora del gen. De acuerdo al Hapmap, la variante G se ha establecido como la variante ancestral en cualquier población en general, mientras que la variante A se ha designado como de baja frecuencia (1 - 5% de la población). Hasta el momento no se han descrito estudios de asociación de este polimorfismo con alguna enfermedad; sin embargo, en un estudio de análisis de secuencia de genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés) se asoció fuertemente el alelo A con el incremento de PAD ($p=1.2 \times 10^{-8}$) y medianamente al incremento de PAS ($p=6.2 \times 10^{-6}$) en población caucásica (Tomaszewski y cols., 2010). De igual forma otro estudio realizado por Padmanabhan y cols. (2012) en población caucásica, muestra que la región 1p36.13 se encuentra asociada con HTA esencial, dentro de esta región se encuentran diversos genes algunos de ellos son: *MTHFR*, *CLCNKB*, entre otros. No obstante, el polimorfismo rs13306560 no se ha asociado directamente con HTA esencial ni a otras enfermedades (Padmanabhan y cols., 2012).

El resultado de los análisis estadísticos realizados para la variante rs13306560 en la población infantil, nos indican que no existe diferencia significativa entre ambos grupos (no hipertensos contra hipertensos) de individuos ($p = 0.0530$), sin embargo parece que existe una tendencia hacia la asociación, la cual también se observa cuando el análisis es ajustado por IMC z-score, triglicéridos y colesterol ($p = 0.0732$) (Tabla 8). Por otra parte, en nuestra

población adulta analizada, si se observó una diferencia muy significativa ($p = 0.0004$) entre los grupos en estudio (no hipertensos contra hipertensos) y que se mantiene cuando se ajusta por DM tipo 2, triglicéridos e historia familiar ($p = 0.0008$) (Tabla 9). Es importante mencionar que en toda nuestra población no encontramos a ningún individuo que presentara la variante A en forma homocigota (AA), solo pacientes que presentaban esta variante en forma heterocigota (GA).

Para predecir el efecto que presenta la variante A del rs13306560 en la región promotora en el gen *MTHFR*, se analizó la secuencia en el software *MatInspector*. El análisis predice que el cambio producido por la variante rs13306560 afecta un sitio de unión en la región promotora del gen *MTHFR* con el Factor Krüppel-like (KLF) (Figura 7).

Los factores tipo Krüppel (KLF) son factores de transcripción con unión directa al DNA mediante dedos de zinc (Gracia J., 2010), en particular presentan tres dedos de zinc altamente conservados Cys2 / His2 (Bieker, 2001; Dang y cols., 2000a; Turner y Crossley, 1998). Los dedos de zinc 1 y 2 contienen 23 residuos de aminoácidos, mientras que el tercer dedo tiene sólo 21 residuos (Pearson y cols., 2008). Estos dedos se encuentran en el extremo carboxilo de la proteína y permite a los KLFs unirse a cajas GC y CACCC en la secuencia promotora del DNA (Bieker, 2001, Dang y cols., 2000, Pearson y cols., 2008; Turner y Crossley, 1999). Es por ello, que polimorfismos de un nucleótido (SNP's) en la región promotora del gen *MTHFR* puede disminuir o suprimir la unión de KLF y afectar la transcripción de este gen. Se ha demostrado que los KLF tienen papeles importantes en una gran variedad de procesos celulares incluyendo la hematopoyesis (Nuez y cols., 1995; Parkins y cols., 1995), el desarrollo de órganos (Wani y cols., 1999), la remodelación cardíaca (Fisch y cols., 2007; Shindo y cols., 2002), la angiogénesis (Bhattacharya y cols., 2005), la activación de monocitos (Das y cols., 2006), neoplasia (Wei y cols., 2005), la gluconeogénesis (Gray et al., 2007), la regulación del crecimiento celular (Negro y cols., 2001), y la función de las células endoteliales (Lin y cols., 2005; Sen-Banerjee y cols., 2005). Es por ello, que proponemos que la variante rs13306560 afecta la expresión del gen *MTHFR* al disminuir la unión con los KLF, lo que podría ser un factor importante para

incrementar los niveles de homocisteína en plasma y asociarse con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la HTA .

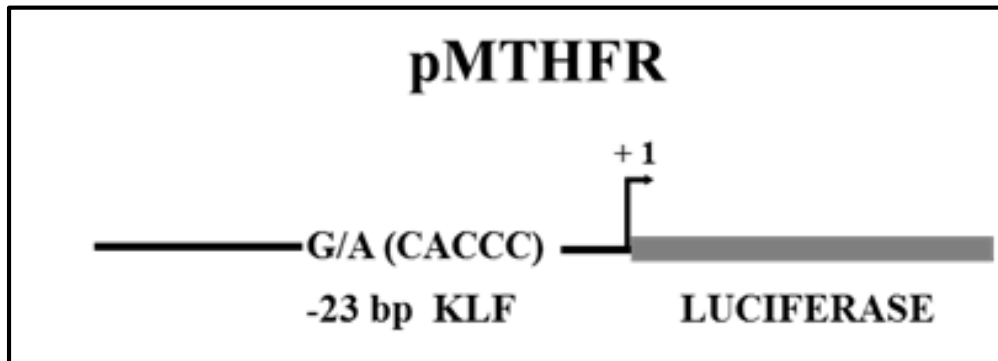


Figura 7. Diagrama esquematizado de la región promotora del gen MTHFR, en donde se indica la presencia de ambas variantes alélicas (-24, G/A) de la variante rs13306560 y la secuencia consenso del factor Kruppel-like (KLF).

Por otro lado, realizamos un análisis de desequilibrio de ligamiento entre ambas variantes (rs1801133 y rs13306560) utilizando el software *Haploview*, para conocer si estas variantes se segregaban en bloque o por separado. En análisis lo realizamos para cada población en estudio (adultos y niños), debido a que la población infantil se obtuvo de diferentes regiones del país, mientras el grupo de adultos es más homogéneo debido a que se obtuvo principalmente del centro del país. Por lo que, observamos que las variantes en adultos se encontraban en desequilibrio de ligamiento, pero no así en los niños (Figura 9).

Posteriormente, se realizó el análisis en el software *Phase* de cada uno de los haplotipos obtenidos (GC, GT, AC y AT). Los resultados revelaron que los individuos adultos que presentan el haplotipo AC presenta un incremento en la presión arterial en comparación con los otros haplotipos con una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.0014$), no así en la población infantil (Tabla 11).

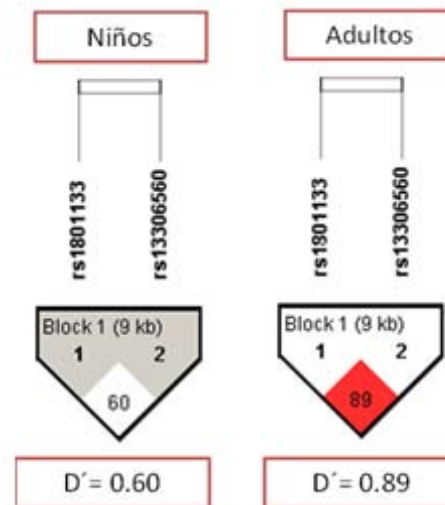


Figura 8. Esquema de los haplotipos en población infantil y adulta. Se observa que la población adulta se encuentra en desequilibrio de ligamiento (LD) de las variantes rs1801133 y rs13306560 del gen *MTHFR*. Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, MA, USA

Tabla 10 Frecuencias de haplotipos en adultos y niños hipertensos y no hipertensos

Adultos						Niños							
Haplotipo	Frecuencia		PA (mmHg)		OR (IC 95%)	P*	Haplotipo	Frecuencia		PA (mmHg)		OR (IC 95%)	P*
	HT	NHT	PAS	PAD				HT	NHT	PAS	PAD		
G-C	0.48	0.48	120	73	NS	-	G-C	0.38	0.37	73	64	NS	-
G-T	0.45	0.51	119	72	NS	-	G-T	0.57	0.60	74	65	NS	-
A-C	0.03	0.00	131	81	4.561(1.79-11.59)	0.001432	A-C	0.02	0.01	83	71	NS	-
A-T	< 0.00	< 0.00	116	67	NS	-	A-T	< 0.00	< 0.00	73	63	NS	-

HT, hipertenso; HNT, no hipertenso; PA, presión arterial (media); RM, razón de momios; IC, intervalo de confianza; P* valor de P ajustado por IMC, glucosa, triglicéridos, HDL, fumar, DM tipo II e historia familiar en adultos y por IMC, colesterol y cintura en niños

16. CONCLUSIONES

- La frecuencia del alelo **T** de la variante rs1801133 del gen *MTHFR* es de 53% en la población que estudiamos, cifra similar a lo informado por otros autores en población mexicana, sin embargo diferente a lo encontrado por Hapmap en población caucásica(31%) y asiática (36%).
- La frecuencia del alelo **A** de la variante rs13306560 del gen *MTHFR* es de 2.5% en la población infantil y de 2.2% en población adulta mexicana, cifra similar a lo reportado por Hapmap y otros autores en población mexicana.
- El análisis estadístico ajustado por factores clínicos y bioquímicos, revelan que el alelo **C** de la variante rs1801133 no presenta una asociación con HTA en población infantil mexicana ($p = 0.5020$), sin embargo en población adulta el alelo **T** (alelo más frecuente en nuestra población), se asocia como un factor de protección para HTA ($p = 0.01650$).
- El análisis estadístico ajustado por factores clínicos y bioquímicos indican que el alelo **A** de la variante rs13306560 presenta una asociación con HTA en la población mexicana ($p = 0.0008$), mientras que en población infantil no existe asociación significativa ($p = 0.0732$) sin embargo, existe una tendencia. Esto puede ser debido al estilo de vida y factores alimenticios propios de cada una de las poblaciones.
- El análisis *in silico* con el software *MatInspector* sugiere que el alelo **A** de la variante rs13306560 modifica la unión con el Factor Krüppel-like, al cambiar la secuencia (**CACCC**) del sitio de unión de este factor.
- El análisis en *Haploview* y *Phase* revela que las variantes (rs180113 y rs13306560) se encuentran en desequilibrio de ligamiento en población adulta, pero no así en población infantil. Además de que el haplotipo **AC** se encuentra asociado con el incremento en la PAS y PAD de manera significativa en población adulta ($p = 0.0014$), no así en población infantil mexicana, sin embargo existe una tendencia en población infantil.

17. PERSPECTIVAS

- El presente estudio revela que la presencia del alelo **A** de la variante rs13306560 se asocia a HAT esencial en población mexicana. Sin embargo, es importante conocer la concentración plasmática de homocisteína en los individuos que presenten esta variante, para realizar estudios de correlación y poder confirmar si esta variante contribuye al incremento de homocisteína en plasma.
- Por otro lado, el análisis bioinformático propone que esta variante modifica el sitio de unión de los factores tipo Krüppel en la región promotora del gen *MTHFR*. Para confirmar lo anterior, es conocer si realmente los factores tipo Krüppel se unen a este sitio e identificarlo. Para ello es necesario realizar ensayos de retardo y super retardo en gel, precipitación de la inmunocromatina (CHIP) y secuenciación del CHIP (CHIPsec) que permitan conocer la o las proteína(s) que interactúan con esta región específica del DNA.

18. ARTÍCULO (Enviado)

Two functional polymorphisms of the MTHFR gene are associated with essential hypertension in Mexican-Mestizo adults and children

Abstract

Background- Essential hypertension is a complex phenotype with a susceptibility genetic component. Genetic variants of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) have been associated with hypertension and other cardiovascular diseases; however, the results of these studies have been conflicting. In this study, we sought to determine if two functional variants (rs1801133 and rs13306560) within the MTHFR gene associate to essential hypertension in Mexican mestizos.

Methods and Results- We performed a case-control study with 1214 individuals, including adults and children; in order to test for association of both SNPs with essential hypertension. The adult group included 764 participants (373 patients and 391 controls) and the children's group included 418 participants (209 cases and 209 controls). Both rs1801133 and rs13306560 were associated to EH in adults (OR=0.775, CI [0.630-0.955], P=0.0165; and OR= 4.424, CI [1.843-10.620], P=0.0008, respectively), whereas only a trend was found for the rs13306560 in the children's population (OR=2.952, CI [0.903-9.646], P=0.0732). Additionally, we assessed the effect of the rs13306560 on the MTHFR/CLNC6 promoter region by means of luciferase reporter gene assays using human umbilical cord and endothelial cells interestingly, cells transfected with the construct pMTHFRaLUC showed a ~ 25% reduction in luciferase activity (P = 0.003).

Conclusion- Our data suggest that the rs181133 and rs13306560 of the *MTHFR* may play an important role in the development of essential hypertension in Mexican-Mestizo populations,

and that the allele A of the rs133065 reduced the promoter activity of the *MTHFR* regulatory region.

Keywords: Essential hypertension, MTHFR gene, polymorphisms.

Referencias

1. Bassareo P. y Mercurio G. 2014. Pediatric hypertension: An update on a burning problema. *World J. Card.* **6**(5): 253-259.
2. Barquera S., Campos-Nonato I., Herrera-Barrera L., Villalpando S., Rodríguez-Gilabert C., Durazo-Arvizu R. y Aguilar-Salinas C. 2010. Hypertension in Mexican adults: results from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud pública de México.* **52**: S63-S71.
3. Benjafield A. y Morris B. 2000. Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in essential hypertension. *Am J Hypertens.* **13**: 994-998.
4. Bhastacharya R., SenBanerjee S., Lin Z., Mir S., Hamik A., Wang P., Mukherjee P., Mukhopadhyay D. y Jain, M. 2005. Inhibition of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by the Kruppel-like factor KLF2. *J. Biol. Chem.* **280**: 28848–28851.
5. Bieker J. 2001. Krüppel-like factors: three fingers in many pies. *J. Biol. Chem.* **276**: 34355–34358.
6. Binia A., Contreras A., Canizales-Quinteros S., Acuña V., Tejero M. y Silva-Zolezzi I. 2014. Geographical and ethnic distribution of single nucleotide polymorphisms within genes of the folate/homocysteine pathway metabolism. *Genes Nutr.* **9**: 421.
7. Cai W., Yin L., Yang F., Zhang L. y Cheng J. 2014. Association between Hcy levels and the CBS844ins68 and MTHFR C677T polymorphisms with essential hypertension. *Biomedical Reports.* **2** (6): 861-868.
8. Calhoun D., Bakir S. y Oparil S. 2000. Etiology and pathogenesis of essential hypertension. In: Crawford MH, DiMarco JP, eds. *Cardiology*. London: Mosby International. 3.1-3.10.
9. Canto P., Canto T., Juárez-Velázquez R., Rosas-Vargas H., Rangel-Villalobos H., Canizales-Quinteros S., Velázquez-Wong A., Villarreal-Molina M., Fernández G. y Coral-Vázquez R. 2007. Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and Glutathione S-Transferase P1 A313G Are Associated with a Reduced Risk of Preeclampsia in Maya-Mestizo Women. *Hypertens Res.* **31**(5): 1015-1019.

10. Carretero, O. y Oparil S. 2000. Essencial Hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation*. **101**: 329-335.
11. Coral-Vázquez R., Romero Arauz J., Canizales-Quinteros S., Coronel A., Valencia Villalvazo E., Hernández Rivera J., Ramírez Regalado B., Rojano Mejía D. y Canto P. 2013. Analysis of polymorphisms and haplotypes in genes associated with vascular tone, hypertension and oxidative stress in Mexican-Mestizo women with severe preeclampsia. *Clinical Biochemistry*. **46**: 627-632.
12. Chen Z., Karaplis A., Ackerman S., Pogribny I., Melnyk S., Lussier-Cacan S., Chen M., Pai A., John S., Smith R., Bottiglieri T., Bagley P., Selhub J., Rudnicki M., James S. y Rozen R. 2001. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Human Molecular Genetics*. **10**(5): 433-443.
13. Conen D., Cheng S., Steiner L., Buring J., Ridker P. y Zee R. 2009. Association of 77 polymorphisms in 52 candidate genes with blood pressure progression and incident hypertension: the Women's Genome Health Study. *J Hypertens*. **27**: 476-83.
14. Dang, D., Bachman, K., Mahasan, C., Dang, L., Giardiello, F. y Yang, V. 2000a. Decreased expression of the gut-enriched Krüppel-like factor gene in intestinal adenomas of multiple intestinal neoplasia mice and in colonic adenomas of familial adenomatous polyposis patients. *FEBS Lett*. **476**: 203-207.
15. Das H., Kumar A., Lin Z., Patino W., Hwang P., Feinberg M., Majumder P. y Jain M. 2006. Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates proinflammatory activation of monocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci*. **103**: 6653-6658.
16. Dávila-Rodríguez M., Torres-De la Cruz V., Novelo-Huerta H., Said-Fernández S., Cerda-Flores R. y Cortés-Gutiérrez I. 2010. Total homocysteine levels in healthy children from the Monterrey metropolitan area, Mexico. *Praque. Med. Rep*. **111**(2): 135-41.
17. De Laet C., Wautrecht J., Brasseur D., Dramaix M., Boeynaems J., Decuyper J. y Kahn A. 1999. Plasma homocysteine concentration in a Belgian school-age population. *Am. J. Clin. Nutr*. **69**(5): 968-972.

18. Ellis D. y Miyashita Y. 2011. Primary hipertensión and special aspects of hipertension in older children and adolescents. *Adolescent Health, Medicine and Therapeutics*. **2**: 45–62.
19. Finkelstein J. 1998. The metabolism of homocysteine pathways and regulation. *Eur J Pediatr*. **157**: S40-S44.
20. Fisch S., Gray S., Heymans S., Haldar S., Wang B., Pfister O., Cui L., Kumar A., Lin Z. y Sen-Banerjee S. 2007. Kruppel-like factor 15 is a regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *Proc. Nat. Acad. Sci*. **104**: 7074.
21. Franklin S. 2007. Importancia de la presión arterial diastólica en relación con la edad. *Hipertensión (Madr.)*. **24**(4): 172-175.
22. Frederiksen J., Jull K., Grande P., Jensen G., Torben V., Tybjaerg-Hansen A. y Nordestgaard G. 2004. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism (C677T), hyperhomocysteinemia, and risk of ischemic cardiovascular disease and venous thromboembolism: prospective and case-control studies from the Copenhagen City Heart Study. *Blood Journal*. **104**: 3046-3051.
23. Frost P., Blom H., Milos R., Goyette P., Sheppard C., Mathew R., Boers H., den Heijer M., Kluijtmans, van den Huevel L. y Rozen R. 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics*. **10**: 111-113.
24. Fuentes R., Notkola I., Shemeikka S., Tuomilehto J. y Nissinen A. 2002. Tracking of systolic blood pressure during childhood: A 15-year follow-up population-based family study in eastern Finland. *J. Hypertens*. **20**:195–202.
25. Gracia J., Russo L., García H., García J., García G. y Bosch J. 2010. Endothelial expression of transcription factor **Krüppel-like factor 2** and its vasoprotective target genes in the normal and cirrhotic rat liver. *Gut*. **60** (4): 517-524.
26. Gray S., Wang B., Orihuela Y., Hong E., Fisch S., Haldar S., Cline G., Kim J., Peroni O. y Kahn B. 2007. Regulation of gluconeogenesis by Krüppel-like factor 15. *Cell Metab*. **5**: 305–312.
27. Guéant-Rodriguez R., Guéant J., Debard R., Thirion S., Hong L., Bronowicki J., Namour F., Chabi N., Sanni A., Anello G., Bosco P., Romano C., Amouzou E., Arrieta H., Sánchez B., Romano A., Herbeth B., Guillard J. y Mutchinick O. 2006.

- Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr.* **83**: 701-7.
28. Horigan G., McNulty H., Ward M., Strain J., Purvis J. y Scott J. 2010. Riboflavin lowers blood pressure in cardiovascular disease patients homozygous for the 677C > T polymorphism in MTHFR. *J Hypertens* **28**(3):478–486.
 29. James P., Oparil S., Carter B., Cushman W., Dennison-Himmelfarb C., Handler J., Lackland D., LeFevre M., MacKenzie T., Ogedegbe O., Smith S., Svetkey L., Taler S., Townsend R., Wright J., Narva A. y Ortiz E. 2014 Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults Report From the Panel Members Appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA.* 2014. **311**(5):507-520.
 30. Kang S., Wong P. y Malinow M. 1992. Hyperhomocyst(e)-inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Ann Rev Nutr.* **12**:279-298.
 31. Lim U. y Cassano P. 2002. Homocysteine and Blood Pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Am J Epidemiol.* **156**: 1105-1113.
 32. Lin Z., Kumar A., SenBanerjee S., Staniszewski K., Parmar K., Vaughan D., Gimbrone M., Balasubramanian V., García-Cardena G. y Jain M. 2005. Krüppel-like factor 2 (KLF2) regulates endothelial thrombotic function. *Circ.Res.* **96**: e48–e57.
 33. Mancias G., Fagard R., Narkiewicz K., Redo'n J., Zanchetti A., Böhm M., Christiaens T., Cifkova R., De Backer G., Dominiczak A., Galderisi M., Grobbee D., Jaarsma T., Kirchhof P., Kjeldsen S., Laurent S., Manolis J., Nilsson P., Ruilope L., Schmieder R., Sirnes P., Sleight P., Viigimaa M., Waeber B. y Zannad F. 2013. The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of Hypertension.* **31**: 1281-1357.
 34. Matadamas C., Pérez E., Hernández J. y Majluf, A. 2002. Nuevos factores de riesgo cardiovascular: hiperhomocisteinemia. *Rev Med IMSS.* **41**(3): 235-249.
 35. Mayer E., Jacobsen D. y Robinson K. 1996. Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* **27**: 517-527.

36. McNulty H, le Dowey R., Strain J., Dunne A, Ward M., Molloy A., McAnena L., Hughes J., Hannon-Fletcher M. y Scott J. 2006. Riboflavin lowers homocysteine in individuals homozygous for the MTHFR 677C- [T polymorphism. *Circulation*. **113** (1):74–80.
37. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. The fourth report on the diagnosis, evaluation and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics*. 2004; **114**: 555–576.
38. Nuez, B., Michalovich, D., Bygrave, A., Ploemacher, R. y Grosveld, F., 1995. Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nat.:Int. Wkly. J. Sci*. **375**: 316–318.
39. Oparil, S., Zaman, A. y Calhoun, D. 2003. Pathogenesis of Hypertension. *Ann Intern Med*. **139**: 761-776.
40. Pacheco J. 2003. Disfunción endotelial en la preeclampsia. *UNMSM* **64**: 43-54.
41. Padmanabhan S., Delles S. y Dominiczak A. 2008. Genetic factors in hypertension. *Arch Med Sci*. **2A**: S 212-219.
42. Padmanabhan S., Newton-Cheh C. y Dominiczak A. 2012. Genetic basis of blood pressure and hypertension. *Trends in Genetics*. **28**(8): 397-408.
43. Papandreou D., , Mavromichalis I., Makedou A., Rousso I. y Arvanitidou M. 2006. Total serum homocysteine, folate and vitamin B12 in a Greek school age population. *Clin. Nutr*. **25**(5): 797-802.
44. Parkins A., Sharpe A. y Orkin S. 1995. Lethal b-Thalassaemia in Mice Lacking the Erythroid CACCC-Transcription Factor EKLF. *Nature*. **375** (6529): 318-322.
45. Parra I., Estrada G. y Guzmán M. 2007. La mutación 677 C>T en la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa y el aumento de homocisteína en pacientes mexicanos con un estado de trombofilia. *Med Int Mex*. **23**: 15-18.
46. Pearson R., Fleetwood J., Eaton S., Crossley M. y Bao S., 2008. Krüppel-like transcription factors: a functional family. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. **40**:1996–2001.
47. Rosas M., Pastelín G., Martínez J., Herrera-Acosta J. y Attie F., 2004. Hipertensión arterial en México. *Arch Cardiol Mex*. **74**: 134-157.

48. Secretaria de Salud. Instituto Nacional de Salud Pública. 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT).
49. Sen-Banerjee S., Mir S., Lin Z., Hamik A., Atkins G., Das H., Banerjee P., Kumar A y Jain M. 2005. Krüppel-like factor 2 as a novel mediator of statin effects in endothelial cells. *Circulation* **112**: 720–726.
50. Shindo, T., Manabe I., Fukushima Y., Tobe K., Aizawa K., Miyamoto S., Kawai-Kowase K., Moriyama N., Imai Y. y Kawakami H. 2002. Krüppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nat. Med.* **8**: 856–863.
51. Stabouli S, Kotsis V, Toumanidis S, Papamichael C, Constantopoulous A. y Zakopoulos N. 2005. White-coat and masked hypertension in children: Association with target organ damage. *Pediatr Nephrol.***20**: 1151–1155.
52. Steed M. y Tyagi S. 2011. Mechanisms of Cardiovascular Remodeling in Hyperhomocysteinemia. *Antioxid Redox Signal.* **15**: 1927-1943.
53. Stipanuk M. 1998. Homocysteine, cysteine, and taurine. En: Shils M., editor. Modern nutrition in health and disease. Pennsylvania: McGraw-Hill. 543-558.
54. Tomaszewski M., Debiec R., Braund P., Nelson C., Hardwick R., Christofidou P., Denniff M., Codd V., Rafelt S., van der Harst P., Waterworth D., Song K., Vollenweider P., Waeber G., Zukowska-Szczechowska E., Burton P., Mooser V., Charchar F., Thompson J., Tobin M. y Samani N. 2010. Genetic Architecture of ambulatory blood pressure in the general population – insights from cardiovascular gene-centric array: *Hypertension.* **56**(6): 1069-1076.
55. Turner J. y Crossley M., 1998. Cloning and characterization of mCtBP2, a corepressor tHTA associates with basic Krüppel-like factor and other mammalian transcriptional regulators. *EMBO J.* **17**: 5129–5140.
56. Urrutia-Rojas X., Egbuchunam C., Bae S., Menchaca J. y Bayona M. 2006. High blood pressure in school children: prevalence and risk factors. *BMC Pediatrics.* **6**:32.
57. Veenema K., Solis C., Li R., Wang W., Maletz C., Abratte C. y Caudill M. 2008. Adequate Intake levels of choline are sufficient for preventing elevations in serum markers of liver dysfunction in Mexican American men but are not optimal for

- minimizing plasma totalhomocysteine increases after a methionine load 2. *Am J Clin Nutr.* **88** (3): 685-692
58. Virdis A., Iglarz M., Fritsch M., Amiri F., Touyz M., Rozen R. y Schiffrin E. 2003. Effect of Hyperhomocystinemia and Hypertension on Endothelial Function in Methylenetetrahydrofolate Reductase-Deficient Mice. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* **23**: 1352-1357.
 59. Wani M., Wert S. y Lingrel J. 1999b. Lung Kruppel-like factor, a zinc finger transcription factor, is essential for normal lung development. *J. Biol. Chem.* **274**: 21180-21185.
 60. Wei D., Kanai M., Huang S. y Xie K. 2005. Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis.* **27**: 23-31.
 61. Wilson C., Ward M., McNulty H., Strain J., Trouton T., Horigan G., Purvis J. y Scott J. 2012. Riboflavin offers a targeted strategy for managing hypertension in patients with the MTHFR 677TT genotype: a 4-y follow-up. *Am J Clin Nutr.* **95** (3):766-772.
 62. Wilson C., McNulty H., Ward M., Strain J., Trouton TG, Hoeft B., Weber P., Roos F., Horigan G., McAnena L. y Scott J. 2013. Blood pressure in treated hypertensive individuals with the MTHFR 677TT genotype is responsive to intervention with riboflavin: findings of a targeted randomized trial. *Hypertension.* **61** (6):1302-1308.
 63. Wolf-Mater K., Cooper R., Banegas J., Giampaoli S., Hans-Werner H., Joffres M., Kastarinen M., Poulter N., Primatesta P., Rodriguez-Artalejo F., Stegmayr B., Tiiamm M., Tuomilehaso, J., Vanuzzo D. y Vescio, F. 2003. Hypertension Prevalence and Blood Pressure Levels in 6 European countries, Canada and United Stated. *JAMA.* **289**: 2363-2369.
 64. Yank K., Jia J., Mao L., Men C., Tang K., Li Y., Ding H. y Zhan Y. 2014. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism and essential hypertension: A meta-analysis of 10,415 subjects. *Biomedical Reports.* **2**: 699-708.

Anexos

Anexo 1. Extracción de DNA total

La extracción de DNA total se realizó mediante la técnica de *salting out* modificado, a partir de la muestra sanguínea obtenida de cada una de las mujeres incluidas el estudio.

- a) Centrifugar la muestra sanguínea a 4300 g
- b) Separar todo el suero de la muestra
- c) Extraer los leucocitos
- d) Agregar 2 mL de sacarosa-tritón y 1mL de agua bidestilada
- e) Agitar en vórtex
- f) Incubar 10 minutos en frío
- g) Agitar en vórtex
- h) Centrifugar 15 minutos a 3100 g
- i) Decantar sobrenadante
- j) Agregar 2 mL de sacarosa-tritón y 1 mL de agua bidestilada
- k) Centrifugar 10 minutos a 3100 g
- l) Suspender la pastilla en 72 μ L de NaCl 5mM
- m) Transferir a tubo Eppendorf
- n) Agregar 36 μ L de SDS al 10% (agitar vigorosamente)
- o) Incubar 5 minutos a temperatura ambiente
- p) Agregar 246 μ L de NaCl saturado
- q) Incubar 5 minutos a temperatura ambiente
- r) Centrifugar a 13000 g por 10 minutos
- s) Recuperar la fase líquida intermedia
- t) Precipitar con dos volúmenes de etanol absoluto frío
- u) Lavar con etanol 70% dos o tres veces
- v) Centrifugar a 13000 g 5 minutos.
- w) Decantar el etanol
- x) Suspender la pastilla con agua bidestilada (20-60

Anexo 2. Cuantificación de ADN

Espectrofotometría de luz UV

El espectrofotómetro ND-1000 ayuda a estimar la cantidad de DNA genómico y verificar su calidad, dependiendo de la densidad óptica obtenida a dos diferentes longitudes de onda 260 nm y 280 nm. Se considera que el DNA tiene una adecuada pureza cuando el cociente de densidad óptica 260/280 nm es de 1.8, mientras que si es mayor a 2.0 se considera el DNA de la muestra podría tener algún tipo de contaminación que pueden ser sales o proteínas.

Procedimiento:

- Colocar 1 μL de H_2O pura en el lector del aparato, cerrar el brazo del lector y realizar la asignación del elemento considerado blanco
- Limpiar el lector utilizando solamente material apropiado (*kim wipes*)
- Colocar ahora 1 μL de la muestra problema y realizar la lectura
- Tomar los datos referentes a esa lectura

Anexo 3. Integridad del ADN

Para verificar la integridad del ADN el método por excelencia es la separación en gel de agarosa, el cual permite la identificación y purificación de fragmentos de ácidos nucleídos además de verificar la integridad.

Pasos:

- Preparar gel de agarosa al 1.5%, colocar en cámara de electroforesis con una solución buffer TBE 1X
- A 2 μ L de muestra agregar 3 μ L de buffer de carga 6X, cargar en el gel y correr a 60V durante 1 h
- Observar en el transiluminador

Nota: Aquellas muestras que presentan un barrido se consideran como degradadas esto en proporción a la fluorescencia de la banda de integridad del DNA genómico.

Anexo 4. Fundamento de genotipificación por sondas Taqman®

El análisis de las variantes del gen MTHFR se realizó en PCR en tiempo real mediante el sistema PCR allelic discrimination TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Las sondas taqman® son diseñadas por Applied Biosystems, estas hacen uso de la actividad 5' exonucleasa de la Taq (*Thermus aquaticus*) DNA polimerasa. Estas sondas tienen un marcador fluorescente en el extremo 5' y una molécula que absorbe ("quencher") la fluorescencia emitida por el marcador en el extremo 3'. La sonda hibrida con el fragmento específico (si está presente) y, a medida que se sintetiza la hebra complementaria al fragmento, la sonda se va degradando por la acción exonucleasa, permitiendo que el fluoróforo se separe del quencher, y así el fluoróforo pueda fluorecer al ser excitado por el laser del equipo (Figura 9).

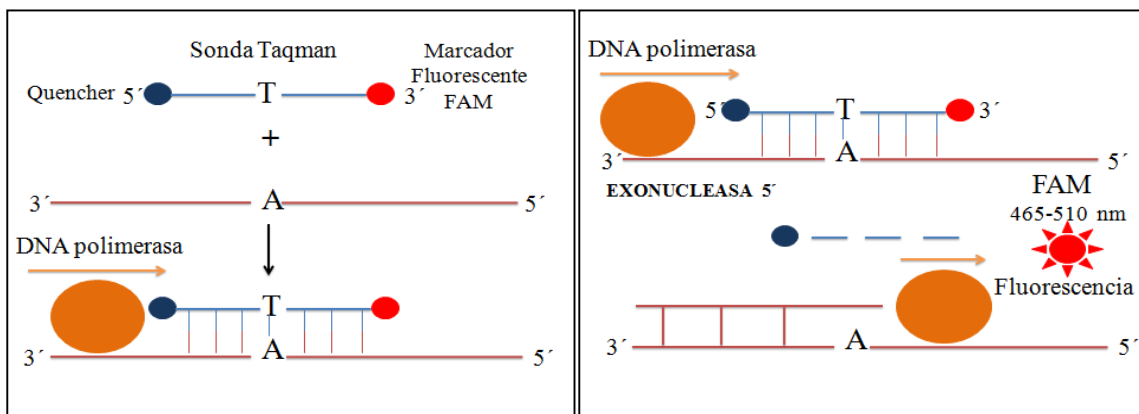


Figura 9. Fundamento de sondas Taqman®

Anexo 5. Condiciones de PCR en tiempo real

Las condiciones de la PCR en tiempo real fueron estandarizadas en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la División de Investigación Biomédica, Subdirección de Enseñanza e Investigación del centro Médico Nacional "20 de Noviembre", Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE). Se corrieron las reacciones de PCR en dos volúmenes finales diferentes: (1) con volumen total de 10 μL (como lo recomienda el distribuidor) y (2) con la mitad del volumen 5 μL . Los resultados fueron los mismos por lo que se optó por realizar la reacción con un volumen final de 5 μL (Tabla 11).

Tabla 11. Volúmenes para genotipificación con sondas taqman®

Reactivos	Volumen (μL)
Master Mix	2.5
Sonda Taqman®	0.125
Agua	1.5
DNA	1
Total	5

Anexo 6. Carta de consentimiento pacientes

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INDIVIDUOS CON HIPERTENSIÓN

México, D.F., a _____

Por _____ medio _____ de _____ la _____ presente yo,

autorizo mi participación en el proyecto de investigación titulado “**ANÁLISIS DE VARIANTES ALELICAS DEL GEN, *MTHFR/CLCN6* Y CAMBIOS EPIGENÉTICOS EN LA REGION PROMOTORA DE LOS GENES *MTHFR/CLCN6* ASOCIADOS AL DESARROLLO DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL**”

El objetivo de este estudio es conocer mediante un estudio realizado en un laboratorio, los cambios en diversos genes (los cuales tienen el material de la herencia), que pudieran condicionar la presencia de hipertensión arterial .

Se me ha explicado que mi participación consistirá en: completar un cuestionario acerca de diversos factores de riesgo para desarrollar hipertensión arterial (como realización de ejercicios medicamentos etc) y la toma de una muestra única de 5 ml de sangre.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:

Riesgos y molestias:

- a) por la toma de sangre: malestar y dolor, formación de hematoma o morete en el sitio del piquete de la vena.
- b) por la extracción de sangre: ninguno

Beneficios:

- a) Se generará información para determinar la asociación entre variaciones en el material genético y el desarrollo de hipertensión , lo que podría permitir hacer prevención y dar tratamiento oportuno.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme o retirar mi muestra biológica del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto. Asimismo, se me ha informado que esta muestra además podría ser utilizada en otros estudios relacionados con problemas cardiovasculares con el fin de esclarecer los posibles mecanismo que generan esas enfermedades, para ello mi muestra será almacenada a -20°C durante un período de 15 años en División de Medicina Genómica, en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, México, D.F., y a partir de la toma de la muestra y pasado este tiempo será desechada.

El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar las dudas que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con su tratamiento.

El investigador principal ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma absolutamente confidencial. Para cumplir la anterior, el investigador utilizará para la creación de la base de datos (que tendrán mi información clínica, así como las respuestas del cuestionario acerca de mis datos que se me aplicará), número de folio (NO empleará mi nombre) para identificarme y de esa forma conservar mi anonimato.

Datos de la investigadora principal a los cuales puede comunicarse en caso de dudas o preguntas relacionadas con el estudio Biol. Exp. Juan Carlos Pérez Razo, División de Medicina Genómica, 2do. Piso del edificio D en la Subdirección de Enseñanza e Investigación, Calle San Lorenzo 502, esquina Av. Coyoacán, Col. Del Valle, Delegación Benito Juárez, C.P. 03100 Teléfono: 52005003 ext. 14603. correo electrónico: juami_bioex@hotmail.com

Investigador Responsable
Biol. Exp. Juan Carlos Pérez Razo

Señor (a)

Investigador Asociado
Dr. Wilbert Pineda Pineda

Testigo

Anexo 7. Carta de consentimiento controles

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INDIVIDUOS SANOS

México, D.F., a _____

Por _____ medio de la presente yo,

autorizo mi participación en el proyecto de investigación titulado “**ANÁLISIS DE VARIANTES ALELICAS DEL GEN *MTHFR/CLCN6* Y CAMBIOS EPIGENÉTICOS EN LA REGION PROMOTORA DE LOS GENES *MTHFR/CLCN6* ASOCIADOS AL DESARROLLO DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL**”

El objetivo de este estudio es conocer mediante un estudio realizado en un laboratorio, los cambios en diversos genes (los cuales tienen el material de la herencia), que pudieran condicionar la presencia de hipertensión arterial .

Se me ha explicado que mi participación consistirá en: completar un cuestionario acerca de diversos factores de riesgo para desarrollar hipertensión y la toma de una muestra única de 5 ml de sangre.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:

Riesgos y molestias:

- c) por la toma de sangre: malestar y dolor, formación de hematoma o morete en el sitio del piquete de la vena.
- d) por la extracción de sangre: ninguno

Beneficios:

- b) Se generará información para determinar la asociación entre variaciones en el material genético y el desarrollo de hipertensión , lo que podría permitir hacer prevención y dar tratamiento oportuno.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme o retirar mi muestra biológica del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente. Asimismo, se me ha informado que esta muestra además podría ser utilizada en otros estudios relacionados con problemas cardiovasculares con el fin de esclarecer los posibles mecanismo que generan esas enfermedades, para ello mi muestra será almacenada a -20°C durante un período de 15 años en División de Medicina Genómica, en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, México, D.F., y a partir de la toma de la muestra y pasado este tiempo será desechada.

El investigador principal ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma absolutamente confidencial. Para cumplir la anterior, el investigador utilizará para la creación de la base de datos (que tendrán mi información clínica, así como las respuestas del cuestionario acerca de mis datos que se me aplicará), número de folio (NO empleará mi nombre) para identificarme y de esa forma conservar mi anonimato.

Datos de la investigadora principal a los cuales puede comunicarse en caso de dudas o preguntas relacionadas con el estudio Biol. Exp. Juan Carlos Pérez Razo, División de Medicina Genómica, 2do. Piso del edificio D en la Subdirección de Enseñanza e Investigación, Calle San Lorenzo 502, esquina Av. Coyoacán, Col. Del Valle, Delegación Benito Juárez, C.P. 03100 Teléfono: 52005003 ext. 14603. correo electrónico: juami_bioex@hotmail.com

Investigador Responsable
Biol. Exp. Juan Carlos Pérez Razo

Señor (a)

Investigador Asociado
Dr. Wilbert Pineda Pineda

Testigo