



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

FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO DE LA ENZIMA METILHIDRATOFOLATO REDUCTASA (MTHFR)
EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON HIPERHOMOCITEINEMIA Y TROMBOSIS EN EL HOSPITAL DE
PEDIATRÍA DEL CMN SIGLO XXI

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN MEDICINA
PEDIATRÍA

PRESENTA:
EVELYN VANEGAS VELASCO

TUTOR:
DRA. IRINA ELIZABETH JUAREZ MUÑOZ
DIVISION DE EDUCACION EN SALUD DE UMAE SXXI

MEXICO; DF. MAYO DEL 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

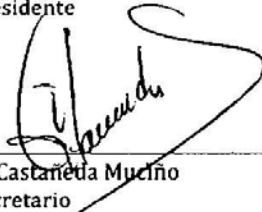
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

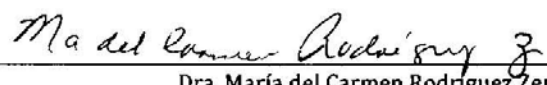
FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO DE LA ENZIMA METILHIDRATOFOLATO REDUCTASA (MTHFR)
EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON HIPERHOMOCITENEMIA Y TROMBOSIS EN EL HOSPITAL DE
PEDIATRÍA DEL CMN SIGLO XXI



Dra. María Guadalupe Miranda Novales
Presidente



Dra. Graciela Castañeda Muñoz
Secretario



Dra. María del Carmen Rodríguez Zepeda
Vocal



Dr. Alonso Gómez Negrete
Vocal

ÍNDICE

Resumen	3
Antecedentes	4
Planteamiento del problema	9
Justificación	10
Objetivos	11
Hipótesis	11
Material y métodos	12
Descripción general del estudio	13
Definición de variables	16
Factibilidad	17
Aspectos éticos	17
Resultados	18
Discusión	20
Conclusiones	23
Tablas	24
Anexos	27
Bibliografía	30

RESUMEN

FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO DE LA ENZIMA METILTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (MTHFR) EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON HIPERHOCISTEINEMIA Y TROMBOSIS EN EL HOSPITAL DE PEDIATRÍA DE CMN SXXI

La enfermedad vascular es causa importante de morbilidad y mortalidad, existen diversos factores de riesgo para el desarrollo de trombosis en esta patología. Las causas pueden ser asociadas a colocación de catéteres, infecciones alteraciones renales y hepáticas. Otros mecanismos que predisponen a la trombosis son aumento en los niveles plasmáticos del Factor de Necrosis Tumoral, la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, aumento de la coagulación en daño tisular, la activación de metaloproteinasas, la resistencia a la proteína C activada (RPCa), la mutación en el gen del Factor V Leiden y la hiperhomocisteinemia.

La homocisteína (Hct) es un aminoácido sulfurado derivado del metabolismo de la metionina. Los niveles séricos elevados de Hct producen daño endotelial y promueven la peroxidación de lipoproteínas de baja densidad, proliferación del músculo liso vascular y alteraciones de la coagulación, lo que causa aterogénesis y trombogénesis. En la vía de remetilación la Hct puede formar nuevamente metionina de dos maneras distintas. La más importante, requiere de la actividad de las enzimas metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y metionina sintetasa (MS), dependientes del ácido fólico, vitamina B6 y B12. Una deficiencia en la actividad enzimática o en sus cofactores podría causar el acúmulo de este aminoácido en el organismo lo que se traduciría en la elevación de la Hct en plasma. Se ha informado en diversos estudios que el polimorfismo 677C→T en el gen MTHFR se asocia con actividad reducida de la enzima MTHFR.

Objetivo: Estimar la frecuencia del polimorfismo 677C→T del gen MTHFR en un grupo de pacientes pediátricos con trombosis e hiperhomocisteinemia.

Material y método: Se incluyeron a todos los pacientes entre 1 mes y 17 años de edad, con antecedentes de hiperhomocisteinemia y trombosis, de la clínica de trombosis, en quienes se descartó deficiencia de proteína S, C, antitrombina III, factor XII o resistencia a la proteína C. Previa autorización se tomó una muestra de 4cc de sangre, la cual se colocó en un tubo con EDTA. La presencia o ausencia del polimorfismo 677C→T del gen MTHFR se realizó por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y enzimas de restricción. Para el análisis se utilizó estadística descriptiva, con medidas de tendencia central.

Resultados. Se estudiaron 11 pacientes pediátricos con antecedentes de haber presentado fenómenos trombóticos sin causa identificada que presentaban hiperhomocisteinemia y que fueron atendidos en la clínica de trombosis de la UMAE Hospital de Pediatría. El promedio de edad fue de 9 años (5-16), de los cuales el 36 % (n=4) correspondieron al sexo femenino y 64% (n=7) al sexo masculino.

Se observó una frecuencia del polimorfismo 677C→T del 82% en la población estudiada, los cuáles el 46% de Homocigotos mutados y 36% a Heterocigotos mutados.

Antecedentes

Las enfermedades vasculares son causas importantes de morbilidad y mortalidad en países occidentales, especialmente por aterosclerosis. Existen diversos factores de riesgo para el desarrollo de trombosis en esta patología, entre ellas la hipercolesterolemia y la hiperhomocisteinemia. El tromboembolismo venoso se reporta con una incidencia de 1-2 por cada 100,000 casos por año en la población general y la tasa de incidencia del tromboembolismo cerebral isquémico y hemorrágico de 2.7 casos por cada 100,000 por año. ⁽¹⁻³⁾

Las causas de trombosis adquiridas son las más frecuentes, como las asociadas a catéteres, infecciones, enfermedades renales o hepáticas, medicamentos y procedimientos invasivos (por ejemplo, cateterismo cardiaco en pacientes con cardiopatías congénitas), cáncer, quimioterapia, cirugía, alimentación parenteral, obesidad, tabaquismo, etc. ^(3,4)

Otros mecanismos que predisponen a la trombosis son: aumento en los niveles plasmáticos del Factor de Necrosis Tumoral, la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, aumento de la coagulación en daño tisular, la activación de metaloproteinasas, la resistencia a la proteína C activada (RPCa), la mutación en el gen del Factor V Leiden y la hiperhomocisteinemia. ^(5,6)

La hiperhomocisteinemia producen daño endotelial y promueven la peroxidación de lipoproteínas de baja densidad, la coagulación y la proliferación del músculo liso vascular lo que causa aterogénesis y trombogénesis. La homocisteína (Hct) es un aminoácido sulfurado derivado del metabolismo de la metionina procedente de las proteínas de la dieta de origen vegetal y animal como: ajonjolí, nueces de Brasil, espinacas, nabo, brócoli, huevo y proteínas de origen animal, la cual es generada en casi todos los tejidos. ⁽⁷⁾

Aproximadamente 80% de la Hct en sangre se encuentra unida a proteínas, mientras que el 20% restante se encuentra en tres formas: la forma oxidada o dímero de Hct, la homocisteína disulfurada mixta y la homocisteína libre. Estas formas son llamadas colectivamente homocisteína total (tHct).⁽⁸⁾

El metabolismo de la Hct (Figura 1) depende de las concentraciones de metionina, de las enzimas involucradas en cada vía metabólica, de sus co-factores (vitaminas B6 y B12) y el folato (para la producción de tetrahidrofolato). Una deficiencia en la actividad enzimática o en sus cofactores podría causar un aumento de su concentración en sangre.⁽⁹⁾

Por el ciclo de los metilos activados la metionina se transforma en S-adenosil-metionina. Este último compuesto dona su grupo metilo lo que genera S-adenosil-homocisteína, misma que al hidrolizarse forma Hct. A partir de este punto, la Hct es capaz de seguir diversos caminos dependiendo del estado metabólico del organismo⁽¹⁰⁾:

1. En la vía de transulfuración, la Hct puede formar cistationina al interactuar con la cistationina sintetasa (CBS), enzima dependiente de vitamina B6, lo que genera cisteína para la síntesis proteica.
2. En la vía de remetilación la Hct puede formar nuevamente metionina de dos maneras distintas:
 - La primera y más importante, requiere de la actividad de las enzimas metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y metionina sintetasa (MS), dependientes de vitamina B6 y B12 respectivamente.
 - La segunda, al interactuar con la enzima betaína-homocisteína metiltransferasa (BHMT), dependiente de vitamina B12, donde la Hct recibe un grupo metilo de la betaína para formar metionina.
3. En caso de haber exceso de Hct, ésta forma dímeros de Hct-Hct o de Hct-cisteína⁽¹¹⁾.

La deficiencia de la actividad enzimática de la MTHFR puede variar debido a polimorfismos en el gen de la enzima MTHFR localizado en la región p36.3 del cromosoma 1. Este gen está compuesto de 11 exones de entre 102 a 432 pares de bases y 10 intrones. (12)

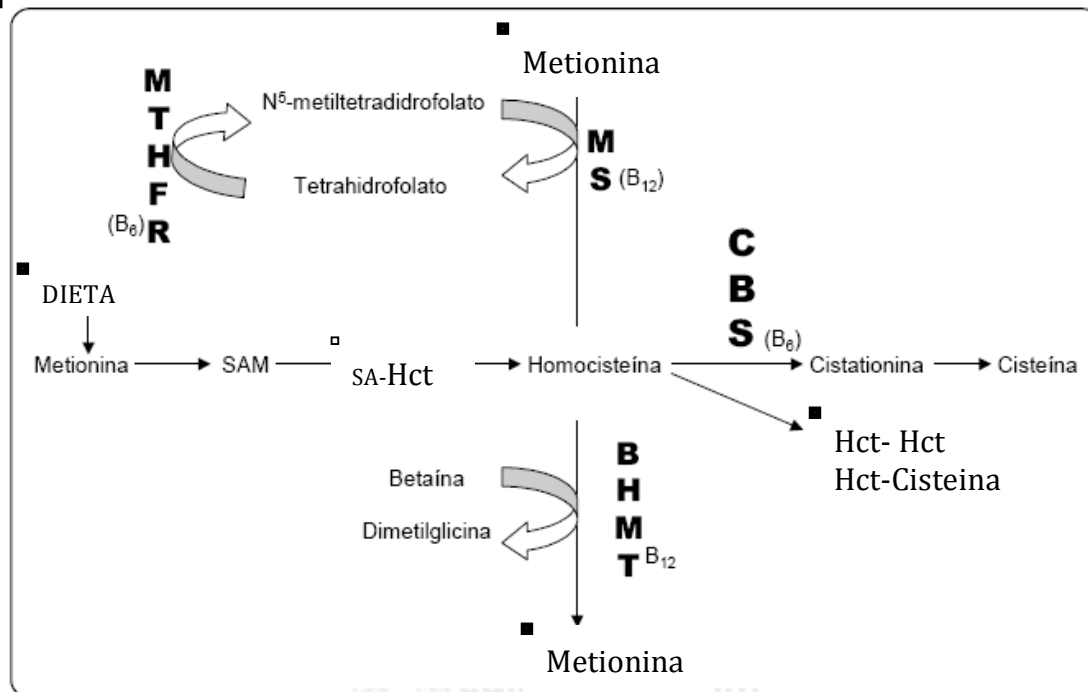


FIG. 1 METABOLISMO DE LA HOMOCISTEINA. El paréntesis indica el cofactor de la enzima involucrada. B6 = Vitamina B6, B12 = Vitamina B12, BHMT = Betaína-homocisteína metiltransferasa, CBS = Cistationina sintetasa, MS = Metionina sintetasa, MTHFR = Metiltetraidrofolato reductasa, SAHcy = S-adenosil-homocisteína, SAM = S-adenosilmetionina. (11).

Frosst et al. realizaron un estudio en adultos donde encontraron una asociación entre el polimorfismo 677C→T en el gen *MTHFR*, asociado con actividad reducida de la enzima. Asimismo refieren que la principal causa de hiperhomocisteinemia (>15umol/L) encontrada, es debida al polimorfismo, que consiste en un cambio de citosina (C) por timina (T) en el DNA y por consiguiente, un cambio de alanina por valina a nivel proteico. (13)

Este polimorfismo produce una disminución en la actividad de la enzima y cuando a esto se agrega un déficit de folato el aumento de los valores de homocisteína sérica es mayor, con lo que aumenta la incidencia de episodios trombóticos. (14-15)

Brattstron et al. estudiaron 142 sobrevivientes de enfermedad vascular cerebral (EVC) y 66 controles, encontrando hiperhomocisteinemia en 57 de los 142 pacientes con antecedentes de trombosis (40%) y 4 en los controles (6%) .⁽¹⁶⁾

Guttormsen et al. Estudiaron 18043 adultos en la población general de Noruega, encontrando 0.4% con hiperhomocisteinemia igual o superior a 40 micromoles/l, de los que el 73 % de eran homocigotos para 677C→T MTHFR.⁽¹⁷⁾

Briones relacionó el polimorfismo 677C→T con preeclampsia en el embarazo e hiperhomocisteinemia, reportando que el 18.75% presentaba el polimorfismo 677C→T comparado los controles sin hiperhomocisteinemia.⁽¹⁸⁾

Cantú estudió 45 adultos con trombosis venosa profunda y 90 controles, determinó los niveles en plasma de homocisteína, de folato, y vitamina B12, así como el genotipo del gen para la MTHFR (Metiltetrahidrofolato reductasa), encontrando una mayor frecuencia del polimorfismo para la MTHFR, en pacientes con trombosis venosa profunda (22% contra 10%).⁽¹⁹⁾

Arroyo et al. relacionaron niveles de homocisteína y el cambio 677C→T de la MTHFR, en neonatos eutróficos sanos, encontrando una alta prevalencia del polimorfismo, pero sin relación con niveles de homocisteína.⁽²⁰⁾

Por otra parte, diversos estudios avalan la importancia de identificar los pacientes con riesgo para presentar hiperhomocisteinemia, ya que con medidas terapéuticas se logra disminuir los niveles de homocisteína y con ello el riesgo cardiovascular. Stein propone para prevenir la enfermedad vascular primaria administrar suplementos de folato ante niveles séricos >14µmol/L.⁽²¹⁾

Huub et al. realizaron un análisis de 12 estudios de investigación, en el cual se concluyó que la ingesta diaria de multivitaminas con ácido fólico 0.5-5mg, cianocobalamina 0.5mg disminuyen los niveles de homocisteína en una tercera parte.⁽²²⁾

Vilaseca et al. realizaron un estudio para determinar niveles de homocisteína en 195 niños sanos de entre 2 meses y 18 años, encontrando una media de 6.3mmol/L.⁽²³⁾

Parra et al. realizaron un estudio en 9 niños mexicanos de entre 1 mes y 13 años con antecedentes de trombosis encontrando en todos los casos la coexistencia de los polimorfismos 677C→T y 1298 A→ C de la MTHFR. ⁽²⁴⁾

Juárez y col. realizaron un trabajo de tesis, en la cual estudiaron un grupo de pacientes entre de entre 1 mes y 17 años de edad, con antecedente de trombosis, en quienes se les había descartado deficiencia de proteína S, C, antitrombina III, Factor XII y RPCa, 52.6% presentaron hiperhomocisteínemia sin deficiencia de ácido fólico, vitamina B6 o B12, se desconoce si éstos pacientes tienen el polimorfismo para la metilentetrahidrofolato reductasa, lo que permitiría tomar medidas para disminuir el riesgo cardiovascular de los pacientes según lo propone la “American Heart Association”.^(25, 26)

En población mexicana, el polimorfismo de la metiltetrahidratofolatoreductasa 677C→T es aún más frecuente; en mestizos, un 44-58% y en población indígena tarahumara, el 36%.^(27,28,29,30) Las frecuencias genotípicas para el estado homocigoto T/T publicadas para población mexicana mestiza varían del 19 al 34,8% ^(28,29,30).

Sanchez-Urbina realizó un estudio de polimorfismo 677C→T de la metiltetrahidratofolato reductasa y cardiopatías aisladas en población mexicana encontrando una frecuencia genotípica del 22% para T/T y el 56% para el alelo T. ⁽³¹⁾

Planteamiento del problema

Se realizó un estudio, en CMN SXXI Hospital de Pediatría del IMSS, en un grupo de niños con antecedente de trombosis, a los cuales se descartó: deficiencia de proteína S, C, antitrombina III, factor XII, deficiencia de ácido fólico y B6, así como de resistencia a la proteína C, sin embargo se encontraron niveles elevados de homocisteína hasta 7.4 veces mayor, comparada con población sana de la misma edad ⁽²⁵⁾.

Se ha visto que el polimorfismo 677C→T, produce termolabilidad y disminución de la enzima metiltetrahidrofolato reductasa, lo que disminuye la velocidad de conversión de homocisteína hacia metionina, elevándose los niveles de homocisteína, por lo que nos preguntamos:

¿Cuál es la frecuencia del polimorfismo 677C→T de la MTHFR en el grupo de pacientes pediátricos con antecedente de trombosis e hiperhomocisteinemia?

Justificación

Se ha considerado que la hiperhomocisteinemia puede ser una posible causa de trombosis, dentro de las causas identificadas de elevación de la homocisteína es el polimorfismo 677C→T.

En un estudio realizado en el UMAE Hospital de Pediatría en un grupo de niños con antecedente personales de trombosis sin causa aparente, se encontró que un 52.6% cursaban con hiperhomocisteinemia, sin embargo se desconoce el número de niños cuya hiperhomocisteinemia pueda estar relacionada con el polimorfismo 677C→T, para la enzima MTHFR, lo que daría la pauta para determinar un posible origen de la elevación de este aminoácido.

Objetivos

Objetivo general

1. Estimar la frecuencia del polimorfismo 677C→T del gen MTHFR en un grupo de pacientes pediátricos con antecedente de trombosis e hiperhomocisteinemia.

Objetivos específicos

1. Determinar la frecuencia de pacientes pediátricos heterocigotos para el polimorfismo 677C→T de la enzima MTHFR con antecedente de trombosis e hiperhomocisteinemia.
2. Determinar la frecuencia de pacientes pediátricos homocigotos para el polimorfismo 677C→T de la enzima MTHFR con antecedente de trombosis e hiperhomocisteinemia.

Hipótesis

La frecuencia del polimorfismo 677C→T de la MTHFR en pacientes pediátricos con antecedente de trombosis e hiperhomocisteinemia será mayor de 20%.

Material y métodos

Lugar donde se desarrolló el estudio:

- UMAE Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI.
- Departamento de Genética, Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Diseño del estudio: observacional, descriptivo y transversal.

Universo del estudio:

Pacientes con trombosis que acuden a la clínica de trombosis de la Unidad Medica Alta Especialidad Hospital de Pediatría del CMN SXXI IMSS, con hiperhomocisteinemia (niveles de homocisteína >7.6 mmol/L)

Criterios de selección

Criterios de inclusión:

1. Pacientes de 1 mes a 17 años de edad.
2. Pacientes con antecedente personal de trombosis a quienes se les haya descartado causa subyacente (deficiencia de proteína S, C, antitrombina III, factor XII y resistencia a la proteína C).
3. Pacientes con determinación previa de homocisteína.
4. Pacientes cuyos padres acepten la participación mediante la firma de la carta de consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes con antecedente personal de trombosis a los que se haya encontrado a deficiencia de proteína S, C, antitrombina III, factor XII o resistencia a la proteína C.

Criterios de eliminación:

- 1.- Aquellos pacientes que no sea factible tomar la muestra, o bien, que la muestra haya sido insuficiente.

Tamaño de muestra: por conveniencia, con un total de 11 pacientes.

Descripción general del estudio

Se estudiaron una serie de 11 pacientes, entre 5 y 16 años de edad, con antecedente personal de trombosis a quienes se les descartó causa subyacente de trombosis como: deficiencia de proteína S, C, antitrombina III, factor XII o resistencia a la proteína C, con determinaciones previas de homocisteína.

A todos ellos se les aplicó una encuesta para obtener los siguientes datos: edad, sexo, tipo de evento.

A todos los padres de los pacientes, se les solicitó la participación mediante la firma del consentimiento informado; a los niños mayores de 8 años se les solicitó su participación con la firma de una carta de asentimiento. Se les informó de las complicaciones que se podían presentar (hematoma) por la toma de la muestra de 4cc de sangre en tubo de EDTA.

Para prevenir que los valores de homocisteína se volvieran falsamente elevados, se separó el plasma de los glóbulos rojos inmediatamente después de que las muestras se colectaran por medio de centrifugación, se almacenó en congelación en criotubos a hasta su análisis. Finalmente se realizó la comparación entre los grupos mediante análisis estadístico de los resultados obtenidos. El valor para considerar hiperhomocisteinemia es $>7.6\text{mmol/L}$.

En la Unidad de Investigación en genética del Hospital Infantil de México se analizó por medio de la prueba de fragmento de restricción, para el polimorfismo de la enzima MTHFR, determinando si se trataba de un paciente homocigoto o heterocigoto para la mutación 677C→T y posterior genotipificación de los polimorfismos determinándose si se trataba de un paciente homocigoto o heterocigoto para la mutación 677C→T.

La amplificación de la región que contiene la mutación se realizó por PCR con 20 pmol de cada par de cebadores.

Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Mix de reacción	Vol. (µl)	Conc. Final
H ₂ O	4.5	

Buffer 10X	1	1x
MgCl ₂ (50 mM)	0.5	2.5mM
dNTPs(2.5mM)	0.8	0.2 Mm
Iniciadores: (10pmol/μl)		
F	1	10 pmol/Rx'n
R	1	10 pmol/Rx'n
Taq pol.(5U/μl)	0.2	1 U
DNA	1	(≈50ng)
Vol. Final 10		

Programa en el termociclador:

- 1.- 95°-----5 min.
- 2.- 95°-----50 seg.
- 3.- 65°-----50 seg.
- 4.- 72°-----50 seg.
- 5.- pasó 2,3 y 4 -29 ciclos
- 6.- 72°-----7 min.
- 7.- 4°-----5 min.
- 8.- fin-----

Condiciones de digestión con *Hinf* I

- Enzima *Hinf* I

10, 000 U/ml

	Vol. μl	Conc. Final
H ₂ O	4.9	
Buffer 2 (10X)	1.0	1X
<i>Hinf</i> I (10U/μl)	0.1	(1 U)
Producto PCR	4	
Volumen final 10 μl		

Programa De Digestión

- 1.- 37°----- 3.5 horas
- 2.- 4°----- 10 minutos
- 3.- fin-----

Condiciones para realizar electroforesis.

El producto amplificado se sometió a una digestión con la enzima Hinf I, la cual generó un fragmento de 198pb si el producto no tenía el sitio de reconocimiento para la Hinf I que corresponde al alelo normal 677C, y generó dos fragmentos de 175 y 23pb si la enzima reconoció el sitio de restricción para este amplificado, lo cual corresponde al alelo mutado 677T. Las bandas se visualizaron en geles de agarosa al 3%.

Todos los datos se concentraron en una base de datos del programa y se analizaron en el programa SPSS versión 12.0.

Análisis estadístico:

Se utilizó estadística descriptiva, con medidas de tendencia central.

Definición de variables

SEXO	Condición orgánica que distingue a la hembra del macho.	Género registrado en la hoja de datos, corroborado por fenotipo	Cualitativa nominal	Femenino Masculino
POLIMORFISMO 677C→T PARA EL GEN <i>MTHFR</i> .	Cambio en la secuencia de aminoácidos para el gen <i>MTHFR</i> .	Presencia o ausencia de las variantes de los genes que codifican la enzima reductora comprometidos en el metabolismo de la metionina.	Cualitativa nominal	Presente Ausente
HETEROCIGOTO	Individuo diploide que para un gen dado tiene en cada uno de dos cromosomas homólogos un alelo distinto	Presencia de la mutación <i>MTHFR</i> 677C→T en un alelo	Cualitativa nominal	Presente Ausente
HOMOCIGOTO	Individuo diploide que para un gen dado tiene en cada uno de los cromosomas homólogos un alelo semejante	Presencia de la mutación <i>MTHFR</i> 677C→T en ambos alelos	Cualitativa nominal.	Presente Ausente
HIPERHOMOCISTEINEMIA	Elevación de niveles plasmáticos de homocisteína por arriba de los normales para su edad.	Niveles séricos de homocisteína de 7.6mmol/L	Cualitativa nominal	mmol/L

Factibilidad

Con el apoyo de la Unidad de investigación en genética del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, y de la Unidad de investigación en genética de la UMAE Hospital de Especialidades del CMO IMSS, se realizó la determinación del polimorfismo de la enzima MTHFR.

Recursos Físicos: se contó con el equipo y reactivos necesarios para la prueba, que fueron donados por los hospitales de apoyo.

Recursos Humanos:

1. Médico No familiar: Pediatra.
2. Residente de Pediatría del 4º. año de la Especialidad de Pediatría Médica(1)
3. Médico Genetista Investigador básico(2)
4. Químico fármaco biólogo (1)

Aspectos éticos

De acuerdo con el Reglamento de Investigación de la Ley General de Salud este estudio se clasificó como de riesgo mínimo ya que solamente se llevó a cabo la toma de una muestra de sangre de 4 ml, y se les explicó que el riesgo de la toma de la muestra podría ser la formación de un pequeño hematoma en el sitio de la punción. Se solicitó autorización a los padres para que los niños participaran en el estudio mediante la firma de una carta de consentimiento informado (Anexo II). A los niños mayores de 8 años se solicitó su participación con la firma de una carta de asentimiento (Anexo III). El protocolo fue aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica con número 2008-785-070.

Resultados

Se estudiaron 11 pacientes pediátricos con antecedentes de haber presentado fenómenos trombóticos sin causa identificada que presentaban hiperhomocisteinemia y que fueron atendidos en la clínica de trombosis de la UMAE Hospital de Pediatría. El promedio de edad fue de 9 años (5-16), de los cuales el 36% (n=4) correspondieron al sexo femenino y 64% (n=7) al sexo masculino.

Los sitios de trombosis fueron: trombosis venosa profunda 73% (n=8) y trombosis vascular cerebral 27% (n=3).

Los resultados encontrados en la población estudiada fue expresada en los siguientes términos: heterocigoto mutado (se refiere a un individuo que posee una copia de un alelo con polimorfismo), y por lo tanto portadores del polimorfismo 677C→T; homocigoto mutado (es quien posee ambos alelos con el intercambio de cisteína por tiamina), homocigoto silvestre (ambos alelos poseen citosina que no confiere termolabilidad para la enzima MTHFR). (tabla 1)

Del total de pacientes, el 82% (n=9) presentaron el polimorfismo 677C→T de la MTHFR. El 36% (n=4) correspondieron a heterocigotos mutados (C/T) y el 46% (n=5) a homocigotos mutados (T/T). El 18% (n=2) restante fueron homocigoto silvestres (C/C) lo que significa que no fueron portadores del polimorfismo. (tabla 2)

El genotipo heterocigoto mutado se presentó en un 50% en ambos sexos, para homocigoto mutados fue del 80% (n=4) en el sexo masculino y 20% (n=1) en el femenino. En los homocigoto silvestres se encontró en un 50% en el sexo femenino y 50% en el masculino.

Para los eventos de trombosis en el sistema nervioso central la mediana del nivel de homocisteína fue de 15.18mmol/L, presentando el polimorfismo de la MTHFR en todos los casos como homocigoto mutado. La mediana de homocisteína para trombosis en el sistema venoso profundo fue de 9.64mmol/L presentando una

frecuencia de homocigoto mutado de 34% , heterocigoto mutado 44% y homocigoto silvestre de 22%.

En la tabla 3 se muestran los resultados de la mediana homocisteina, para los genotipos homocigoto mutado, heterocigoto mutado y homocigoto silvestre, observando que los niveles más altos se encontraron en los homocigotos mutados para el polimorfismo 677C→T de la MTHFR.

En cuanto al sexo se puede observar que los es ma frecuente que la presentación del polimorfismo de la MTHFR 677C→T es mas frecuente en el sexo masculino. (tabla 4)

Discusión.

Los estudios realizados para establecer diferencia en la frecuencia de los polimorfismos de la MTHFR entre individuos sanos e individuos con diferentes enfermedades a arrojado diferentes resultados que se cree son el resultado de una alteración en el ciclo de los tetrahidrofolatos, resultados muy contradictorios principalmente por el nivel de consumo de las diferentes vitaminas que interactúan en dicho ciclo. La frecuencia del polimorfismo del la MHTFR 677C→T, en este estudio es mayor (82%), en comparación a población mestiza y tarahumara mexicana sin trombosis, que ha sido reportada en otros estudios (36-58%)^(27, 28, 29, 30), sin embargo el número de casos no es suficiente para poder establecer una comparación entre ambos.

La hiperhomocisteinemia se ha asociado a un mayor riesgo de enfermedad tromboembólica cuanto mayor sea la concentración de homocisteína. En este estudio pacientes con enfermedad tromboembólica portadores del genotipo 677C→T con niveles normales de ácido fólico, presentan una mediana de homocisteína mayor a los pacientes que presentan el estado silvestre de la MHTFR. Para poder aceptar que la homocisteinemia no solo es un factor de riesgo sino un factor causal faltan todavía ensayos clínicos que demuestren una disminución en el riesgo de la aterosclerosis al reducir la homocisteína plasmática.

En comparación con el estudio de Parra et al, en nueve niños mexicanos, en el que se estudia la coexistencia de dos polimorfismos del la MTHFR, de los cuales 677C→T esta presente en todos los casos, en este estudio si se presentaron dos casos (18%) en el que esta presente el estado de homocigoto silvestre. Por lo que se debe considerar que además de las alteraciones hereditarias, otras causas de aumento de la concentración de homocisteína. Las vitaminas B6, B12 además del ácido fólico son necesarias como cofactores para el metabolismo de la homocisteína, bien para

transformarla de nuevo en metionina o bien para transformarla en cisteína y excretarla por orina.

La presencia del polimorfismo en hiperhomocistinemia fue del 82%, quienes presentaron en comparación con el 18% que no presento el polimorfismo, niveles de homocisteína mas altos y especialmente los que presentaban carácter homocigoto mutado para la MTHFR. Se ha observado en diversos estudio que en los heterocigotos mutados de la MTHFR existe un mayor riesgo de enfermedad oclusiva vascular. Estos sujetos presentan concentraciones de homocisteína plasmática discretamente elevadas en relación a los que son heterocigotos para la mutación.

Consideramos que puede ser conveniente realizar la determinación de los niveles de homocisteína dentro del abordaje diagnóstico de los pacientes pediátricos con trombosis, ya que aún y cuando no se pudiera realizar el estudio genético, se podría intentar disminuir un posible riesgo asociado para enfermedad trombótica. Cabe mencionar que se ha observado como en el caso de este estudio que los pacientes homocigotos para la presencia del polimorfismo 677C→T presentan los niveles mas altos de homocisteína ya que les confiere termolabilidad a la enzima MTHFR.

Ya que la presencia del polimorfismo 677C→T en las poblaciones mexicanas estudiadas es hasta del 58% es necesario realizar estudios, con un mayor numero de casos para confirmar la asociación del polimorfismo 677C→T en niños con trombosis, tomado en cuenta los niveles de acido fólico y sus cofactores como: B6 y B12, para establecer una pauta en el manejo de la hiperhomocisteinemia. Estudios relacionados se han iniciado en otras poblaciones como: Vitamin Intervention for Stroke Prevention el cual valora el efecto de las vitaminas B sobre la recurrencia de apoplejía en pacientes con enfermedad cerebrovascular establecida. Los trabajos Norwegian Study of Homocysteine Lowering With B-vitamins in Myocardial Infarction (NORVIT) y el Western Norwegian Study on the Effect from Homocysteine Reduction with B-vitamins in Patients with Angiographically Verified Coronary Artery Disease estudiarán el efecto de las vitaminas B sobre la sobrevivencia en pacientes con enfermedad coronaria. En el Reino Unido está en marcha el Study of the Effectiveness

of Additional Reductions in Cholesterol and Homocysteine (SEARCH), mientras que en Australia está en curso el Prevention with a Combined Inhibitor and Folate in Coronary Disease (PACIFIC).^(32,33,34)

Conclusiones:

1. Se observa una frecuencia del polimorfismo 677C→T mayor del 20% siendo del 82% en la población estudiada, de los cuáles el 46% correspondió a Homocigotos mutados y 36% a Heterocigotos mutados.
2. Los pacientes portadores de el polimorfismo 677C→T en este estudio, tanto heterocigoto mutados como homocigoto mutado presentan niveles de homocisteína mayores a los que se encuentran en los heterocigoto silvestres.
3. Se requiere estudios con mayor numero de pacientes que correlacionen la presencia de las mutaciones para los alelos de la MTHFR en población mexicana con antecedentes de trombosis en los cuales no haya determinado la causa
4. La determinación de los niveles de homocisteína dentro del abordaje diagnóstico de los pacientes pediátricos con trombosis sin causa determinada, pudiera sugerir una causa de trombosis dentro del metabolismo de la homocisteína, enzimática o de sus cofactores.
5. Debido a la presencia de hasta el 58% de la mutación de la MTHFR 667 C →T reportada para poblaciones mexicanas, se requieren de estudios que incluyan la intervención de cofactores como ácido fólico, vit B 6 y 12, ya que la termolabilidad enzimática que se confiere a la enzima con la presencia de la mutación aunada a la deficiencia de dichos cofactores favorece un aumento de la aparición de eventos trombóticos.

TABLA 1. En la que se muestran alelos, genotipo , niveles de homocisteína y sitio de trombosis.

No.	ALELOS	GENOTIPO	NIVELES DE HOMOCISTEINA	SITIO DE TROMBOSIS
1	T/T	HOMOCIGOTO MUTADO	11.48 mmol/L	TVP
2	T/T	HOMOCIGOTO MUTADO	18.46 mmol/L	TVP
3	T/T	HOMOCIGOTO MUTADO	13.61 mmol/L	TVP
4	T/T	HOMOCIGOTO MUTADO	17.22 mmol/L	VC
5	T/T	HOMOCIGOTO MUTADO	13.14 mmol/L	VC
6	C/T	HETEROCIGOTO MUTADO	9.64 mmol/L	TVP
7	C/T	HETEROCIGOTO MUTADO	10.91 mmol/L	TVP
8	C/T	HETEROCIGOTO MUTADO	8.31 mmol/L	TVP
9	C/T	HETEROCIGOTO MUTADO	9.32 mmol/L	TVP
10	C/C	HOMOCIGOTO SILVESTRE	7.59 mmol/L	TVP
11	C/C	HOMOCIGOTO SILVESTRE	9.29 mmol/L	TVP

C=citosina, T= timina, TVP= trombosis venosa periférica, VC=vascular cerebral.

TABLA 2. Cuadro en el que se muestra la presentación de heterocigoto mutado, homocigoto mutado y heterocigoto silvestre.

MTHFR 677 C--T	No pacientes	Porcentaje
Heterocigoto mutado	4	36%
Homocigoto mutado	5	46%
Heterocigoto silvestre	2	18%

TABLA 3. Se muestran los resultados de la mediana homocisteína, para los genotipos homocigoto mutado, heterocigoto mutado y homocigoto silvestre.

Genotipo	Niveles de homocisteína
Homocigoto mutado	13.61 mmol/L (18.46mmol/L - 11.48mmol/L)
Heterocigoto mutado	9.48mmol/L (8.31 mmol/L - 10.91mmol/L)
Homocigoto silvestre	8.44mmol/L (7.59mmol/L - 9.29mmol/L)

TABLA 4. Se muestra el porcentaje de la mutación de la MTHFR para homocigoto mutado y heterocigoto mutado.

GENOTIPO	FEMENINO	MASCULINO
Homocigoto mutado n=5	1(20%)	4(80%)
Heterocigoto mutado n=4	2(50%)	2(50%)
Total	3(33%)	6(77%)

Anexo I

Hoja de recolección de datos

Nombre: _____

Sexo: _____ Edad: _____

Folio: _____

NIVELES DE HOMOCISTEINA: _____

GENOTIPO MTHFR 677C-T

1. Citosina / Citosina ()

2. Timina / Citosina ()

3. Citosina / Citosina ()

Heterocigoto: _____ Homocigoto: _____

Trombosis (localización)

VC (vascular cerebral) ()

TVP (venosa periférica) ()

Anexo II

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

FECHA: México, DF a _____ de _____ de _____ **NOMBRE DEL PACIENTE:**
_____ **EDAD:** _____

Se les invita a que su hijo (a) participe en el estudio titulado: "Frecuencia del polimorfismo C677-T del gen de la metiltetrahidratofolato reductasa , en pacientes pediátricos con Hiperhomocisteinemia y trombosis en el Hospital de Pediatría del CMN siglo XXI.

Objetivo del estudio:

El estudio tiene como finalidad conocer si los niños como su hijo que tienen trombosis e hiperhomocisteinemia, tienen una alteración conocida como polimorfismo del gen de la MTHFR. Esta alteración detectada nos permitirá elaborar estrategias encaminadas a la detección de futuros de pacientes como su hijo.

En que consiste el estudio:

Si usted y su hijo deciden participar se tomara una muestra de sangre mediante punción de 4cc aproximadamente y se enviara a el Departamento de genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Riesgos por la participación en el estudio:

El único problema que puede haber por la toma de la sangre, sería que en el lugar (brazo) donde se le puncione ocurra un moretón (hematoma). Para evitarlo, la persona que tomará la sangre tiene amplio conocimiento de la forma de obtener la sangre por lo que será poco probable que ocurra.

En caso de participar, no tendrá costo alguno para ustedes.

Confidencialidad de la información.

Los autores de este estudio le garantizamos que los resultados que se obtengan serán mantenido de manera confidencial, y que en caso que se publique la información en ningún momento se dará a conocer la identidad de su hijo. Para cualquier aclaración se puede dirigir con los responsables de este estudio: Dra. Irina Elizabeth Juárez Muñoz y Dra. Evelyn Vanegas Velasco al teléfono 5 6719771.

Dra. Irina Elizabeth Juárez Muñoz Dra.
Dra. Evelyn Vanegas Velasco

Anexo III

CARTA DE ASENTIMIENTO

Fecha: México, D.F. a _____ de _____ de _____

NOMBRE DEL PACIENTE EDAD: Yo _____ acepto participar en el estudio llamado "Frecuencia del polimorfismo C677→T del gen de la metiltehidratofolato reductasa (MTHF) en pacientes pediátricos con hiperhomocisteinemia y trombosis en el Hospital de Pediatría del CMN siglo XXI", el cuál consiste en tomar una muestra de sangre en la cual se examina si en niños como yo que tuvieron trombosis tenemos un marcador en nuestros genes que se relaciona con la elevación de homocisteína en sangre.

Riesgos de la participación en el estudio:

El único problema que puede haber por la toma de la sangre sería que en el sitio de punción para la extracción de sangre se forme un moretón. Para evitarlo la persona que tome la muestra tiene amplio conocimiento de la forma de obtener la sangre por lo que será poco probable que ocurra.

En caso de participar no tendrá costo para mis papás.

Beneficios por la participación del estudio:

Conocer si niños como yo tiene este marcador que se relaciona con el riesgo de trombosis.

Confidencialidad de la información:

Los autores de este estudio te garantizamos que los resultados que se obtengan será manteniendo de forma confidencial tus datos personales y en caso de que se publique la información en ningún momento tu identidad se dará a conocer.

Para cualquier aclaración te puedes dirigir con la Dra. Irina Elizabeth Juárez Muñoz y la Dra Evelyn Vanegas Velasco al teléfono 5 671 9771.

Dra. Irina Elizabeth Juárez Muñoz

Dra. Evelyn Vanegas Velasco

BIBLIOGRAFIA

1. Russel R, Broderick J, Talbot G, Leach A. The Patogénesis of Atherosclerosis. N Eng J Med 1986; 362: 801-809.
2. Wilcken D, Wan-X, Greenwood J. Lipoprotein (a) and apoloproteins B and A-I in children and coronary vascular events in their-grandparents. J Pediatrics 1993; 123:519-526.
3. Andrew M, David M, Adams M. Venous thromboembolic complication (thromboembolic events) in children: first analyses of the Canadian registry of thromboembolic events. Blood 1994; 83: 1251-1261.
4. David M, Andrew M, Lonn E, Genest J. Venous thromboembolism complications in children: A critical review of the literature. J. Pediatric 1993; 123: 337-344.
5. Parasuraman S, Goldhaer S. Venous thromboembolism in children circulation. Circulation 2006;113: 12-16.
6. Nowk U, Junker R, Kreuz W. Risk of recurrent thrombosis in children with combined prothrombotic risk factors. Blood 2001; 97:858-862.
7. Da De L, N Fernandez, R Aller. Homocisteina, metabolismo y determinantes higiénico dietéticos. Endocrinol Nutr 2004;51(8):458-463
8. Maghadasian H, McBanusM, Frolch JJ. Homocysteine and coronary disease. Clinical evidence ang genetic and metabolic background. Arch Intern Med 1997;57:2299-2308.
9. Kilmer S. Homocysteine, vitamins and vascular disease prevention. AM J Clin Nutr 2007;86:1563-1568.
10. Ubbink B, Delpont R, Riezier R et al. Comparasion of three different plasma homocysteine assays. Cromatography - mass spectrometry. Clin Chem 199;45:670-675.
11. Zacarías C. Hiperhomocisteinemia. Un nuevo factor de riesgo coronario. Gac Méd Méx. 2001; 4: 2-12.
12. Boccia S, Giagama F, Persiani R et al. Reductase C677T and A1298C Polymorphism and susceptibility to gastric adenocarcinoma in Italian population. Biomark 2007; 12: 635-644.

13. Frosst P, Blom H, Milos R et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10:111-113.
14. Melchionda S, Digilio M, Mingarelli R, Novelli G, Scambler P, Marino B, et al. Transposition of the great arteries associated with deletion of chromosome 22q11. *Am J Cardiol* 1995; 75:95-98.
15. Welch G, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998; 338:1042-1050.
16. Brattstrom L, Israelsson B, Norrving B, Bergqvist D, Thorne J, Hultberg B, y cols. Impaired homocysteine metabolism in earlyonset cerebral and peripheral occlusive arterial disease. *Atherosclerosis* 1990; 81: 51-60.
17. Guttormsen et al. Plasma concentrations of homocysteine and other aminothioli compounds are related to food intake in healthy human subjects. *J Nutr* 1994;124:1934-1941.
18. Briones V, García C, Briones G. Homocisteína y mutación C677T y A1298C del gen de la 5-Metilentetrahidrofolato reductasa en embarazadas con preeclampsia-eclampsia. *Rev Asoc Mex Med Crit Ter Int* 2007; 21:179-184.
19. Cantú D, Alonso E; Jara, A. Hiperhomocisteinemia, low folate and vitamin B12 concentrations, and methylene tetrahydrofolate reductasa mutation in cerebral venous thrombosis stroke. 2004;35:1790-1794.
20. Arroyo L, Acosta M, García R, Sierra J. Identificación del polimorfismo c677t del gen de la 5,10 metiltetrahidrofolato reductasa y su relación con concentraciones de homocisteína en recién nacidos de término eutróficos. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2006; 63 (supl.1): 526-527.
21. Stein C, McBride P. Hiperhomocisteinemia and atherosclerotic vascular disease: pathophysiology, screening, and treatment. 1998;158(12):1301-06.
22. Huub W, Heijer M, Den, DG. Homocysteine and venous thrombosis: outline of a vitamin intervention trial. 2000;26:297-04.
23. Vilaseca M, Moyano D, Ferrer 1. Total Homocysteine in Pediatric Patients. *Clin Chem* 1997;43:690-694.
24. Parra I y col. Coexistencia de las mutaciones C677T y A1 298C en la enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa en pacientes pediátricos con trombosis. *Bol Med Hosp Inf Mex* 2009;66:229-233.

25. Juárez I y col. Frecuencia de hiperhomocistinemia en pacientes pediátricos con trombosis en el hospital de pediatría del CMN Siglo XXI, IMSS. 2006. Tesis de grado en la Especialidad de Pediatría Médica, Nov. 2007.
26. Scott JM. Homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(2):333-334.
27. Guéant-Rodriguez RM, Guéant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP, et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 6777T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr*. 2006;83:701-7.
28. Mutchinick OM, López MA, Luna L, Waxman J, Babinsky VE, RYVEMCE collaborative Group. High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Mol Genet Metab*. 1999;68:461-7.
29. González-Herrera L, García-Escalante G, Castillo-Zapata I, Canto-Herrera J, Pinto-Escalante D, Díaz-Rubio F, et al. Frequency of thermolabile variant defects in the State of Yucatan, Mexico. *Clin Genet*. 2002;62:394-8.
30. Davalos RIP, Olivares P, Castillo MT, Cantú JM, Ibarra B, Moran MC. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Ann Genet*. 2000;43:89-92.
31. Sanchez R y col. *Rev Esp Cardiol*. 2012;65:158-63 - Vol. 65 Núm.02
32. Eikelboom JW, Lonn E, Genest J, Hankley G, Yusuf S. Homocysteine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med* 1999; 131: 363-375
33. Rey RH, Soifer S, Pombo G y col. Nuevos factores de riesgo. *Rev Argent Cardiol*. 2005; 69 (supl 1): 1-14.
34. Seshadri N, Robinson K. Homocisteína, vitaminas B, y arteriopatía coronaria. *Medical Clinics of North America* 2000; 84:219-241