



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

**“Determinación del polimorfismo C677T del gen de la
5-metilentetrahidrofolato reductasa en mujeres
gestantes provenientes del Instituto Materno Perinatal
San Bartolomé”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en
Zoología

AUTOR

Rudy LÓPEZ GABRIEL

ASESOR

Doris Virginia HUERTA CANALES

Lima, Perú

2015

A Dios y a mis queridos padres, Magino y Cleofé,
por todo su apoyo incondicional y amor, a mis hermanos,
que sin ellos no tendría el motor para avanzar
y a todos mis amigos, por su ánimo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Magino López y Cleofé Gabriel, por su apoyo y amor en todo momento, siempre dispuestos a ayudarme en toda mi formación profesional y su amor en todos mis años de vida, han sido un impulso constante, gracias papitos lindos, por ustedes soy lo que soy.

A la doctora Doris Virginia Huerta Canales por su apoyo, consejos y asesoramiento en todo el desarrollo de la tesis y la prestación de las instalaciones y equipos del laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón” de la Facultad de Medicina-UNMSM. Gracias doctora porque sin su apoyo no habría sido posible la realización de la presente tesis.

A Oscar Acosta, por su amistad en todos estos años y sus valiosas sugerencias en la redacción de la tesis. Gracias amigo por compartir tus valiosos conocimientos y experiencias aprendidas en esta área de la Biología Molecular.

INDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE	iv
INDICE FIGURAS	vii
INDICE TABLAS	Viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I.- INTRODUCCION	1
II.- MARCO TEORICO	3
2.1.- Ácido fólico	3
2.1.1.- Estructura del ácido fólico	3
2.1.2.- Función del ácido fólico	4
2.1.3.- Ruta metabólica	5
2.1.4.- Absorción del ácido fólico	6
2.1.5.- Deficiencia del ácido fólico	7
2.1.6.- Consecuencia	8
2.1.6.1.- Hiperhomocisteínemia	8
2.2.- Enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (e.c. 1.5.1.20)	10
2.2.1.- Función de la enzima MTHFR	11
2.2.2.- Deficiencia de la actividad enzimática de MTHFR	12
2.3.- Gen <i>MTHFR</i>	12
2.3.1.- Ubicación del gen	13
2.3.2.- Tamaño del gen	13
2.4.- Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)	14
2.4.1.- Polimorfismos existentes en el gen <i>MTHFR</i>	14
2.4.1.1.- Polimorfismo C677T	15
2.5.- <i>MTHFR</i> C677T y enfermedades asociadas	16
2.5.1.- MTHFR C677T y defectos congénitos	16
2.5.2.- MTHFR C677T y defectos del tubo neural	17

2.5.3.- MTHFR C677T y síndrome de Down	17
2.5.4.- MTHFR C677T e hipertensión	17
2.5.5.- MTHFR C677T y enfermedades cardiovasculares	18
2.5.6.- MTHFR C677T y pérdidas gestacionales	18
2.5.7.- MTHFR C677T y preeclampsia	18
2.6.- Reportes de este polimorfismo en otras sociedades y sus estadísticas	19
2.7.- Reporte de este polimorfismo en nuestro país	19
III.- OBJETIVOS	20
3.1.- Objetivo General	20
3.2.- Objetivos específicos	20
Tipo de estudio	21
Criterio de selección	21
Variable	21
IV.- MATERIALES Y METODOS	22
A.- Lugar de ejecución	22
4.1.- MATERIALES	22
4.1.1.- Material biológico	22
4.1.2.- Materiales y reactivos	22
a.- reactivos, agentes y enzimas	22
b.- materiales de vidrio y plástico	23
4.1.3.- Equipo	23
4.2.- MÉTODOS	23
4.2.1.- Recolección de datos	23
4.2.2.- Extracción del ADN a partir de sangre periférica	24
4.2.3.- Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR	24
4.2.4.- Digestión con nucleasa de restricción	25
4.2.5.- Análisis estadístico	26
4.2.5.1.- Equilibrio Hardy-Weinberg	27
4.2.5.2.- Prueba del χ^2 (observado & esperado)	28
4.2.5.3.- Tamaño de la muestra	28
V.- RESULTADOS	30
5.1.- Geles de amplificación	30
5.2.- Geles de restricción	31

5.3.- Frecuencias genotípicas y alélicas	31
5.4.- Equilibrio Hardy-Weinberg	33
VI.- DISCUSIÓN	37
VII.- CONCLUSIONES	43
VIII.- RECOMENDACIÓN	44
IX.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45
X.- ANEXOS	57
10.1.- Genotipaje de pacientes	57
Tabla de genotipos CC	57
Tabla de genotipos CT	58
Tabla de genotipos TT	59
10.2.- Consentimiento informado	60
10.3.- Ficha personal y Clínica	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura del ácido fólico

Figura 2: Ciclo metabólico de la Homocisteína

Figura 3: Ruta metabólica de la MTHFR

Figura 4: Formación de 5-metiltetrahidrofolato a partir de 5,10-MTHFR

Figura 5: Ubicación del gen *MTHFR*

Figura 6: Tamaño del gen *MTHFR*

Figura 7: Amplificación en gel agarosa 2.5%

Figura 8: Gel de digestión

Figura 9: Distribución genotípica del polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR

Figura 10: Distribución alélica del polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR

Figura 11: Comparación de frecuencia genotípica TT con otros países

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Estadísticos de la edad de 92 pacientes del Instituto Materno Perinatal San Bartolomé

Tabla 2: Distribución genotípica y alélica del polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR en 92 pacientes del Instituto Materno Perinatal San Bartolomé (2013)

Tabla 3: Bondad de ajuste χ^2 : observado & esperado

Tabla 4: Comparación de las frecuencias alélicas del polimorfismo C677T en mujeres gestantes con otras poblaciones de la región

Tabla 5: Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de varias regiones del mundo

Tabla 6: Genotipos CC de un total de 92 pacientes del Instituto Materno Perinatal San Bartolomé Herrera

Tabla 7: Genotipos CT de un total de 92 pacientes del Instituto Materno Perinatal San Bartolomé Herrera

Tabla 8: Genotipos TT de un total de 92 pacientes del Instituto Materno Perinatal San Bartolomé Herrera

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

DTNs: defectos del tubo neural.

FH₄: 5,6,7,8-tetrahidrofolato.

FH₂: 7,8-dihidrofolato.

hFR: human folate receptor (receptor de folato humano).

MTHFR: metilentetrahidrofolato reductasa.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

pb: pares de bases

RCF: reduced folate carrier (transportador de folato reducido).

RFLP. Fragmentos polimórficos de longitud variable.

RPM: Revoluciones por minuto

SAM: S-adenosil metionina.

SNP's: single nucleotide polymorphism (polimorfismo de nucleótido simple).

RESUMEN

La enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), cataliza la conversión de la 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, esta enzima es un intermediario entre el ciclo del folato y el ciclo de la remetilación del aminoácido homocisteína a metionina. Una mutación puntual C677T en el gen de esta enzima trae como consecuencia el cambio del aminoácido Ala por Val, lo cual conlleva a la formación de una enzima termolábil que finalmente se evidencia con un incremento en los niveles de homocisteína en sangre. Se ha documentado la relación de niveles altos de homocisteína y el incremento de la presión arterial y su posible relación a enfermedades coronarias e hipertensión. La determinación del polimorfismo C677T de la MTHFR, tiene índices muy variados en las distintas poblaciones y regiones del mundo.

Estimar las frecuencias de este polimorfismo en nuestro país, permitiría al especialista determinar posibles poblaciones en riesgo a estas enfermedades asociadas, como preeclampsia. Se extrajo muestras de sangre venosa de 92 gestantes del Instituto Materno Perinatal San Bartolomé Herrera (Lima-Perú). Se encontraron 32 gestantes CC (34.8%), 44 gestantes CT (47.8%), y por último 16 gestantes TT (17.2 %). Se encontró una frecuencia de 58.7 % y 41.3% para el alelo C y T respectivamente.

Se estimó que la muestra estudiada se encuentra en Equilibrio de Hardy-Weinberg ($X^2=0.0022$) y que los valores de las frecuencias genotípicas y alélicas se encuentran de acorde a los publicados por otras investigaciones en nuestro país y la región sudamericana.

Aun cuando la relación del alelo mutado T y el desarrollo de hipertensión no ha sido demostrada en nuestro país, el monitoreo y la incidencia del polimorfismo C677T y estudios tipo caso-control nos permitiría tener más evidencias sobre esta posible relación en nuestra población.

Palabras claves: 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa, polimorfismo, gestantes, hipertensión.

ABSTRACT

The enzyme 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), catalyzes the conversion of the 5,10-methylenetetrahydrofolate into 5-methyltetrahydrofolate, this enzyme is an intermediary between the folate cycle and remethylation cycle of the amino acid homocysteine to methionine. A specific C677T mutation in the gene of the enzyme results in changing Ala by Val aminoacid, and as a consequence a thermolabile enzyme is formed which is finally evidenced by a rise in the levels of homocysteine in the blood. It has been documented a relationship among high levels of homocysteine and increased blood pressure and its possible relationship to coronary disease and hypertension. The determination of the C677T polymorphism of MTHFR has very varied rates in different populations and regions around the world.

Estimating the frequencies of this polymorphism in our country, would allow the specialist to identify potential populations in risk to associated diseases, such as Pre-eclampsia. Venous blood samples from 92 pregnant women from The Maternal Perinatal Institute San Bartolomé Herrera (Lima - Peru) were taken. 32 pregnant women CC (34.8%), 44 pregnant women CT (47.8 %) and finally 16 pregnant women TT (17.2 %) were found.

A frequency of 58.7 % to 41.3 % was determined for C and T alleles, respectively. It was estimated that the sample studied is in equilibrium with Hardy - Weinberg ($X^2=0.0022$) and the values of the genotype and allele frequencies are like the reported by other research published in our country and in the South American region.

Although the ratio of the mutated allele T and the development of hypertension has been demonstrated in our country, the monitoring and the incidence of C677T polymorphism and case-control studies, allow us to be more aware about the possible relationship in our population.

Key words: 5,10-methyltetrahydrofolate reductase, polymorphism, pregnant women , hypertension.

I.- INTRODUCCION

El ácido fólico es una de las moléculas más importantes en los procesos metabólicos por estar implicado en la remetilación de moléculas como el ADN, lípidos, histonas, proteínas, por lo que es necesario desde los comienzos del desarrollo del organismo (embriogénesis) y durante toda su vida ya que es esencial para la multiplicación y diferenciación celular (González et al., 2010).

La carencia de ácido fólico se debe a diversas causas, como por ejemplo una deficiente ingesta en productos ricos en folatos, una mala absorción como sucede en enfermedades con una mucosa alterada en el intestino, aumento de la demanda en el embarazo, en un metabolismo deteriorado, o en presencia de polimorfismos genéticos.

El polimorfismo (C677T) puntual (SNP's) en el gen de la enzima 5-10 metilentetrahidrofolato reductasa (5-MTHFR) provoca la sustitución del aminoácido alanina (Ala) por una valina (Val), conllevando a una termolabilidad de la enzima y a una actividad enzimática disminuida. Esta enzima, que participa en el metabolismo del ácido fólico, cataliza la conversión de la 5-10 metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, el cual es un donador de grupos metilo, útiles para la conversión de homocisteína a metionina, la disminución de su actividad enzimática provoca el incremento de la homocisteína en el plasma. Ilhan et al. (2008) trabajando en una población de 278 individuos demostraron la relación directa entre valores elevados de homocisteína en plasma y la hipertensión.

Se ha relacionado la presencia del polimorfismo C677T de la MTHFR con otras distintas enfermedades, como: riesgo coronario (Klerk et al., 2002), tromboembolia venosa (González-Porrada et al., 2010), malformaciones nerviosas (Mares & Saavedra, 2009), retraso mental, eclampsia, preeclampsia (Briones et al., 2007) y cáncer (Duthie, 1999). Muchos trabajos (Nygård et al., 1995, Bortolotto et al.1997, Sheu et al., 2000, Graziano et al., 2006, Ilhan et al. 2008) también han documentado la

relación de la incidencia del polimorfismo C677T de la MTHFR con cáncer, hipertensión o riesgo coronario.

Por ello, contar con marcadores predictivos para caracterizar poblaciones de riesgo en mujeres gestantes - con posibles problemas de hipertensión y riesgo de desarrollar preeclampsia - que nos permita conocer la frecuencia de la mutación y su relación con los portadores del polimorfismo C677T de la MTHFR es fundamental para obtener bases de valor predictivo en mujeres gestantes, que permitan al especialista tener un mayor cuidado en mujeres gestantes con riesgo genético a desarrollar un cuadro de hipertensión (preeclampsia).

II.- MARCO TEÓRICO:

2.1.- Ácido fólico

El ácido fólico, ácido pteroilglutámico o folato (forma natural de la vitamina) es una vitamina hidrosoluble (Stryer et al., 2013; 441p), incluida en la serie conocida como complejo vitamínico B (Vitamina B9). El derivado activo (la forma reducida) de esta molécula es el ácido 5,6,7,8-tetrahidrofólico, denominado normalmente tetrahydrofolato (FH_4), el cual actúa como coenzima transportando unidades activas de un átomo de carbono (Condado, 2009). La variedad e importancia de las reacciones metabólicas en las que participa este derivado hacen que, el ácido fólico sea una molécula indispensable para la vida.

2.1.1.- Estructura del ácido Fólico.-

El ácido fólico, constituye una familia de sustancias que contienen un anillo de pteridina unido a un ácido *p*-aminobenzoico, el cual a su vez está unido a un ácido glutámico (Figura 1) (Voet & Voet, 2006; 1067-69p). Dicho de otra forma, esta molécula está formada por 3 unidades características: una pteridina con una sustitución en su estructura, una molécula de ácido *p*-aminobenzoico y uno o más residuos de ácido L-glutámico unidos por enlaces γ peptídicos (Devlin, 2004; 1154p), habitualmente de 2 a 7 residuos de ácido glutámico. La pteridina, que en el ácido fólico es la 2-amino-4-hidroxi-6-metilpteridina, es el compuesto nitrogenado bicíclico originado de las pterinas, en este caso 6-metilpterina. El anillo de pteridina puede encontrarse en forma no reducida, parcialmente reducida (dihydrofolato) (FH_2) o totalmente reducida, como el tetrahydrofolato (FH_4), y es esta última la forma biológicamente activa, capaz de aceptar diferentes fragmentos de un carbono. La reducción del anillo de pteridina genera al FH_4 , para esto, el anillo de pteridina es reducido para dar el 7,8-dihydrofolato (FH_2) y nuevamente reducido para dar el 5,6,7,8-tetrahydrofolato (FH_4) (Stryer et al., 2013; 441p). Estas formas reducidas pueden ser sustituidas por una unión covalente a un carbono unido al nitrógeno por las posiciones

5 ó 10. Así el ácido pteroilglutámico se convierte por reducción en su forma de coenzima FH₄ y actúa en la transferencia de algunos fragmentos monocarbonados.

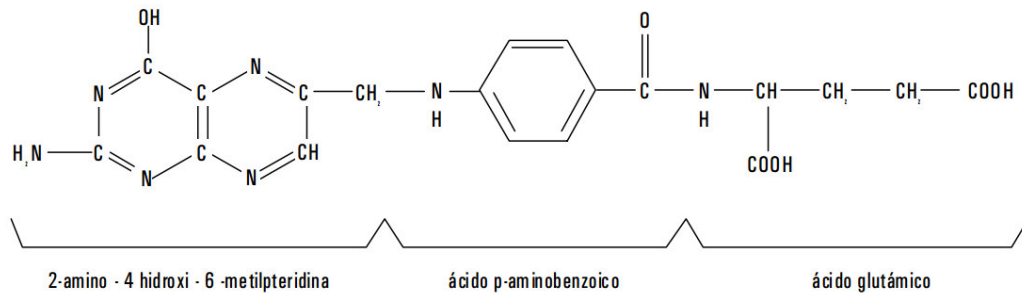


Figura 1: Estructura del ácido fólico indicando las 3 unidades características que lo conforman: una pteridina, una molécula de ácido p-aminobenzoico y uno o más residuos de ácido L-glutámico. (Pita Rodríguez, 1998).

2.1.2.- Función del ácido Fólico.-

El ácido fólico es un transportador intermediario de grupos hidroximetilo, formilo o metilo, y otros (Devlin, 2004; 435p), entre metabolitos o por interconversión. Cada una de estas formas está envuelta en funciones metabólicas claves:

- Interconversión de aminoácidos: la forma que incluye un metileno está envuelta en el metabolismo de serina/glicina y en la síntesis de timidilato; formilo, en el catabolismo de la histidina; metil, en la síntesis de metionina (Boccia et al., 2007).
- Biosíntesis de purinas (metenil y formil) y pirimidinas (metil) requeridas en la síntesis del DNA (Marek & John, 2007; 10p), durante la fase S del ciclo celular.
- Remetilación de la homocisteína, que produce grupos metilo para la metilación del DNA, proteínas y lípidos (Gotze et al., 2007).
- Donador de un grupo metilo para la formación de metilcobalamina, para la síntesis de metionina.

En la célula, la 5- metiltetrahidrofolato sirve como donador de metilo y fuente de tetrahidrofolato (H4PteGlu1) esta actúa como un receptor de unidades de un carbono produciendo una variedad de otros folatos que a su vez sirven como coenzimas específicas en varias reacciones. Una de las reacciones requiere 5,10- metilentetrahidrofolato y 5-metilentetrahidrofolato en la síntesis de metionina (Figura 2) de la homocisteína (la vía de remetilación en el metabolismo de la homocisteína). En esta reacción la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa desempeña un papel vital reduciendo la 5,10-metilentetrahidrofolato a 5- metiltetrahidrofolato, cataliza la única reacción en la célula que finalmente genera 5-metiltetrahidrofolato.

2.1.3.- Ruta metabólica:

El metabolismo del ácido fólico aborda tres procesos importantes: la formación de FH_4 , formación de pirimidinas y la metilación de ADN y otras moléculas. El ciclo se inicia con el ingreso del folato al enterocito mediante receptores RCF y hFR, el cual es doblemente reducido para formar FH_4 , primero, gracias a la acción de la enzima dihidrofolato reductasa, que da lugar a la metiltetrahidrofolato y luego reducida a FH_4 , gracias a la acción de la metionina sintetasa.

El FH_4 se transforma a metileno FH_4 por la participación de vitamina B6. Adicionalmente, el 5,10-metilentetrahidrofolato, actúa como sustrato de la enzima timidilato sintasa para la formación de dihidrofolato (FH_2) y de nuevo a FH_4 . En la síntesis de pirimidinas, la timidilato sintasa actúa sobre dioxiurudina monofosfato (dUMP) para formar dioxitimidina monofosfato (dTMP) (Ulrich et al., 2001; Hider et al., 2006).

En esta cascada de reacciones también se donan grupos metilo, necesarios para la metilación de homocisteína, con la ayuda del cofactor B12 (Figura 3), para lograr la formación de metionina y de la S adenosil metionina (SAM), el mayor donante de grupos metilo a nivel intracelular (Hider et al., 2006).

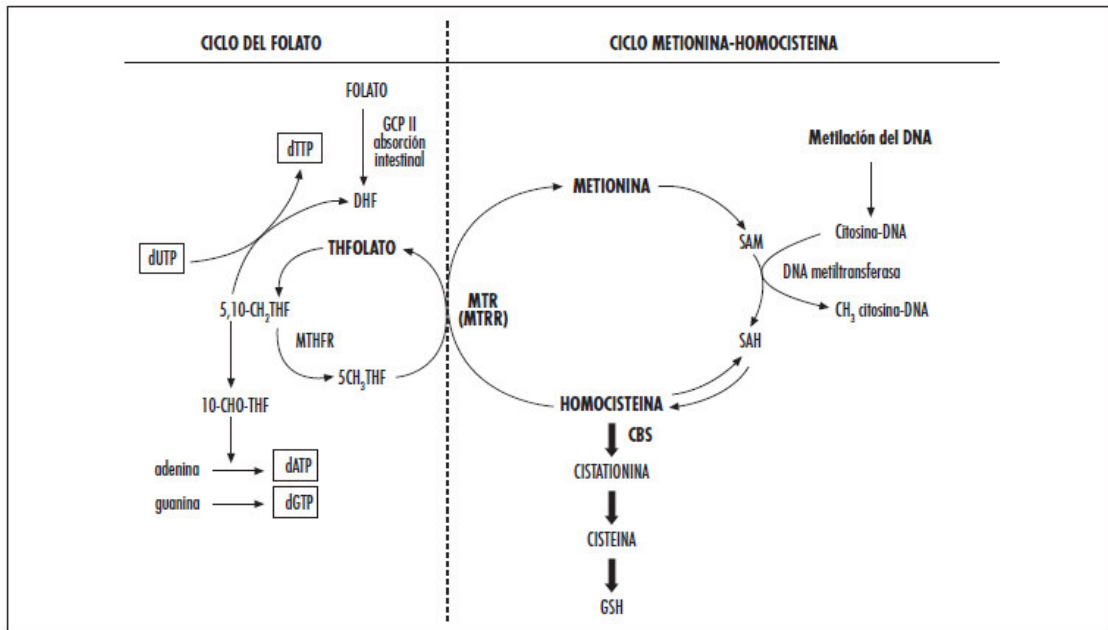


Figura 2: Ciclo metabólico de la homocisteína. GPC II = Glutamato-carboxipeptidasa II. MTHFR= Metilentetrahidrofolato reductasa MTRR = 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína-S-metiltransferasa. SAM = S-adenosil-L-metionina. SAH = S-adenosil-L-homocisteína. CBS = Cistationina B sintetasa. GSH =Glutación reducido (Gonzales Martin-Moro et al., 2005).

2.1.4.- Absorción del ácido fólico

El hombre no posee la capacidad de sintetizar ácido fólico, por ello deben recurrir a otras fuentes (Krumdieck, 1976). En efecto, adquieren esta vitamina principalmente a partir de la dieta y, en menor proporción, de los microorganismos existentes en su tubo digestivo. Se encuentra principalmente en vegetales verdes, como la lechuga, espinaca, espárragos y brocoli, muchas frutas, particularmente los cítricos, los plátanos y el melón, hígado, riñón, huevos y leche, pero se destruye fácilmente durante la cocción debido a que son altamente sensibles al calor. La absorción de ácido fólico debe suplir los requerimientos diarios de un ser humano adulto que van de 180 a 200 µg/dL, aunque estas necesidades aumentan hasta 400 µg durante el embarazo (Chanarin et al., 1968).

Esta vitamina se encuentra en los alimentos generalmente en forma de poliglutamatos; es decir que el residuo de ácido glutámico presente en la molécula de ácido fólico se encuentra unido a otras moléculas de ácido glutámico mediante uniones peptídicas (función amida). Los poliglutamatos no pueden ser absorbidos por el intestino por lo cual primero se escinde la cadena de residuos de glutamato para obtener el monoglutamato (ácido fólico propiamente dicho). Esta reacción es catalizada por la enzima denominada conjugasa (folato hidrolasa), presente en el borde en cepillo de las células de la mucosa yeyunal (Abratte et al., 2008). Posteriormente y sin el requerimiento de ningún cofactor, como es necesario para otras vitaminas, es absorbido y convertido en el interior de la célula de la mucosa intestinal, en 5-metiltetrahidrofolato (Figura 2). El ácido fólico circula en el plasma en forma de 5-metiltetrahidrofolato libre o ligado débilmente a la albúmina y es captado por todos los tejidos, pero principalmente por el tejido hepático donde se almacena en forma de poliglutamatos y usado en las reacciones metabólicas (Devlin, 2004; 1154p).

2.1.5.- Deficiencia del ácido fólico.

La falta de ácido fólico afecta a todas aquellas rutas metabólicas en las cuales participa cediendo o aceptando unidades monocarbonadas. Esto produce una serie de trastornos que se manifiestan en forma de patologías. El déficit de ácido fólico puede producirse en el hombre, por diversos motivos. Uno de ellos, el más frecuente, es una mala alimentación. La dieta habitual no contiene mucho más de la demanda diaria mínima y los depósitos tisulares en los adultos sólo se mantienen unos tres meses. Otra causa es la absorción deficiente que ocurre, en general, en asociación con los síndromes de mala absorción intestinal. La utilización inadecuada del ácido fólico, en cambio, es mucho menos frecuente y puede estar asociada a cierto bloqueo de su metabolismo por el alcohol o por el uso de antagonistas del ácido fólico, como el metotrexato, utilizado habitualmente en el tratamiento de neoplasias (Devlin, 2004; 435p).

De todas las reacciones bioquímicas en las que participan los derivados del ácido fólico las más importantes son las involucradas en la síntesis de nucleótidos (monómeros de los ácidos nucleicos). Cuando estas reacciones se interrumpen por algún motivo, déficit de ácido fólico, por ejemplo, los ácidos nucleicos no pueden sintetizarse y, como consecuencia de esto, las células no pueden replicarse. Por lo tanto, se ven seriamente afectadas todas aquellas regiones del organismo que requieren de la multiplicación constante de ciertas células. En efecto, los tejidos y órganos más afectados son aquellos de intercambio celular continuo como las células sanguíneas y la mucosa intestinal. De esta manera, en el primer caso, la alteración en la síntesis de ADN que existe en el déficit de ácido fólico conduce a una patología con un cuadro morfológico característico en la sangre periférica y en la médula ósea, que se conoce con el nombre de anemia megaloblástica (Forrellat & Gautier, 1997), en el cual los hematíes retrasan su maduración, dando lugar a hematíes anormalmente grandes y frágiles (macrocíticos). En el caso de las células de la mucosa intestinal, también se produce una atrofia de las células de la mucosa del tubo digestivo que puede provocar un estado de malabsorción y, a su vez, intensificar el déficit primario de ácido fólico.

2.1.6.- Consecuencia:

La deficiencia de folatos contribuye a la hiperhomocisteinemia, la cual se define como un aumento del aminoácido homocisteína en el plasma. También se relaciona con los defectos de tubo neural (Laurence et al., 1981; Nitsche et al., 2003), así como con la patogénesis de varios tipos de cáncer (Delgado-Enciso, 2001), retinopatía diabética y otras enfermedades (Dos Santos et al., 2010).

2.1.6.1.- Hiperhomocisteinemia.

La homocisteína es un aminoácido azufrado caracterizado por la presencia de un grupo tiol libre, que no está presente en las proteínas de la dieta sino que se forma

exclusivamente como producto intermediario en el metabolismo de la metionina a cisteína (Figura 2). Por tanto, la única fuente de homocisteína en el organismo es el aminoácido esencial metionina. Una vez formada la homocisteína se inician dos rutas metabólicas: Transulfuración y remetilación (Finkelstein, 1998) (Figura 2). El que la homocisteína siga una ruta u otra viene determinado por la concentración plasmática de metionina. Si ésta aumenta, hay un aumento de la transulfuración y disminución de la remetilación. Cuando aumenta la síntesis de homocisteína o disminuye su catabolismo aumenta su flujo hacia el espacio extracelular. Por tanto la concentración plasmática de homocisteína es un indicador de la actividad de las enzimas y de la disponibilidad de coenzimas involucradas en su metabolismo.

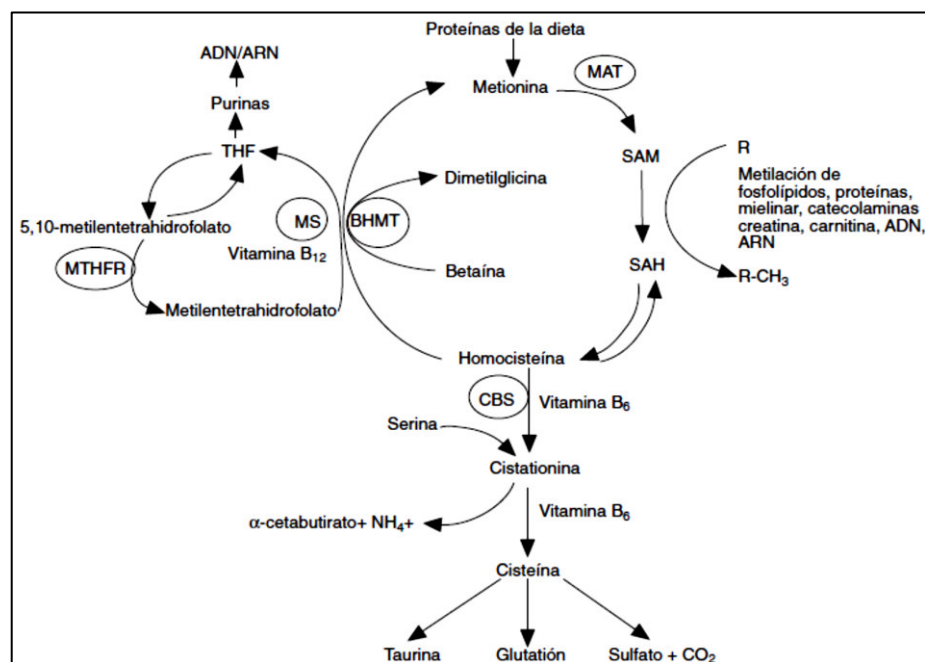


Figura 3: Ruta metabólica de la MTHFR (De Luis et al. 2004).

Sin embargo, la concentración de homocisteína total es producto de una compleja interacción entre múltiples factores genéticos y ambientales. En su concentración influyen una serie de determinantes fisiológicos, como la edad, el sexo, la menopausia, el embarazo y el grupo étnico. Los defectos genéticos también pueden influir en las concentraciones de homocisteína; se conocen 3 déficits enzimáticos que alteran la

concentración de homocisteína: deficiencia de cistationina- β -sintasa, deficiencia de metionina sintasa, y la deficiencia de la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa.

La deficiencia de la actividad de la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa provoca la escases de metiltetrahidrofolato, el cual remetila el 50% de la homocisteína para formar metionina (De Luis et al., 2004). Una falta de metiltetrahidrofolato, provoca un aumento de la concentración de homocisteína (Figura 2) desarrollando hiperhomocisteinemia, especialmente en concentraciones de folatos escasas.

La hiperhomocisteinemia es considerada un factor de riesgo en las enfermedades cardiovasculares (Kluijtmans et al., 1997), y su presencia se debe a deficiencia renal, arterioesclerosis, neoplasias, hipotiroidismo, hepatopatías crónicas y medicamentos antagonistas del ácido fólico, pero también - como se ha visto - tiene un trasfondo genético. De los 3 déficit enzimáticos estudiados para esta enfermedad, el más frecuente es el de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa, produciendo una elevación moderada de homocisteína en plasma (García, 2005).

2.2.- Enzima metilentetrahidrofolato reductasa (E.C. 1.5.1.20).

La enzima es un homodímero y presenta el siguiente código de comisión (E.C.: enzyme commission): 1.5.1.20. Cada número indica una característica de la enzima y están definidos de la siguiente manera:

- 1: Clase de enzima (oxidoreductasa): El sustrato oxidado se considera como donador de hidrógenos o electrones.
- 5: Subclase de enzima: Actúa sobre los grupos CH-NH de los donantes.
- 1: Sub-subgrupo: se refiere a la reacción química específica que cataliza la enzima, con NAD o NADP como aceptor.
- 20: Enzima (MTHFR): se refiere al número progresivo de orden de acuerdo a su identificación, metilentetrahidrofolato reductasa [NAD(P)H].

La metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es una de las enzimas claves en el metabolismo de los folatos, con una gran consideración genética y clínica. Esta enzima es responsable de convertir la 5,10 metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, que es el donador de grupos metil para la remetilación de homocisteína en metionina (Gotze et al., 2007), la metilación de ADN, proteínas, lípidos, síntesis de purinas, etc. La MTHFR es una flavoproteína que al catabolizar la reducción de metilentetrahidrofolato a metiltetrahidrofolato usa NADPH como equivalente reductor (Figura 4) (Matthews et al., 1998).

La MTHFR humana es una proteína que posee dos isoformas, una de 77 kDa y otra de 70 kDa de peso molecular. La isoforma de 77 kDa es ubicua y la de 70 kDa se encuentra en el hígado del adulto y en el hígado y los riñones fetales (Goyette et al., 1994).

La enzima MTHFR está conformada por una estructura barril $\alpha_8\beta_8$, formando un homodímero en que cada subunidad contiene un dominio catalítico N-terminal de aproximadamente 40 kDa y un dominio regulador C-terminal de aproximadamente 37 kDa (Xi-mei et al., 2013). El dominio C-terminal sería donde se une el inhibidor S-adenosilmetionina (Gotze et al., 2007).

2.2.1.- Función de la enzima MTHFR.

La MTHFR está involucrada en una compleja vía bioquímica, permitiendo la formación de metiltetrahidrofolato a partir del metilentetrahidrofolato. Así los folatos, en su forma 5-metil, participan en la transferencia de unidades de carbón como parte de la síntesis de nucleótidos, síntesis de S-adenosil-metionina; la remetilación de homocisteína a metionina, y la metilación de ADN, proteínas, neurotransmisores y fosfolípidos. La actividad regular de la MTHFR permite mantener los niveles de folato, metionina y posiblemente mantener el aumento de la homocisteína en plasma.

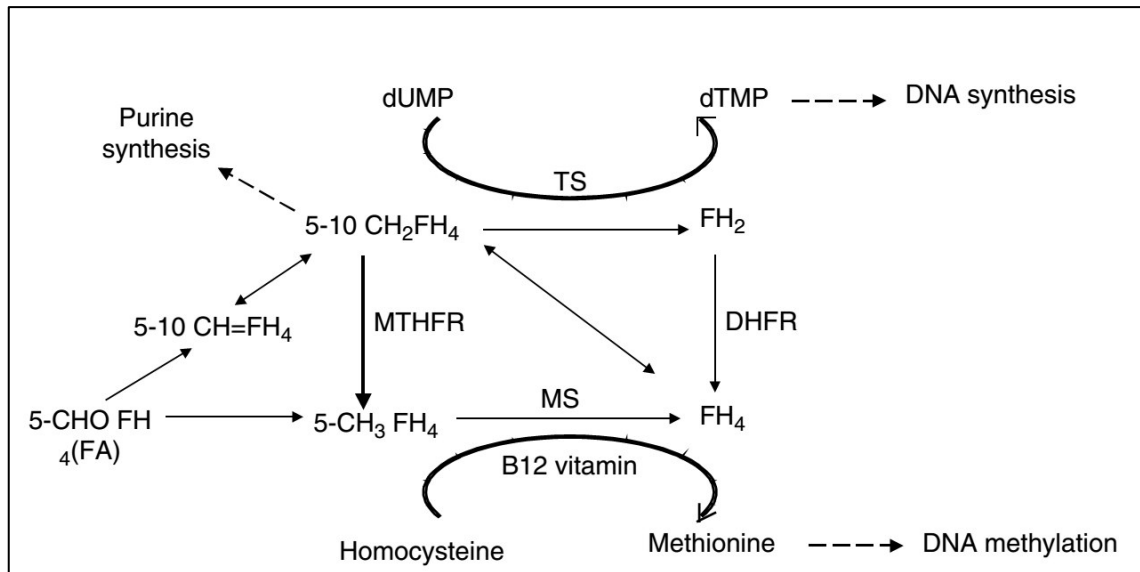


Figura 4. Formación de 5-metiltetrahidrofolato a partir de 5,10-MTHF y los diferentes usos del grupo metil donado a partir de la 5-CH₃FH₄ y la vía metabólica involucrada en la producción de FH₄ (Etienne et al., 2004).

2.2.2.- Deficiencia de la actividad enzimática de MTHFR.

El mal funcionamiento de la enzima MTHFR puede llegar a influir en el riesgo de contraer cáncer, frecuentemente gástrico o de mama, y enfermedades coronarias. Se han encontrado elevadas concentraciones de homocisteína en pacientes con enfermedad arterial (Ilhan et al., 2008) e hipertensión (Sheu et al., 2000). Así, una concentración elevada de homocisteína en pacientes hipertensos ha sido correlacionada con la presión arterial (Nygård et al., 1995; Bortolotto et al., 1997). Ilhan et al., en el 2008, trabajaron con 278 individuos escogidos aleatoriamente para comprobar tal relación llevando a cabo un tratamiento de reducción de la concentración de homocisteína que mostró una disminución en la presión sanguínea, lo cual evidencia tal relación.

2.3.- Gen *MTHFR*.

El gen *MTHFR* codifica para la enzima metilentetrahidrofolato reductasa, la cual participa en el metabolismo de folatos, una ruta metabólica de gran importancia, que participa en la biosíntesis de ADN y proteínas (Martinez-Frias, 2008).

2.3.1.- Ubicación del gen.

El gen *MTHFR* está ubicado en el brazo corto del cromosoma 1 en la región p36.3 (Figura 5).

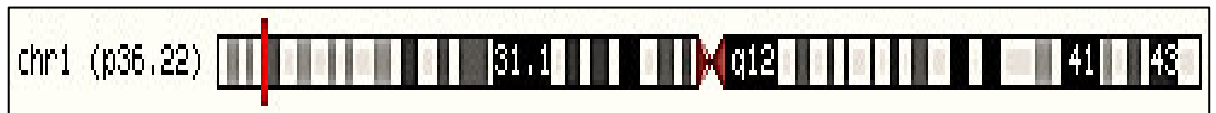


Figura 5: Ubicación del gen MTHFR en el brazo corto del cromosoma 1. [//genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr1%3A11845787-11866160&hgid=392188563_AeapKZ4kgEA4I8d3RJilx6XO9utl](http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr1%3A11845787-11866160&hgid=392188563_AeapKZ4kgEA4I8d3RJilx6XO9utl) (09/11/13)

Su región promotora tiene sitios de unión para factores de transcripción, pero no cuenta con cajas de secuencias TATA. Esta región es similar a las secuencias promotoras de otros genes codificantes como, por ejemplo, cistationina sintetasa, metionina sintetasa y metionina sintetasa reductasa (Homberger et al., 2000). En el exón 1 del gen de la MTHFR hay un sitio de *splicing* alternativo. Las secuencias UTRs de este gen son largas y se postula que están relacionadas con la regulación de genes complejos (Goyette et al., 1998).

Ahora está claro que los niveles bajos de expresión del gen de la MTHFR están asociados con un incremento medio de las concentraciones de homocisteína en plasma (Brattstrom et al., 1998).

2.3.2.- Tamaño del gen.

El gen tiene un tamaño de 1,980 pb con una masa molecular de 74.6 KDa (Nelen et al., 2000). La secuencia complementaria de DNA tiene una longitud de 2,200 pb (Lorenzo & Quanhe, 2000) y 11 exones cuyo tamaño va desde 102 pb a 432 pb, el cual sintetiza una proteína de aproximadamente 70 kDa (Boccia et al., 2008).

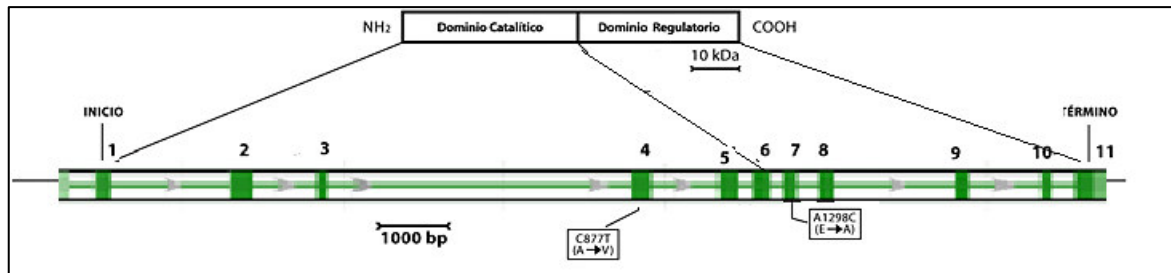


Figura 6: Tamaño del gen de la MTHFR indicando sus 11 exones. [//www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000001.11?report=graph&from=11782673&to=11809158&strand=true&app_context=Gene&asm_context=GCF_000001405.26](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000001.11?report=graph&from=11782673&to=11809158&strand=true&app_context=Gene&asm_context=GCF_000001405.26).

2.4.- Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP).

Dentro de los factores genéticos están cobrando mucha importancia algunas de las variantes polimórficas de tipo puntual (SNP, single nucleotide polymorphism) que existen en los genes que codifican a ciertas enzimas implicadas, directa o indirectamente, en el ciclo metabólico de folato que conllevan a un aumento de la concentración de homocisteína como efecto directo. Entre los más relevantes encontramos: MTHFR (Metilentetrahidrofolato reductasa) 677 C>T, MTHFR 1298 A>C, MTRR (metionina sintasa) 66 A>G y la GPCII (gen de la glutamatocarboxipeptidasa II) 1560 C>T.

Una mutación puntual en el nucleótido 677 del gen *MTHFR*, cambia una base Citosina a Timina y provoca una sustitución de aminoácidos de alanina a valina en la posición 223 de la enzima MTHFR, esta alteración produce una versión termolábil de la enzima 5-MTHFR, que presenta menor actividad enzimática conllevando a un aumento de los niveles de homocisteína (Frosst et al., 1995).

2.4.1.- Polimorfismos existentes en el gen *MTHFR*.

Se sabe que la mayoría de los genes que codifican para las enzimas involucradas en el metabolismo del folato son polimórficos (Zhang et al., 2007). En el gen *MTHFR* existen 29 mutaciones raras que resultan en una actividad enzimática considerablemente baja, las cuales han sido descritas en pacientes que padecen de homocistinuria (Boccia et al., 2008), asociado directamente con enfermedades

cardiovasculares, mientras que en individuos no homocistinúricos y considerados sanos se han encontrado dos polimorfismos funcionales frecuentes, cuyas variantes genóticas son asociadas con bajos niveles de folato en plasma sanguíneo (Sun et al., 2008). El primero de ellos corresponde al polimorfismo de cambio de C a T en el nucleótido 677 del exón 4 (C677T); el segundo, a un cambio de A a C en el nucleótido 1.298 del exón 7 (A1298C). Estos dos polimorfismos se localizan a 2,1 kb el uno del otro, y se ha investigado la asociación de estos polimorfismos con el riesgo de padecer diversas tipos de cáncer (Larsson et al., 2006; Boccia et al., 2008). Si bien estos polimorfismos se relacionan con bajos niveles de folato en plasma sanguíneo, el primero es más relevante. La actividad enzimática de los heterocigotos (CT) es del 65% y del 30% para los homocigotos (TT) con respecto al alelo mayor (CC) (Boccia et al., 2008; Sun et al., 2008).

2.4.1.1.- Polimorfismo C677T.

En el caso del polimorfismo C677T, en el año 1995 Frost et al., encontraron una mutación puntual en la posición 677 (C por T) del gen de la enzima MTHFR que conduce a una enzima termolábil y una actividad enzimática significativamente reducida, ya sea en su estado homocigoto 677T/677T o heterocigoto 677C/677T. Probablemente esta mutación cambie la estructura secundaria del péptido y las interacciones entre monómeros. La proteína modificada pierde su cofactor FAD más rápidamente y tiene menos estabilidad (Guenther et al., 1999; Yamada et al., 2001). El efecto de la mutación puede ser suprimido si se adiciona folato (Yamada et al., 2001; Pejchal et al., 2006). A partir de este hallazgo el genotipo homocigoto (677TT) ha sido relacionado con bajos niveles de folato en suero, homocisteína elevada en plasma (Dierkes et al., 2001; Russo et al., 2003), distribución alterada de distintos tipos de folato en las células (Bagley & Selhub, 1998) y aumento del riesgo de generar enfermedad coronaria (Klerk et al., 2002) y varios tipos de cáncer (Duthie, 1999).

2.5.- MTHFR C677T y enfermedades asociadas.

El polimorfismo C677T está asociado con diversas enfermedades como:

- Hiper-homocisteinemia, este es un factor de riesgo para la enfermedad coronaria y se asocia con mayor frecuencia a casos de enfermedad tromboembólica venosa (Gonzales-Porrassa et al., 2010).
- Defectos del tubo neural, estos pueden ser: Anencefalia, Encefalocele, o Espina bífida (mielomeningocele, meningocele) (Mares & Saavedra, 2009).
- En complicaciones obstétricas como preeclampsia, aborto, retardo en el crecimiento, y mortinatos (Escudero et al., 2003).
- El desarrollo de preeclampsia en mujeres gestantes (Briones et al., 2007).

En todos los casos, esta mutación puntual C677T, determina una alteración en la actividad de la enzima 5-MTHFR conllevando a un menoscabo en la salud de la persona que porta dicha mutación. Así, diferentes investigaciones han asociado al genotipo MTHFR-TT con la hipometilación del ADN, particularmente en individuos con concentraciones reducidas de folato en plasma (Graziano et al., 2006). Estudios realizados en distintas poblaciones del mundo muestran una alta asociación del polimorfismo C677T y la susceptibilidad de cáncer gástrico (Graziano et al., 2006; Boccia et al., 2007), de mama (Semenza et al., 2003; Langsenlehner et al., 2007) y enfermedad coronaria (Huh et al., 2006; Ilhan et al., 2008).

2.5.1.- MTHFR C677T y defectos congénitos.

Lorenzo y Quanhe en el 2000, relacionaron el polimorfismo C677T del gen de la MTHFR con defectos congénitos, debido a la importancia de la enzima MTHFR en la síntesis de ADN.

2.5.2.- MTHFR C677T y defectos del tubo neural.

La espina bífida (EB) es una anomalía congénita que forma parte del grupo de los defectos de cierre del tubo neural (DTN) y que ocurre por alteraciones en el desarrollo embrionario entre las semanas 3 y 5 de gestación. La EB es el DTN más frecuente en los neonatos nacidos vivos y se asocia a mayor morbimortalidad, así como a diversos grados de discapacidad.

Los estudios intervencionales, incluidos tanto estudios controlados aleatorizados como no aleatorizados (Laurence et al., 1981; Kirke et al., 1992), han demostrado el rol protector del ácido fólico frente a los DTN, obteniéndose la evidencia más potente después de dos estudios controlados aleatorizados: el estudio del Medical Research Council (MRC) sobre recurrencia de DTN (Medical Research Council, 1991) y el estudio húngaro sobre ocurrencia de DTN (Czeizel & Dudas, 1992).

2.5.3.- MTHFR C677T y síndrome de Down.

Actualmente se considera que el déficit de folatos, junto a la presencia y asociación de diferentes polimorfismos en los genes encargados de su metabolismo podrían aumentar también dicho riesgo (James et al., 1999; Martínez-Frías, 2008). Para el gen de la MTHFR, diversos estudios reportan la asociación de diferentes polimorfismos de este gen y un aumento en el riesgo materno de tener hijos con síndrome de Down (Hobbs et al., 2000; Ueland et al., 2001; Czeizel & Puho, 2005).

2.5.4.- MTHFR C677T e hipertensión.

La identificación de hipertensión susceptible a genes es un tema largamente estudiado (Levy et al., 2009; Padmanabhan et al., 2012). La identificación del polimorfismo de la MTHFR como posible candidato, se debe al papel de esta enzima en la remetilación de la homocisteína a metionina. La reducida actividad de esta enzima, los bajos niveles de folato y la hiperhomocisteinemia son algunas de las evidencias de este polimorfismo. La hiperhomocisteinemia está relacionada a la hipertensión y a la

hipertensión gestacional porque podría inducir la contracción arteriolar, la disfunción renal y el incremento de la reabsorción de sodio, aumento de la rigidez arterial y el estrés oxidativo (Yang et al., 2014).

2.5.5.- MTHFR C677T y enfermedades cardiovasculares.

Se ha establecido que el polimorfismo puntual C677T determina una elevación de homocisteína total en plasma, el cual está relacionado a un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares. Por ello también se ha relacionado a la aparición de cardiopatías congénitas, como por ejemplo la tetralogía de Fallot (Marinho et al., 2009), comunicación interventricular (García et al., 2006).

2.5.6.- MTHFR C677T y pérdidas gestacionales.

La patogénesis de los abortos espontáneos es compleja, que involucra interacción de varios factores genéticos y ambientales. El polimorfismo C677T y A1298C del gen metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) se asocian comúnmente con defectos en el metabolismo de homocisteína dependiente de folatos y está implicado como factor de riesgo para pérdida de embarazo temprano (Nelen et al., 2000; Zetternerg et al., 2002).

2.5.7.- MTHFR C677T y preeclampsia.

La preeclampsia es una de las complicaciones del embarazo más severas, con características de síndrome de hipertensión relacionado con el embarazo que puede desencadenar en mortalidad fetal y/o maternal. Estudios sugieren que factores genéticos y ambientales podrían tener un importante efecto en el desarrollo de esta condición (Zhang et al., 1997; Kim et al., 2001; Laivuori, 2007).

Xi-mei Wang et al., en el 2013, en un meta-análisis de 51 estudios casos-control, conteniendo 6,403 pacientes y 11,346 controles, concluyeron que sí existe asociación

entre el gen C677T de la MTHFR y el desarrollo de preeclampsia en mujeres caucásicas y del este de Asia.

2.6.- Reportes de este polimorfismo en otras sociedades y sus estadísticas.

El polimorfismo de la MTHFR C677T varía dependiendo de la población estudiada. Mientras en la población afroamericana se han reportado frecuencias para el alelo T y genotipo TT de 0,11 y 0,00% respectivamente, en la población mexicana, se han reportado los mayores valores. En México, en el grupo étnico mestizo se presenta una frecuencia para el alelo T de entre 50 y 58,5% y se ha reportado una frecuencia genotípica para el homocigoto TT de 32 a 35,7% (García-Robles et al., 2011).

2.7.- Reporte de este polimorfismo en nuestro país.

Partiendo de la premisa de que en otras sociedades se ha documentado la relación del polimorfismo C677T de la MTHFR y la hipertensión, en el Perú se ha estudiado la relación del polimorfismo C677T de la MTHFR y la preeclampsia (Williams et al., 2004). Otro estudio se realizó en el contexto de la búsqueda de 3 marcadores genéticos asociados a trombosis y enfermedades cardiovasculares, desarrollado en el Instituto Nacional de Salud (INS) por Doris Agapito et al. en el 2007.

III.- OBJETIVOS

3.1.- OBJETIVO GENERAL:

- Determinar la prevalencia del polimorfismo C677T del gen de la enzima 5 MTHFR en un grupo de gestantes del Instituto Materno Perinatal San Bartolomé.

3.2.- OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en un grupo de gestantes del Instituto Materno Perinatal San Bartolomé.
- Determinar la valoración de heterocigosis u homocigosis del alelo para el gen *MTHFR* en un grupo de gestantes del Instituto Perinatal San Bartolomé.

Tipo de estudio:

La investigación se clasifica como: observacional, transversal, descriptiva.

Criterios de selección:

- ❖ Peruana de nacimiento.
- ❖ Edad: Mayor de 18 años.
- ❖ Sexo: Femenino (gestantes).
- ❖ Centro atención: Instituto Materno Perinatal San Bartolomé.
- ❖ Firma del consentimiento informado.

Variable:

- ❖ Polimorfismo C677T.
- ❖ Homocigotos CC.
- ❖ Heterocigotos CT.
- ❖ Homocigotos TT.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

A.- Lugar de ejecución:

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular en el Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “ALBERTO GUZMAN BARRÓN” de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

4.1.- MATERIALES

4.1.1.- Material biológico:

Se tomó de sangre venosa periférica a 92 mujeres gestantes del Instituto Materno Perinatal San Bartolomé Herrera, entre los meses de agosto 2012 y noviembre del 2013, extraídas con sistema vacutainer de 6 mL de capacidad con EDTA como anticoagulante, e inmediatamente fueron guardadas en refrigeración a 4°C.

4.1.2.- Materiales y reactivos:

a.- REACTIVOS, AGENTES Y ENZIMAS:

TBE 10X

Agarosa

Cloroformo

Bromuro de etidio

Agua des-ionizada

Agua destilada

Etanol absoluto

Kit de purificación de ADN (Thermo Scientific)

Buffer Taq 10X

MgCl 225mM

dNTP (Fermentas) 10 mM

0,5 U/uL de Taq polimerasa (Fermenta)

Primer F 10µM

Primer R 10µM

Ladder Rain seit

Endonucleasa de restricción HinfI (Thermo Scientific)

b.- MATERIAL DE VIDRIO Y PLÁSTICO:

Eppendorf 1,5 ml
Eppendorf 2 ml
Eppendorf 0,5 ml
Beaker 20, 50 mL
Tips 1000 µL, 100 µL, 200 µL

4.1.3.- Equipo:

Microcentrifuga MODELO Z-229 casa comercial CHERMLE
Cámara electroforética horizontal
Fuente poder N° 2197 casa comercial LKB BROMMA
Micropipetas 1 mL, 200 µL, 100 µL, 1-10 µL.
Termociclador MODELO N° 9902 de la casa APPLIED BIOSYSTEMS
MyFUGE modelo C1012 de la casa comercial Beckman
Baño María N° SERIE 0272 casa comercial Scientific Products
Congeladora MIRAY MODELO CMV-305
Transiluminador UV MODELO TM-26 casa comercial LABNET

4.2.- MÉTODOS

4.2.1.- Recoleccion de datos

Se colectaron en una ficha *ad-hoc* los datos personales y clínicos de la gestante atendida en el Instituto Materno Perinatal San Bartolomé Herrera. Se consideraron los datos maternos como: edad, estado civil, talla, peso, antecedentes personales patológicos (hipertensión, preeclampsia previa, diabetes mellitus, neuropatía, cardiopatía, diabetes, síndrome metabólico), antecedentes familiares (hipertensión, diabetes mellitus, obesidad, síndrome metabólico, otros), número de gestaciones, partos pretérmino, recién nacidos con peso bajo, niveles de hemoglobina, tipo de terminación del embarazo, edad de gestación al término del embarazo, estadía en hospital (días).

4.2.2.- Extracción del ADN a partir de sangre periférica

Se utilizó un kit de purificación de ADN, siguiendo el siguiente protocolo: Se mezcló 200 µL de sangre con 200 µL de solución de lisis, incubándolo a 65°C por 10 minutos, luego se agregó 300 µL de cloroformo y se procedió a centrifugar a 14,000 RPM por 2 minutos, la fase acuosa se mezcló con 400 µL de solución de precipitación, mezclándolo por inversión y centrifugándolo a 14,000 RPM por 2 minutos, luego se descartó el sobrenadante y el ADN pellet se disolvió en 50 µL de solución NaCl (1.2 M), a continuación se procedió a agregar 150 µL de etanol absoluto frío para permitir la precipitación de ADN y se centrifugó a 14,000 RPM por 4 minutos. Una vez precipitado el ADN, se procedió a eliminar el etanol y se dejó secar unos segundos al ambiente, el pellet se disolvió en 50 µL de agua ultrapura. El ADN disuelto se guardó a -20 °C hasta su uso.

4.2.3.- Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR:

Las reacciones de amplificación se realizaron con primers específicos para el gen de la MTHFR según metodología reportada por Briones et al., 2007 modificada en el Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición (CIBN) de la Facultad de Medicina de la UNMSM. Se utilizó la técnica de PCR-RFLP modificado por Oscar Acosta a las condiciones del laboratorio.

La amplificación del exón 4 del gen *MTHFR* se realizó en un termociclador programable para el análisis de la mutación C677T. Las secuencias de los primers de avance y retroceso fueron: 5'TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA'3 y 5'AGGACGGTGCGGTGAGAGATGG'3, respectivamente. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 12.5 µL. El mix contenía 4.12 µL de agua ultra pura, 1.25 µL de buffer KCl 10X, 3.12 µL de mezcla de dNTP (10 µM), 0.75 µL de MgCl₂ (2.5 mM), 0.63 µL del primer de avance (10 µM) y 0.63 µL del primer de retroceso (10 µM), 0.5 µL de Taq ADN polimerasa y 1.5 µL de ADN genómico.

La mezcla se sometió a amplificación con desnaturalización inicial a 94°C durante cuatro minutos, seguido por 34 ciclos de desnaturalización a 94°C durante un minuto, hibridación a 63°C durante un minuto y extensión a 72°C durante un minuto, al terminar los ciclos se mantuvo a 72°C por 10 minutos para una extensión final.

4.2.4.- Digestión con nucleasa de restricción

Se incubó un volumen de 5 uL del amplificado C677T del gen de la enzima MTHFR con 0.5 µL (5 U) de enzima endonucleasa de restricción HinfI a temperatura y tiempo adecuados. El reconocimiento de los alelos se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa 2.5 %.

La digestión de los amplificados por la enzima de restricción HinfI se realizó a 37°C durante toda la noche. Esta enzima reconoce el sitio de restricción creado por la transición de C a T en la posición 677, la cual genera fragmentos según la siguiente descripción: 1 fragmento de 198 pb, si el producto del amplificado no tenía un sitio de reconocimiento para la enzima HinfI que corresponde al alelo normal 677C; 2 fragmentos de 175 pb y de 23 pb si la enzima reconoce el sitio de restricción para el amplificado, el cual corresponde al alelo mutado 677T. En resumen, el alelo normal (C) no se corta (-) y el alelo con la variante polimórfica T se corta (+) en dos fragmentos de 175 pb y otro de 23 pb. El producto digerido se caracterizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5 %, y se visualizó utilizando un reactivo fluorescente Runsafe o bromuro de etidio.

Para el reconocimiento de las bandas, el genotipo homocigoto CC se identificó con la presencia de una sola banda de 198 pb, para el homocigoto TT se visualizó una banda de 175 pb (la banda de 23 pb no se observa en el gel) y para el último genotipo, el heterocigoto CT se observaron 2 bandas, una de 198 pb y la otra de 175 pb (Figura 8).

4.2.5.- Análisis estadístico

Se realizó el análisis de las frecuencias genotípicas bajo la hipótesis del equilibrio de Hardy-Weinberg y para determinar diferencias o similitudes de las frecuencias alélicas y genotípicas, se usó la prueba de X^2 de Pearson con 2 grados de libertad o prueba de Fisher con un coeficiente $p \leq 0.05$. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico SPSS 17.0.

A.- Cálculo de la frecuencia de genotipos observados:

$$\text{Frecuencia de genotipo} = \frac{\text{Número del genotipo dado}}{n}$$

n = tamaño de la muestra

Las frecuencias genotípicas esperadas fueron calculadas de la siguiente manera:

$$CC = p^2$$

$$CT = 2pq$$

$$TT = q^2$$

Siendo p y q las frecuencias de los alelos C y T respectivamente, de modo que la suma de las frecuencias de los genotipos esperados viene expresada por la siguiente ecuación:

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

B.- Cálculo de la frecuencia de alelos:

$$\text{Frecuencia del alelo C} = \frac{2(n^\circ \text{ de CC}) + (n^\circ \text{ de CT})}{2n}$$

$$\text{Frecuencia del alelo T} = \frac{2(n^\circ \text{ de TT}) + (n^\circ \text{ de CT})}{2n}$$

4.2.5.1.- Equilibrio Hardy-Weinberg:

G.H. Hardy, matemático británico, y W. Weinberg, médico alemán, se dieron cuenta que todos los posibles cruces dentro de una población podrían ser calculados, considerando las frecuencias alélicas. Para un locus con dos alelos A y B, se determina una ecuación en donde la representación de la homocigosis AA es p^2 ($p \times p$), la homocigosis del segundo alelo BB es q^2 ($q \times q$) y la heterocigosis siempre se expresa como el doble de la frecuencia del primer alelo multiplicado por el segundo alelo ($2pq$). La suma de las frecuencias de los genotipos viene a ser:

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

Esta relación se determina ecuación de Hardy-Weinberg. Esta ecuación deriva de un estricto conjunto de condiciones. Se asume que la población está en equilibrio, es decir, que no sufre ningún cambio neto en la frecuencia de sus alelos a lo largo del tiempo. Para alcanzar el equilibrio, se deben cumplir las siguientes condiciones:

1. Apareamiento al azar.
2. Una población infinitamente grande.
3. No hay mutación.
4. No hay entrada o salida de individuos.
5. No hay selección de genotipos, todos los genotipos son viables y fértiles por igual.

Realmente no hay poblaciones que cumplan estos requisitos. Sin embargo, en poblaciones suficientemente grandes se pueden aproximar a estas condiciones y la ecuación de Hardy-Weinberg se puede usar para encontrar las frecuencias de los genotipos (Klug & Cummings, 1999; 702p).

4.2.5.2.- Prueba del χ^2 (observado & esperado)

Es utilizada para evaluar si la distribución observada de unos datos se ajusta o no a las pautas previstas. Dado que es poco probable que las frecuencias genotípicas observadas en una población se ajusten exactamente como lo predice la ecuación de Hardy-Weinberg, es necesario determinar qué tanto se encuentran alejados los valores observados de los esperados y hacer una valoración de la bondad de ajuste (Stephenson, 2012; 430p). La ecuación se representa de la siguiente manera:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{observado} - \text{esperado})^2}{\text{esperado}}$$

Nº genotipos = 3

g.l.= 2

4.2.5.3.- Tamaño de la muestra:

Para la estimación del tamaño muestral de una población desconocida, debemos considerar:

- El nivel de confianza o seguridad $1-\alpha$. El nivel de confianza prefijado da lugar a un coeficiente $Z\alpha$. El nivel de confianza indica la probabilidad de que los resultados de la investigación sean ciertos; un 95,0 % de confianza es lo mismo que decir que nos podemos equivocar con una probabilidad del 5%. Para un nivel de seguridad del 95 % el $Z\alpha=1,96$.

- La precisión (d) que se desea para el estudio; es el error muestral deseado, en tanto por uno. El error muestral es la diferencia que puede haber entre el resultado que obtenemos preguntando a una muestra de la población y el que obtendríamos si preguntáramos al total de ella. Se considera un d= 10%
- p: proporción de individuos que poseen en la población la característica de estudio (alelo mutado). Este dato es generalmente desconocido y se suele suponer que p=q=0.5 que es la opción más segura. Para nuestro caso se consideró un valor de p= 34% (BenDavid, 2010).
- q: proporción de individuos que no poseen esa característica, es decir, es 1-p.
- n: tamaño muestra (Nº de individuos)

Con estas consideraciones tenemos:

Nivel de confianza: 95%

Precisión: $\pm 10\%$

Prevalencia reportada: 34%

Pérdida calculada: 10%

$Z_{\alpha^2}=1.96$

p = 34

q = 1 – p = 1-34 = 66%

d = 10

$$n = \frac{z_{\alpha}^2 \times p \times q}{d^2}$$

$$n = \frac{1.96^2 \times 0.34 \times 0.66}{0.1^2}$$

$$n = 86.206$$

V.- RESULTADOS

Se analizó muestras de sangre venosa de 92 pacientes, cuyas edades estaban entre los 18 a los 42 años, las cuales no reportaron pérdidas gestacionales recurrentes. La muestra estuvo conformada por mujeres mestizas todas gestantes, residentes en Lima-Perú, con una edad promedio de 26.6 (± 6.69) años, la edad predominante fue de 26 años.

Tabla 1: Estadísticos de la edad de 92 pacientes del Instituto Materno Perinatal San Bartolomé.

Edad Min.	18
Edad Max.	42
Media	26.59
Var	44.8
Desviación S.	6.69

5.1.- Resultados de amplificación (Figura 7)

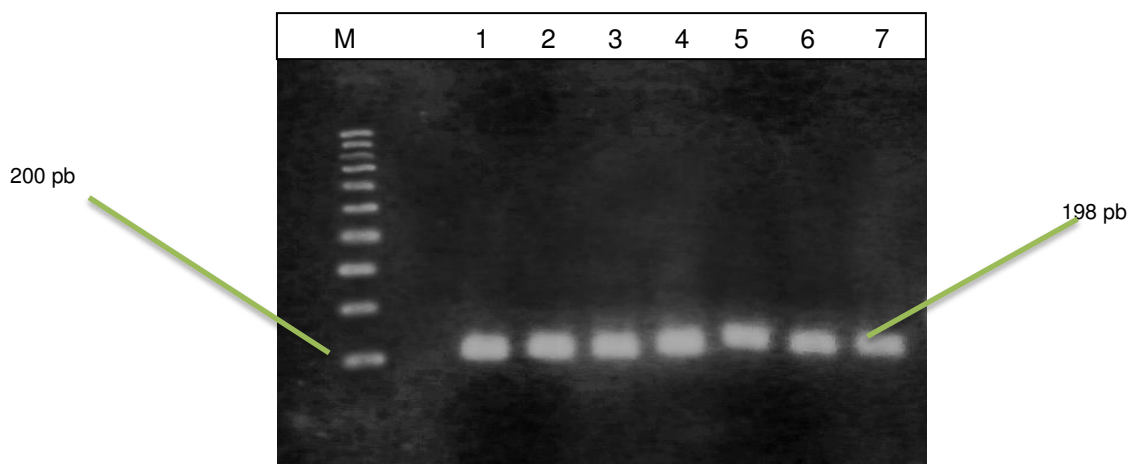


Figura 7: La amplificación del marcador utilizado para el gen *MTHFR* en gel de agarosa al 2.5% se muestra en la foto (carriles 1-7) además del marcador de tamaño molecular de 100 pb (M).

La amplificación del marcador para el gen *MTHFR* por PCR generó fragmentos de 198 pb (Figura 7) los cuales fueron visualizados en gel de agarosa al 2.5%, 1X TBE, usando tinción de bromuro de etidio y evidenciados con luz ultravioleta. Los pocillos del 1 al 7 corresponden a muestras del gen de la *MTHFR* amplificados, M es el marcador de tamaño molecular (100 bp).

5.2.- Resultados de restricción (Figura 8)

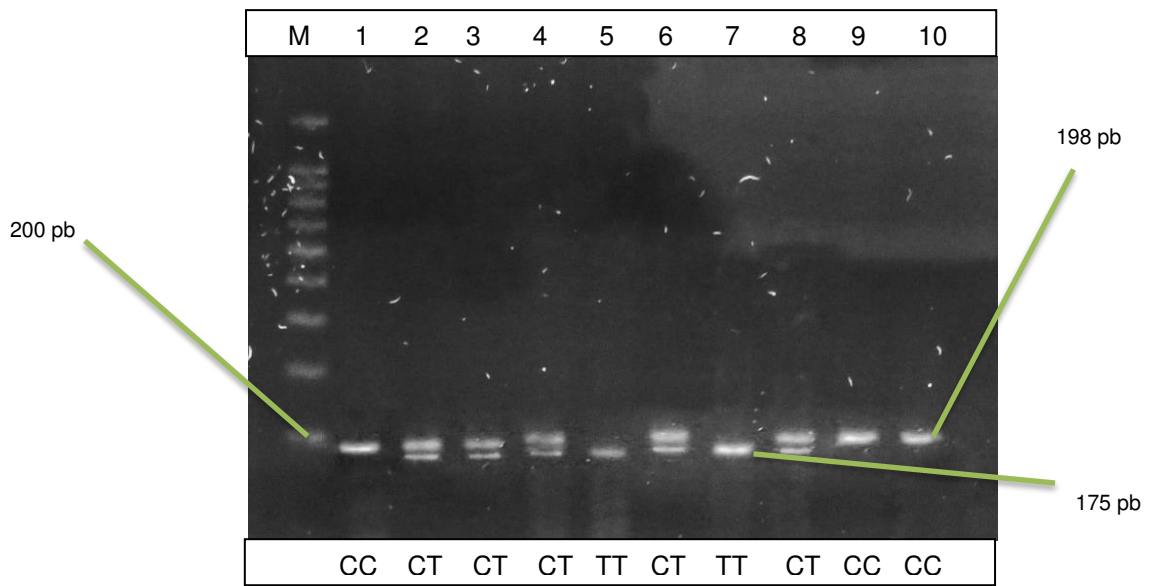


Figura 8: Producto de la digestión del amplificado para el marcador del gen *MTHFR* con la enzima *HinfI* visualizado en gel de agarosa al 2.5% mostrando el patrón de bandas para los genotipos CC, CT y TT (una banda superior de 198 pb, dos bandas de 198 y 175 pb y una única banda inferior de 175 pb, respectivamente), además del marcador de tamaño molecular de 100 pb.

Los amplificados del marcador para el gen *MTHFR* al ser digeridos con la enzima *HinfI* generaron fragmentos de acuerdo al reconocimiento de un sitio de restricción para cada alelo. Así se evidenció una banda de 198 pb que corresponde a los carriles 1, 9 y 10 (Figura 8), cuando no había sitio de reconocimiento a la enzima de restricción (CC) ; 2 bandas de 198 pb y de 175 pb, implicando un sitio de restricción en un solo alelo que ha cambiado de C a T (CT) mostrado en los carriles 2, 3, 4, 6, y 8, y una banda de 175 pb (la otra banda de 23 pb no se observa en el gel) indicando así un sitio de restricción para cada alelo (TT) en los carriles 5 y 7 (Figura 8).

5.3.- Frecuencias genotípicas y alélicas

Se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas, X^2 , de la muestra de 92 individuos (Tabla 2) y se incluyó, para la discusión, individuos de otros trabajos previamente reportados (Tabla 4).

Tabla 2: Frecuencias genotípicas y alélicas. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR en 92 pacientes del Instituto San Bartolomé (2013).

N	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas	
	(%)			(%)	
	CC (n=32)	CT (n=44)	TT(n=16)	C	T
92	34.8	47.8	17.4	58.7	41.3

. $\chi^2=0.0021$, grados de libertad=1, $p > 0.05$ ("se encuentra en equilibrio H-W")

Del total de mujeres gestantes, se encontraron 32 individuos homocigotos CC, que corresponden al 34.8%, 44 individuos heterocigotos, representado estos el mayor porcentaje hallado con un 47.8%, y por último 16 (17.4 %) individuos homocigotos TT (Figura 9).

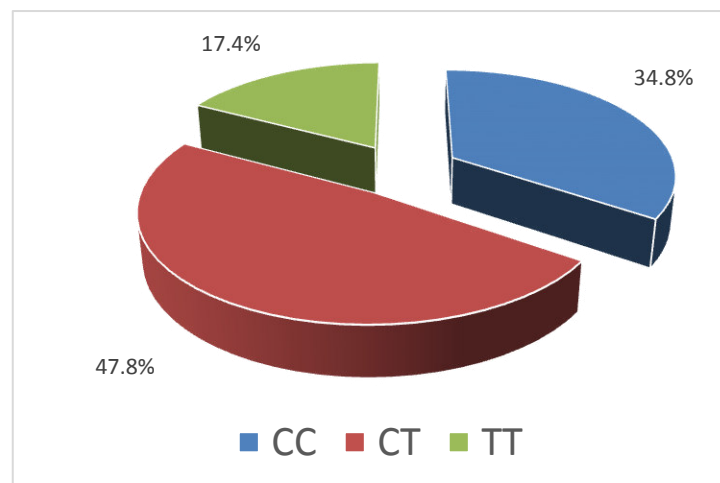


Figura 9: Distribución genotípica del polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR N=92

En la Figura 10 se muestra la frecuencia alélica de 58.7 % y de 41.3 % para el alelo C y el alelo T, respectivamente. Como se observa la mayor incidencia corresponde al alelo C.

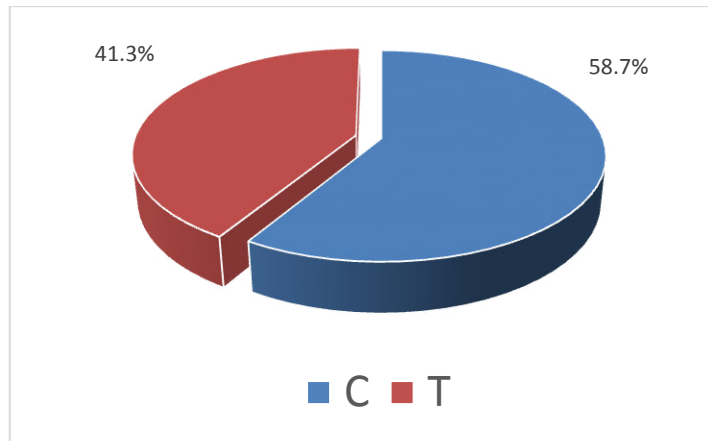


Figura 10: Distribución alélica del polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR. N= 92

5.4.- Equilibrio Hardy-Weinberg:

Tabla 3: Prueba χ^2 de Pearson (Bondad de ajuste) entre las frecuencias genotípicas observadas vs las esperadas. $\alpha = 0.05$

GENOTIPO	CASOS(N)	OBSER(%)	ESP(%)	(O-E)	(O-E) ²	(O-E) ² /E
CC	32	34.8	34.5	0.3	0.09	0.00261
CT	44	47.8	48.5	-0.7	0.49	0.01010
TT	16	17.4	17.0	0.4	0.16	0.00941
	Σ	100	100	Σ	0.74	
					χ^2	0.02212

$p = 0.95$, grados de libertad = 2

El χ^2 de bondad de ajuste indica el grado de disparidad entre dos categorías, si consideramos la categoría de genotipos observados y los genotipos esperados, se puede determinar qué tan cercanos o distantes se encuentran los valores observados de los esperados. Para una muestra de 92 mujeres evaluadas, con un $p = 0.95$, y grados de libertad (g.l.) igual a 2, encontramos un χ^2 de 0.02212.

El χ^2 teórico con un $p = 0.95$ y 2 g.l es de 5.99 (Stephenson, 2012; 432p), como el χ^2 (0.02212) de la presente tesis es muy inferior a este valor se considera que los valores

observados NO difieren a los esperados y la diferencia mínima que pueda haber entre ellos se debe solamente al azar. Por lo tanto la muestra se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 4: Comparación de las frecuencias alélicas del polimorfismo C677T en mujeres gestantes del presente estudio con otras poblaciones de la región.

ESTUDIO	PAIS/REGION	N	ALELO C	ALELO T	χ^2	p	Dif. Sig.
TESIS	Perú-Lima	92	0.587	0.413	----	-----	---
Gonzales et al 2010 (Li et al. 2005 *)	EEUU (Hispanos)	13	0.577	0.423	0.008	0.9285	NO
Ben-David. 2010	México-población judíos	184	0.739	0.261	12.910	0.0003	SI
Escudero & Ballesteros, 2003	Colombia Medellín	400	0.600	0.400	0.113	0.7366	NO
Gonzales et al. 2010	Colombia. Bogotá	206	0.580	0.420	0.019	0.8910	NO
Cardona et al., 2008	Colombia Medellín	206	0.640	0.360	0.553	0.2126	NO
Torres et al., 2006	Colombia	114	0.561	0.439	0.248	0.6184	NO
Montaño, 2009	Bolivia	128	0.620	0.380	0.529	0.4672	NO
Nitsche et al., 2003	Chile	184	0.600	0.400	0.101	0.7508	NO
Williams et al., 2004	Perú	179	0.580	0.420	0.013	0.9091	NO
Monsalve et al., 2003	Perú (Cusco)	72	0.890	0.110	36.066	0.0000	SI
Agapito INS 2003	Perú-Lima	92	0.640	0.360	1.146	0.2843	NO

Valor de significancia después de comparar las frecuencias alélicas del presente estudio, según la prueba de χ^2 (un $p < 0.001$ denota diferencias significativas). * Referencia de Li et al., 2005, mencionado en el trabajo de Gonzales et al., 2010.

En la Tabla 4 se hace una comparación de las frecuencias alélicas del *MTHFR*-C677T de los resultados obtenidos en la presente tesis y los valores hallados en otros países de América. El análisis de χ^2 o la prueba exacta de Fisher no mostró diferencias

significativas ($p > 0.001$) en la mayoría de los países salvo en una colonia judía establecida en México reportado por Ben-David, (2010) y en un estudio realizado por Molsalve et al., 2003, en 3 poblaciones cusqueñas (Huillo, Patacancha y Qqelcqa) al estudiar la asociación del polimorfismo de la *MTHFR* y la incidencia de DTNs (defectos del tubo neural) reportados en poblaciones altoandinas. Los valores más parecidos a los reportados en la presente tesis se dan en los trabajos de Williams et al., (2004) y Gonzales- Porrassa et al., (2010), ambos con $C=0.58$, $T=0.42$.

Como ya se mencionó, los valores de las frecuencias genotípicas del *MTHFR* pueden variar por diversos factores (Tabla 5), incluso en una misma población radicada en una misma localidad. Considerar los valores promedios de esas variaciones posibilitarán el conocer el rango promedio para cada población y así determinar una posible alteración en los valores del polimorfismo del *MTHFR*.

Tabla 5: Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de varias regiones del mundo.

REGION	PAÍS	N° INDIV.	FREC. GENOT.			FREC. ALEL.		Referencia
			CC	CT	TT	C	T	
Asia	India	49	0.980	0.020	0.000	0.990	0.010	Gonzales et al., 2010
Central	Irán	391	0.560	0.389	0.051	0.755	0.246	Gonzales et al., 2010
Asia	China	304	0.641	0.313	0.046	0.798	0.202	Gonzales et al., 2010
Oriente	China	398	0.163	0.525	0.312	0.426	0.574	Gonzales et al., 2010
África	Libia	589	49.23	39.73	0.110	0.691	0.309	Wassim et al., 2004
Europa	España. Valencia	716	0.320	0.520	0.160	0.580	0.420	Guillen et al., 2001
	Italia	236	0.292	0.479	0.229	0.532	0.468	Gonzales et al., 2010
	España. Cantabria	400	0.300	0.600	0.100	0.600	0.400	Escudero & Ballestos, 2003
América del norte	EEUU (Hisp.)	13	0.385	0.385	0.231	0.577	0.423	Gonzales et al., 2010
	EEUU (Afroa)	16	0.750	0.250	0.000	0.875	0.125	Gonzales et al., 2010
	EEUU (Cauc)	307	0.485	0.450	0.065	0.710	0.290	Gonzales et al., 2010
	México	631	0.337	0.419	0.244	0.547	0.453	Gonzales et al., 2010
	México, Mestizos	167	0.251	0.467	0.282	0.485	0.515	Trejo, 2009
América del sur	Brasil	111	0.369	0.478	0.153	0.608	0.392	Gonzales et al., 2010
	Colombia. Medellín	206	0.451	0.400	0.146	0.650	0.350	Cardona et al., 2008
	Colombia, Bogotá	102	0.225	0.500	0.274	0.475	0.525	García-Robles, 2011
	Colombia	126	0.270	0.620	0.110	0.580	0.420	Gonzales et al., 2010
	Bolivia	128	0.410	0.44	0.150	0.620	0.380	Montaño, 2009
	Chile	184	0.380	0.446	0.174	0.600	0.400	Nitsche et al., 2003
	Perú *	92	0.348	0.478	0.174	0.587	0.413	-----

Fuente: Modificado de González et al., 2010. * Datos referidos a la presente tesis.

VI.- DISCUSION:

Estudios, dirigidos a dilucidar una posible relación entre el polimorfismo C677T del *MTHFR* y la hipertensión arterial, que describan el comportamiento de este polimorfismo en la población peruana, son de gran importancia para las poblaciones en riesgo de enfermedades causadas por hipertensión, por ello, trabajos como el presentado en esta tesis permitirían aportar al análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas de este polimorfismo en nuestra población.

Es de gran interés el conocer la incidencia del alelo T en la población peruana, ya que en otras poblaciones se ha visto la incidencia de enfermedades asociadas al incremento de la frecuencia de este alelo, caso que no necesariamente debe darse en nuestra población, ya que el desarrollo de una enfermedad no solo tiene un soporte genético o étnico sino que es de carácter multifactorial. Determinar su incidencia en un país como el nuestro, con alto grado de mestizaje y la posible asociación del alelo T a enfermedades de hipertensión en poblaciones de mujeres gestantes peruanas, es de gran importancia en el campo de la medicina.

El valor de las frecuencias genotípicas encontradas en la presente tesis de CC = 34.8%, CT = 47.8% y TT = 17.4% del polimorfismo C677T del gen *MTHFR*, difieren a los valores encontrados en el grupo control (n = 92) por la doctora Agapito et al., (2007) (CC = 50%, CT = 27.17% y TT = 22.83%) al estudiar 3 marcadores genéticos (Protombina (Factor II) G20210A, factor V Leiden G1691A y C677T del gen *MTHFR*) asociados a trombosis en la enfermedad cerebrovascular. Considerando que la metodología usada por Agapito et al., (2007), para la determinación del polimorfismo C677T de la *MTHFR* es muy parecida a la empleada en la presente tesis y la enzima de restricción es la misma, hay que considerar algún otro factor que revela un valor de heterocigotos muy reducido presentado por Agapito et al., (2007). Otros trabajos realizados también en el Perú en los que se estudia la relación de preeclampsia e Ictus

isquémico por Williams et al., (2004) y Marca et al., (2007) respectivamente, encontraron valores muy similares a los nuestros, en los controles, que pueden ser fácilmente superponibles, (TT= 17% y CC=30%, CT = 45%, TT = 25% respectivamente), todos estos trabajos se realizaron en poblaciones residentes en Lima.

También los valores de frecuencias genotípicas hallados en la presente tesis se observa que están muy cercanos a los valores estimados en otras poblaciones del continente, por ejemplo, Torres et al., (2006) encontraron una frecuencia del genotipo TT de 19.3 % para una población de 114 individuos muestreados en Colombia. Considerando todos los genotipos (CC, CT, TT) y comparandolos con los hallados en los hispanos residentes en EEUU (CC=38.5, CT=38.5, TT= 23.1), con un X^2 Pearson (poblacional) de 0.008 y un $p=0.9285$ (Tabla 5), no se encontró diferencias significativas.

Respecto al valor para la frecuencia genotípica TT, reportado en el presente trabajo (TT = 0.172) considerada como aquellos individuos que presentan una disposición genética a un aumento de la homocisteína en sangre y su consecuente efecto en un aumento de la presión arterial y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, preeclampsia, etc, es comparable al reportado por Williams et al. (2004) (TT= 0.17). La diferencia no es estadísticamente significativa si comparamos las frecuencias alélicas de estas 2 poblaciones estudiadas ($X^2= 0.013$ con un $p = 0.9091$). Aun cuando estos valores se encuentran dentro del margen encontrado en otros países de la región (Tabla 4), la distribución geográfica juega un papel importante en la frecuencia genotípica, como sucede en los reportes de otros países de la región y en nuestra sociedad, en donde encontramos en pequeñas localidades limeñas individuos de distintas regiones de nuestro país.

Las diferencias en las frecuencias del genotipo TT afectadas por distribución geográfica, etnia y consanguineidad han sido bien reportadas. Un ejemplo de sus diferencias en localidad se observa en el norte de Italia, el 21% de la población

presenta la variante génica TT, mientras que en el sur sólo la tiene el 15%. Las diferencias de grupo étnico se reportó en una población estadounidense de piel blanca con una frecuencia de esta variante del 12 al 15%, mientras que en los americanos de origen africano sólo se encuentra en el 1,4%. En Israel, donde convive una gran variedad de grupos étnicos, se observa la variante TT en el 2% de los judíos yemenitas, el 4% de los sefarditas, el 9% de los orientales, el 16% de los norteafricanos, el 19% de los ashkenazis y en el 10% de los árabes musulmanes (Thomas & Fenech, 2008).

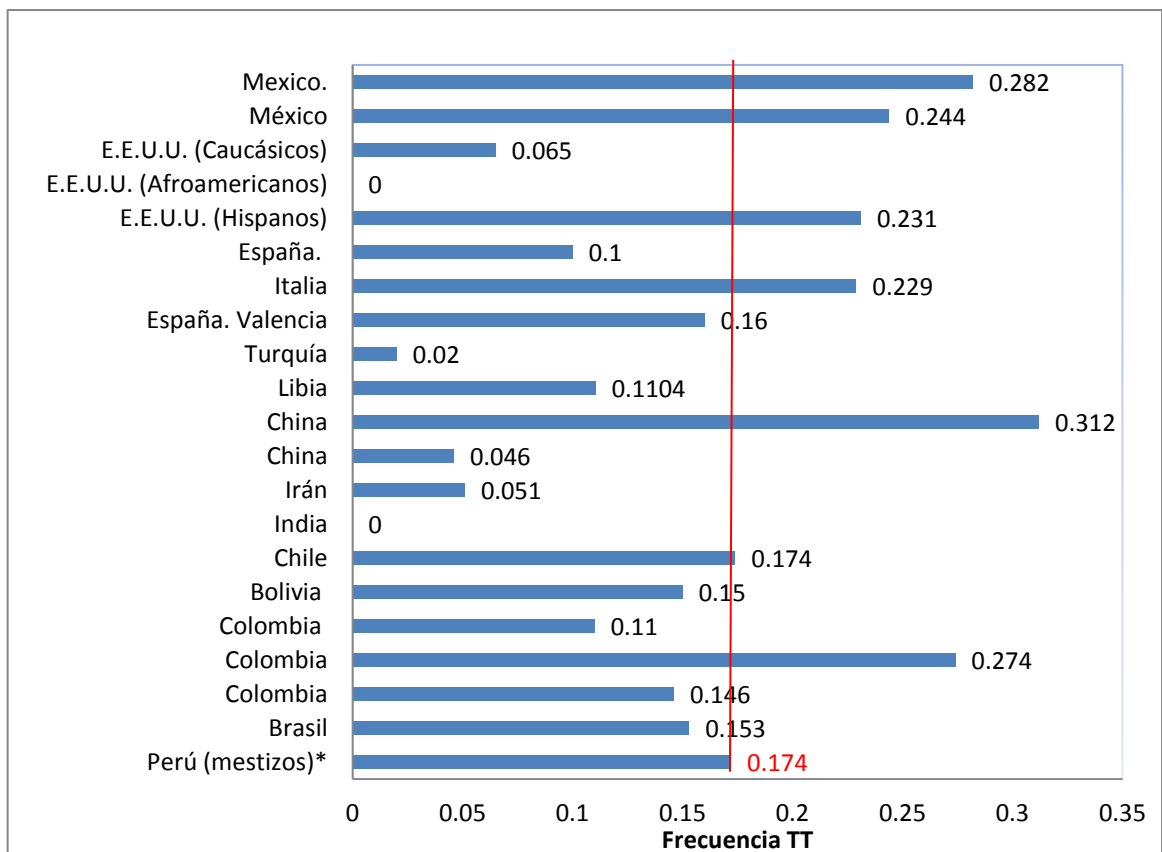


Figura 11: Comparación de frecuencia genotípica TT con otros países de la región sudamericana y el mundo. * Datos referidos a la presente tesis. Modificado de González et al., 2010.

Considerando la alta variabilidad del homocigoto mutado con respecto a la etnia y la distribución geográfica, el valor encontrado en la presente tesis de TT= 0.174 se

encuentra en un promedio para la región de Sudamérica (Figura 11), especialmente con aquellos países con los cuales compartimos un legado histórico y étnico, coincidiendo al reportado por Nitsche et al. (2003) en Chile de $TT= 0.174$, ligeramente superior al reportado por Montaña (2009) en Bolivia ($TT= 0.150$) y cercano al reportado por Guillén et al. (2001) en España (Valencia) de $TT= 0.160$. Sin embargo difieren a los valores encontrados para la población de México ($TT= 0.282$), pero sin encontrar diferencias significativas ($X^2= 4.6917$, $p= 0.0303$). Por ello falta hacer estudios que abarquen un mayor tamaño muestral y así establecer diferencias o semejanzas a nivel nacional entre Perú y los países de la región, considerando también para dicho estudio una muestra estratificada, en el cual se incluya las distintas étnias que conforman nuestra propia nación y las de otras naciones.

En cuanto al alelo T, en otras poblaciones (este de Asia, caucásicos) se ha determinado la asociación del alelo T y la hiperhomocitemia y la posterior hipertensión o hipertensión en el embarazo. Sin embargo, en los latinos no se ha demostrado tal asociación, aun cuando la frecuencia de este alelo en nuestra región está en 41.5% y es la más alta comparada con otras regiones (Indios del este, caucásicos, africanos negros) (Yang et al., 2014). Ejemplo de ello son los valores hallados por Gonzales et al. (2010) para la India y China, $T= 1$; $T= 20$ respectivamente. Los datos de frecuencias alélicas hallados en la presente tesis son muy cercanos a los encontrados a la región de América del sur (Brasil $T= 39.2$ y Colombia $T= 43.9$; Tabla 4) y los hallados por Gonzales-Galofre et al., (2010) cuando estudió a una población juvenil de 206 estudiantes pertenecientes a la Universidad del Rosario en la ciudad de Bogotá-Colombia encontrando un 58.6% para el alelo C y 41.4% para el alelo T; cuando evaluamos el Test de Chi-cuadrado ($X^2 = 0.0188$), no encontramos diferencias significativas en estas 2 poblaciones estudiadas ($p = 0.8910$). La misma conclusión se obtiene cuando comparamos nuestros valores de frecuencia alélica y las frecuencias de alelos encontrados por Torres et al. (2006) con el test de X^2 de 0.2480 ($p=0.6184$) (Tabla 4). Al parecer, a pesar de su efecto deletéreo, puede ser que exista una fuerza

de selección que esté favoreciendo la alta frecuencia de los heterocigotos (CT= 48.3), aunque no es contundente, por ello es preciso realizar más estudios con poblaciones más numerosas.

Utilizando el índice de X^2 o la prueba exacta de Fisher, no se encontró diferencias significativas cuando se evalúa las frecuencias alélicas de otros países y se compara con nuestros resultados, demostrando que nuestros valores están de acorde con los reportados para la región (Tabla 4). La frecuencia del alelo T = 0.413, hallado en este estudio se encuentra dentro del promedio de la región, considerando que el alelo T es considerado de riesgo para diversas enfermedades (Frost et al., 1995), no se encuentran bases que indiquen que haya algún factor que este favoreciendo su expresión. Solo en 2 casos se encontraron diferencias significativas, el trabajo de Ben-David (2010) con un $X^2 = 12.910$, $p= 0.0003$, en el cual se estudió una colonia judía de 184 personas de entre 16-80 años, pertenecientes a dos grupos separados: askenazi y sefaradí, con un alto índice de endogamia y con una distribución alélica C= 0.739, T= 0.261. El otro caso en donde se encontró una diferencia significativa ($X^2 = 36.066$, $p= 0.000$), fue reportado por Monsalve et al. (2003) al trabajar con 3 poblaciones cusqueñas: Huilloc, Patacancha y Qqelcqanca, (entre 2600-4200 msnm) con una frecuencia alélica de C= 0.890, T= 0.110; todas estas poblaciones muestreadas reportaron un TT= 0, y de las frecuencias genotípicas de los heterocigotos, los Qqelcqanca (4200 msnm) tienen la menor frecuencia (CT= 0.05) y una frecuencia del genotipo CC, para las 3 poblaciones, que va de 0.66 - 0.95, reportado por el autor, y que no establece una clara explicación más que darle la razón a la dieta o la endogamia.

Considerando la incidencia del polimorfismo C677T de la MTHFR en nuestra población y sabiendo su posible relación con alteraciones como defectos congénitos, cardiovasculares, hipertensión e hipertensión en la gestación y sus consecuencias médicas. Es necesario, seguir aportando para determinar la incidencia de los

genotipos y sobre todo del genotipo TT y del alelo mutado T, los cuales han sido directamente relacionados con una deficiencia enzimática de la MTHFR en el ciclo de los folatos e hiperhomocisteinemia con efecto en enfermedades cardiovasculares, hipertensión, especialmente en la hipertensión gestacional o preeclampsia, la cual puede traer un riesgo genético de hipertensión en las gestantes peruanas en el desarrollo del embarazo o al momento del parto.

VII.- CONCLUSIONES:

- Se determinó una frecuencia genotípica de CC= 34.8%; CT= 47.8% y TT=17.4%, estableciéndose que estos genotipos no difieren de los reportados por otros países.

- Se evidenció que los heterocigotos presentan una mayor incidencia en la muestra estudiada (CT= 47.8%).

- Se encontró una frecuencia para el alelo T de 41.3%.

- Se estableció que la prevalencia del polimorfismo C677T para la enzima MTHFR en las gestantes muestreadas, se encuentra dentro de los valores hallados por otros autores en el Perú, no encontrándose un incremento significativo del alelo mutado (T).

VIII.- RECOMENDACION:

En otros países, llevando estudios de casos-controles, se ha encontrado una asociación significativa entre la incidencia del alelo T y el desarrollo de un cuadro de hipertensión, preeclampsia, pero en nuestro país, aun no se ha determinado una relación significativa. Estudios del tipo caso-control, con mayores tamaños muestrales, nos permitirán seguir monitoreando la incidencia del alelo mutado T y su comportamiento en nuestra población y así abrir camino para el estudio de esta posible asociación (incidencia del alelo T e hipertensión) hallada en otras regiones del mundo.

IX.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ ABRATTE CM, Wang W, Li R, Moriarty DJ, Caudill MA. Folate intake and the MTHFR C677T genotype influence choline status in Young Mexican American Women. *J Nutr. Biochem.* 2008, 19(3): 158-65.
- ❖ AGAPITO P. Doris, Arce C. Ana, Anicama H. Angel, Huertas T. Eric, Aguilar O. José Luis. Detección de anticuerpos antifosfolípidos y tres marcadores genéticos asociados a trombosis en la enfermedad cerebrovascular. *I.N.S. SERIE INFORMES TÉCNICOS N°71*. [en línea]. 2007. [Acceso: 25-06-2014]. Disponible en: http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/cindoc/INFORMES_TECNICOS/71.pdf
- ❖ BAGLEY PJ, Selhub JA. Common Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene is Associated with an Accumulation of Formylated Tetrahydrofolates in Red Blood Cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998, 95: 13217-20.
- ❖ BENDAVID Tebul Dvora. “La prevalencia del polimorfismo C677T del gen de la Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en la población Judía residente en el D.F. y Estado de México”. Asesor: Ricardo García Cavazos. Tesis Maestría. INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA. México. 2010.
- ❖ BOCCIA S, Gianfagna F, Persiani R, La Greca A, Arzani D, Rausei S, D’ugo D, Magistrelli P, Villari P, van Duijn CM, Ricciardi G. Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Polymorphisms and Susceptibility to Gastric Adenocarcinoma in an Italian Population. *Biomarkers.* 2007, 12: 635-44.
- ❖ BOCCIA S, Hung R, Ricciardi G, Gianfagna F, Ebert MPA, Fang J, Gao C, Götze T, Graziano F, LacasañaNavarro M, Lin D, López-Carrillo L, Qiao Y, Shen H, Stolzenberg-Solomon R, Takezaki T, Weng Y, Zhang F. F, van Duijn CM, Boffetta P, Taioli E. Meta- and Pooled Analyses of the

- Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Polymorphisms and Gastric Cancer Risk: A Huge Review. *Am J Epidemiol.* 2008, 167: 505-16.
- ❖ BORTOLOTTO LA, Safar ME, Billaud E, Lacroix C, Asmar R, London GM, Blacher J. Plasma Homocysteine, Aortic Stiffness, and Renal Function in Hypertensive Patients. *Hypertension.* 1997, 34: 837-42.
 - ❖ BRATTSTROM L, Wilcken DE, Ohrvik J, et al. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation.* 1998, 98: 2520-26.
 - ❖ BRIONES Vega CG, García Cavazos R, Briones Garduño J.C. Homocisteína y mutación C677T y A1298C del gen de la 5- Metilentetradehidrofolato reductasa en embarazadas con preeclampsia-eclampsia. *Revista de la Asociación Mexicana de Medicina Crítica y terapia intensiva.* 2007, 21(4): 179-84.
 - ❖ CARDONA H., Cardona-Maya W., Gómez G. J., Castañeda S., Gómez J. M., Bedoya G., Álvarez L., Torres J. D., Tobón L. I. y Cadavid A. Relación entre los polimorfismos de la metilen-tetrahidrofolato-reductasa y los niveles de homocisteína en mujeres con pérdida gestacional recurrente: perspectiva desde la nutrigenética. *Nutr. Hosp.* 2008, 23(3): 277-82.
 - ❖ CHANARIN I, Rothman D, Ward A, Perry J. Folate status and requirements in pregnancy. *Br. Med. J.* 1968(2): 390-94.
 - ❖ CONDADO Arenas, Bernardo. Interrelación entre vitamina b12 y ácido fólico. *Avances.* 2009, 25(8): 10-15.
 - ❖ CZEIZEL AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N. Engl. J. Med.* 1992, 327: 1832-35.
 - ❖ CZEIZEL AE, Puho E. Maternal use of nutritional supplements during the first month of pregnancy and decreased risk of Down's syndrome: case-control study. *Nutrition.* 2005, 21(6): 698-704.

- ❖ DE LUIS D.A., Fernández N. y Aller R. Homocisteína, Metabolismo y determinantes higienicodietéticos. *Endocrinol Nutr.* 2004, 51(8): 458-63
- ❖ DELGADO-ENCISO Iván. Mutación 677T del gen MTHFR en adenomas y cáncer colorrectal en una muestra de la población del noreste de México. *Rev Gastroenterol Mex.* 2001, 66(1): 32-37.
- ❖ DEVLIN, Thomas M. *Bioquímica con aplicaciones clínicas*. 4ta edición española. Barcelona. España. Editorial REVERTE, S.A., 2004. 1219pp. ISBN. 84-291-7208-4.
- ❖ DIERKES J, Jeckel A, Ambrosch A, Westphal S, Luley C, Boeing H. Factors Explaining the Difference of Total Homocysteine between Men and Women in the European Investigation into Cancer and Nutrition Potsdam Study. *Metabolism.* 2001, 50: 640-45.
- ❖ DOS SANTOS Kenia G, Mehl Letícia E, Moritz Neto A, De Moura J.J, Soares Melo S, Eger Mangrich I, Camati Persuhn D. Relation between polymorphism C677T of the methylenetetrahydrofolate reductase and atherosclerosis. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 2010, 44(1): 5-14.
- ❖ DUTHIE SJ. Folic Acid Deficiency and Cancer: Mechanisms of DNA Instability. *British Medical Bulletin.* 1999, 55: 578-92.
- ❖ ESCUDERO MT., Ballesteros G., León J. Polimorfismo C677T del gen de la metilenotetrahidrofolato reductasa en mujeres gestantes. *Prog. Obstet. Ginecol.* 2003, 46(6): 234-44.
- ❖ ETIENNE MC., Formento JL, Laurent-Puig P, Formento P, Cheradame S, Fischel JL and Milano G. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: relationships with 5-fluorouracil sensitivity. *British Journal of Cancer.* 2004, 90: 526-34.
- ❖ FINKELSTEIN JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur. J. Pediatr.* 1998,157(2): 40-44.

- ❖ FORRELLAT Barrios M, Gautier du Defaix Gómez H. Papel del ácido fólico en la etiología de las anemias megaloblásticas. *Rev Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* 1997,13(2): 77-89.
- ❖ FROSST P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.* 1995,10: 111-13.
- ❖ GARCÍA Cavazos RJ, Morán Barroso VF, Sánchez Urbina R, Galaviz Hernández C, Sierra Ramírez A. Trascendencia de los factores ambientales y genéticos en cardiopatías congénitas: el caso de la enzima MTHFR. *Perinatol. Reprod. Hum.* 2006, 20: 39-47.
- ❖ GARCÍA Pinilla, José Manuel. “Hiperhomocisteinemia, polimorfismos genéticos y síndrome coronario agudo”. Tesis Doctoral. Departamento de Medicina Universidad de Málaga. MÁLAGA-ESPAÑA. 2005 Disponible en: <http://www.biblioteca.uma.es/bbl/doc/tesisuma/16791162.pdf> fecha 25/06/14
- ❖ GARCÍA-Robles R, Ayala-Ramírez P. A, Villegas V, Salazar M, Bernal J, Nuñez F, Cicedo V, Pachón S, Ramirez S, Bermudez M. Estudio del polimorfismo MTHFR C677T en recién nacidos con cardiopatías congénitas aisladas, en una población colombiana. *Univ. Méd. Bogotá*, 2011; 52(3): 269-77.
- ❖ GONZÁLEZ Galofre Z, Villegas V, Martínez-Agüero M. Determinación del polimorfismo C677T de metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en una población piloto de estudiantes de la Universidad del Rosario. Colombia. *Rev. Cienc. Salud.* 2010, 8(1): 7-21.
- ❖ GONZALES Martin-Moro, Pérez B., Santiuste Puente C., Desviat LR., Ugarte M., Pérez ML., Pardo Vigo A., Maties Prats M. Estudio el polimorfismo C677T del gen de MTHFR y las concentraciones plasmáticas de homocisteína. *Química Clínica.* 2005; 24(1): 41-45.

- ❖ GONZÁLEZ Porrasa JR, Pérez López E, I. Alberca y FS. Lozano. Influencia de la mutación C677T del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa en la enfermedad tromboembólica venosa. *Angiología*. 2010, 62(6): 225-31.
- ❖ GOTZE T, Röcken C, Röhl FW, Wex T, Hoffmann J, Westphal S, Malfertheiner P, Ebert MP, Dierkes J. Gene Polymorphisms of Folate Metabolizing Enzymes and the Risk of Gastric Cancer. *Cancer Lett*. 2007, 251: 228-36.
- ❖ GOYETTE P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat. Genet*. 1994, 7: 195-200.
- ❖ GOYETTE P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm. Genome*. 1998, 9: 652-56.
- ❖ GRAZIANO F, Kawakami K, Ruzzo A, Watanabe G, Santini D, Pizzagalli F, Bissoni R, Mari D, Floriani I, Catalano V, Silva R, Tonini G, Torri V, Giustini L, Magnani M. Methylenetetrahydrofolate Reductase 677 C/T Gene Polymorphism, Gastric Cancer Susceptibility and Genomic DNA Hypomethylation in an At-Risk Italian Population. *Int. J. Cancer*. 2006, 118: 628-32.
- ❖ GUENTHER BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML. The structure and properties of metilenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat. Struct. Biol*. 1999, 6: 359-65.
- ❖ GUILLEN M, Corella D, Portoles O, Gonzalez J I, Mulet F, Saiz C. Prevalence of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C > T mutation in the Mediterranean Spanish population. Association with cardiovascular risk factors. *European Journal of Epidemiology*. 2001, 17, 3: 255-61.
- ❖ HIDER SL, Bruce IN, Thomson W. The pharmacogenetics of methotrexate. *Rheumatology*. 2006, 46: 1520-24.

- ❖ HOBBS CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, Pogribna M, Rozen R, James SJ. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 2000, 67(3) 623-30.
- ❖ HOMBERGER A, Linnebank M, Winter C, Willenbring H, Marquardt T, Harms E et al. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur. J. Hum. Genet.* 2000, 8: 725-29.
- ❖ HUH HJ, Chi HS, Shim EH, Jang S, Park CJ. Gene-Nutrition Interactions in Coronary Artery Disease: Correlation between the MTHFR C677T Polymorphism and Folate and Homocysteine Status in a Korean Population. *Thromb. Res.* 2006, 117: 501-06.
- ❖ ILHAN N, Kucuksu M, Kaman D, Ilhan N, Ozbay Y. The 677 C/T MTHFR Polymorphism is Associated with Essential Hypertension, Coronary Artery Disease, and Higher Homocysteine Levels. *Arch. Med. Res.* 2008, 39: 125-30.
- ❖ JAMES SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, Yi P, Tafoya DL, Swenson DH, Wilson VL et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999, 70, 4: 495-501.
- ❖ KIM YJ, Williamson RA, Chen K, et al. Lipoprotein lipase gene mutations and the genetic susceptibility of preeclampsia. *Hypertension.* 2001, 38: 992-96.
- ❖ KIRKE PN, Daly LE, Elwood JH. A Randomised trial of low dose folic acid to prevent neural tube defects. *Arch. Dis. Child.* 1992, 67: 1442-46.
- ❖ KLERK M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG. MTHFR 677CT Polymorphism and Risk of Coronary Heart Disease a Meta-Analysis. *JAMA.* 2002, 288: 2023-31.

- ❖ KLUG Williams S., Cummings Michael R. *Conceptos de la Genética*. 5ta edición. Editorial Prentice Hall Iberia. Madrid, 1999. 814pp. ISBN: 84-8322-042-3.
- ❖ KLUIJTMANS LA, Kastelein JJ, Lindemans J, *et al.* Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation*. 1997, 96: 2573-77.
- ❖ KRUMDIECK CL. Folic acid: Present knowledge in nutrition. The Nutrition Foundation Inc. 1976, 4: 175-90.
- ❖ LAIVUORI H. Genetic aspects of preeclampsia. *Front Biosci*. 2007, 12: 2372-82.
- ❖ LANGSENLEHNER T, Renner W, Yazdani-Biuki B, Langsenlehner U. Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Breast Cancer Risk: A Nested-Case–Control Study and a Pooled Meta-Analysis. *Breast Cancer Res. Treat.* 2007, 107: 459-60.
- ❖ LARSSON SC, Giovannucci E, Wolk A. Folate Intake, MTHFR Polymorphisms, and Risk of Esophageal, Gastric, and Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *Gastroenterology*. 2006, 131: 1271-83.
- ❖ LAURENCE KM, James N, Miller MH, Tennant GB, Campbell H. Double-blind randomized controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural tube defects. *Br. Med. J. (Clin Res Ed)*. 1981, 282: 1509-11.
- ❖ LEVY D, Ehret GB, Rice K, Verwoert GC, Launer LJ, *et al.* Genome wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat. Genet.* 2009, 41: 677–87.
- ❖ LORENZO D. Botto, Quanhe Yang. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene Variants and congenital Anomalies. *Am. J. Epidemiol.* 2000,151: 862-77.

- ❖ MARCA V, Ortega O, Quispe Y, Mazzetti P, Huerta D, Noli Li, Acosta O. Frecuencia del polimorfismo c677t del gen de la metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en pacientes con ictus isquémico. *An. Fac. Med.* 2007, 68(1): 49.
- ❖ MAREK H Dominiczak, John W Baynes. *Micronutrientes vitaminas y minerales.* Bioquímica Medica, segunda edición. Madrid: Elsevier España, S.A., 2007, 703pp. ISBN: 978-848-1748-66-6.
- ❖ MARES García AS, Saavedra Alanís VM. Polimorfismos genéticos en pacientes heterocigotos con defecto de tubo neural. [Acceso: 08-11-2013]. Disponible en: <http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2009/11VCRC_46/17_Mares_Garcia.pdf>.
- ❖ MARINHO C, Alho I, Guerra A, Rego C, Areias J, Bicho M. The Metylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variant (C677T) as a susceptibility gene for Tetralogy of Fallot. *Rev. Rept. Cardiol.* 2009, 28(7) 809-12.
- ❖ MARTINEZ Frias ML. The biochemical structure and function of methylenetetrahydrofolate reductase provide the rationale to interpret the epidemiological results on the risk for infants with Down syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.* 2008, 146A(11): 1477-82.
- ❖ MATTHEWS RG, Sheppard C, Goulding C. Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase: biochemistry and molecular biology. *Eur. J. Pediatr.* 1998, 157(2): 54–59.
- ❖ Medical Research Council Vitamin Study Research. Prevention of Neural Tube Defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet.* [en línea]. 1991, 338: 131-7. [Acceso:15-11-2014]. Disponible en: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014067369190133A>>.
- ❖ MONTAÑO Arrieta, Rafael Eduardo. “Análisis genético molecular de los polimorfismos C677T y A1298C del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa, como factor de riesgo para el desarrollo de desnutrición crónica en niños

menores de 3 años del municipio de Lurabay”. Asesor: Aguilar Mercado, Ximena. Tesis maestría. Universidad Mayor de San Andrés. Instituto de Genética. Bolivia. 2009.

- ❖ MONSALVE MV, Salzano FM, Rupert JL., Hutz MH, Hill K, Hurtado AM, Hochachka PW, Devine DV. Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Allele Frequencies in Amerindians. *Annals of Human Genetics*. 2003, 67: 367–71.
- ❖ NELEN WL, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Thomas CM, Eskes TK. Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. *Obstet. Gynecol*. 2000, 95: 519-24.
- ❖ NITSCHKE F, Alliende A, Santos JL, Pérez F, Santa María L, Hertrampf E, Cortés F. Frecuencia del polimorfismo C677T de la 5, 10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en mujeres chilenas madres de afectados con espina bífida y en controles Normales. *Rev. Méd. Chile*. 2003, 131: 1399-1404.
- ❖ NYGÅRD O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, Ueland M, Kvåle G. Total Plasma Homocysteine and Cardiovascular Risk Profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA*. 1995, 274:1526-33.
- ❖ PADMANABHAN S, Newton-Cheh C, Dominiczak AF. Genetic basis of blood pressure and hypertension. *Trends Genet*. 2012, 28: 397–408.
- ❖ PEJCHAL R, Campbell E, Guenther BD, Lennon BW, Matthews RG, Ludwig ML. Structural perturbations in the Ala>Val polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase: how binding of folates may protect against inactivation. *Biochemistry*. 2006, 45: 4808-18.
- ❖ PITA Rodríguez G. Ácido fólico y vitamina B12 en la nutrición humana. *Revista cubana Alimentación Nutrición*. 1998; 12(2): 107-19.
- ❖ RUSSO GT, Friso S, Jacques PF, Rogers G, Cucinotta D, Wilson PWF, Ordovas JM, Rosenberg IH, Selhub J. Age and Gender Affect the Relation between Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Genotype and Fasting

- Plasma Homocysteine Concentrations in the Framingham Offspring Study Cohort. *J. Nutr.* 2003, 133: 3416-21.
- ❖ SEMENZA JC, Delfino RJ, Ziogas A, Anton-Culver H. Breast Cancer Risk and Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism. *Breast Cancer Res Treat* 2003, 77: 217-23.
 - ❖ SHEU WH, Lee WJ, Chen YT. Plasma Homocysteine Concentrations and Insulin Sensitivity in Hypertensive Subjects. *Am. J. Hypertens.* 2000, 13: 14-20.
 - ❖ STEPHENSON Frank H., Ph. D. *Cálculo en Biología molecular y biotecnología*. Jorge Lloberas Cavero y Annabel Valledor Fernández. 2da Edición. Barcelona España.A. Parras S.A. 2012. 472p. ISBN: 978-84-8086-909-6.
 - ❖ STRYER Lubert, Berg Jeremy M., Tymoczko John L., *Bioquímica*. 7a edición. Barcelona, España. Editorial Reverte S.A. 2013. 1200pp. ISBN: 978-84-291-7602-5.
 - ❖ SUN L, Sun Y, Bo W, Cao H, Chen Y. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Susceptibility to Gastric Cancer in Chinese Populations: a Meta-Analysis. *Eur. J. Cancer. Prev.* 2008, 17: 446-52.
 - ❖ THOMAS P, Fenech M Adelaide. Methylenetetrahydrofolate reductase, common polymorphisms, and relation to disease. South Australia S.N. *Vitam Horm.* 2008, 79: 375-92.
 - ❖ TORRES JD, Cardona H, Alvarez L, Cardona-Maya W, Castañeda S. A, Quintero-Rivera F, Cadavid A, Bedoya G, Tobón L. Inherited Thrombophilia is Associated with Deep Vein Thrombosis in a Colombian Population. *Am. J. Epidemiol.* 2006, 81: 933-37.
 - ❖ TREJO Aguilar Adriana. "Frecuencia del polimorfismo C677T en el gen de la enzima 5,10 metilenotetrahidrofolato reductase en pacientes de 45 años o menos con infarto miocárdico con elevación del segmento ST". Asesor: Reyes Maldonado Elba. Tesis para obtener el grado en maestría. Instituto Politécnico Nacional. México D.F. 2009.

- ❖ UELAND PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci.* 2001, 22, 4:195-201.
- ❖ URLICH CM, Yutaka Y, Rainer S, Schubert M, Wagner JL, Bigler J, Kiley SA, Keener CL, Li S, Hao Liu, Farin F, Potter JD. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood.* 2001, 98(1): 231-34.
- ❖ VOET Donald, Voet Judith G.. *Bioquímica.* 3ra edición. Buenos Aires. Argentina. Edit Medica Panamerica. 2006. 1776pp. ISBN: 950-06-2301-3.
- ❖ WASSIM Y. Almawi, Ramzi R. Finan, Hala Tamim, Jocelyn L. Daccache, Noha Irani-Hakime. Differences in the Frequency of the C677T Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene Among the Lebanese Population. *American Journal of Hematology.* 2004, 76: 85–87.
- ❖ WILLIAMS MA , Sanchez SE, Zhang C and Bazul V. Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C→T polymorphism and plasma folate in relation to pre-eclampsia risk among Peruvian women. *Journal of Maternal-Fetal y Medicina Neonatal.* [en línea] 2004, 15, 5, 337-344. [Acceso: 27-05-2014]. <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/14767050410001680037>>.
- ❖ XI-MEI Wang, Hai-yan Wu, and Xu-jun Qiu. Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene C677T Polymorphism and Risk of Preeclampsia: An Updated Meta-analysis Based on 51 Studies. *Elseiver.* [En línea] 2013, 44, 159-168. [Acceso: 12-02-2014]. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.01.011>>.
- ❖ YAMADA K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci.* 2001, 98: 14853-58.
- ❖ YANG B, Fan S, Zhi X, Li Y, Liu Y, *et. al.* Associations of *MTHFR* Gene Polymorphisms with Hypertension and Hypertension in Pregnancy: A

MetaAnalysis from 114 Studies with 15411 Cases and 21970 Controls. *PLoS ONE*. 2014, 9(2): e87497.

- ❖ ZETTERNBERG H, Regland B, Palmer M, Ricksten A, palmqvist L, Rymo L, Arvanitis DA. Increased frequency of combine methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. *Eur. J. Hum. Genet.* 2002, 10: 113-18.
- ❖ ZHANG J, Zeisler J, Hatch MC, et al. Epidemiology of pregnancy induced hypertension. *Epidemiol. Rev.* 1997, 19: 218-32.
- ❖ ZHANG FF, Terry MB, Hou L, Chen J, Lissowska J, Yeager M, Zatonski W, Chanock S, Morabia A, Chow W. H. Genetic Polymorphisms in Folate Metabolism and the Risk of Stomach Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2007, 16:115-21.

X.- ANEXOS

10.1.- Genotipaje de pacientes:

TABLA 6: GENOTIPOS CC DE UN TOTAL DE 92 PACIENTES DEL INSTITUTO MATERNO PERINATAL SAN BARTOLOME HERRERA. Junio 2012 - octubre del 2013

GENOTIPO CC			
C6-12	CC	C11-13	CC
C12-12	CC	C12-13	CC
C19-12	CC	C16-13	CC
C26-12	CC	C25-13	CC
C34-12	CC	C36-13	CC
C29-12	CC	C39-13	CC
C31-12	CC	C42-13	CC
C47-12	CC	C43-13	CC
C50-12	CC	C46-13	CC
C55-12	CC	C55-13	CC
C63-12	CC	C57-13	CC
C66-12	CC	C70-13	CC
C72-12	CC	C79-13	CC
C76-12	CC	C81-13	CC
C99-12	CC	C84-13	CC
C10-13	CC	C85-13	CC

N= 32

TABLA 7: GENOTIPOS CT DE UN TOTAL DE 92 PACIENTES DEL INSTITUTO MATERNO PERINATAL SAN BARTOLOME HERRERA. Junio 2012 - octubre del 2013

GENOTIPO CT					
C20-12	CT	C56-12	CT	C52-13	CT
C22-12	CT	C58-12	CT	C53-13	CT
C23-12	CT	C60-12	CT	C58-13	CT
C27-12	CT	C62-12	CT	C59-13	CT
C28-12	CT	C65-12	CT	C65-13	CT
C33-12	CT	C67-12	CT	C66-13	CT
C30-12	CT	C68-12	CT	C75-13	CT
C38-12	CT	C69-12	CT	C76-13	CT
C39-12	CT	C92-12	CT	C77-13	CT
C40-12	CT	C13-13	CT	C78-13	CT
C42-12	CT	C24-13	CT	C82-13	CT
C45-12	CT	C27-13	CT	C83-13	CT
C46-12	CT	C28-13	CT		
C48-12	CT	C29-13	CT		
C52-12	CT	C48-13	CT		
C54-12	CT	C51-13	CT		

N= 44

TABLA 8: GENOTIPOS TT DE UN TOTAL DE 92 PACIENTES DEL INSTITUTO MATERNO PERINATAL SAN BARTOLOME HERRERA. Junio 2012 - octubre del 2013

GENOTIPO TT	
C13-12	TT
C17-12	TT
C21-12	TT
C32-12	TT
C44-12	TT
C57-12	TT
C61-12	TT
C90-12	TT
C4-13	TT
C35-13	TT
C37-13	TT
C38-13	TT
C41-13	TT
C49-13	TT
C50-13	TT
C67-13	TT

N= 16

10.2.- Consentimiento informado.-

Polimorfismo genético en la preeclampsia

Los investigadores Dr. José Pacheco Romero, Mg. Doris Huerta Canales, Dr. Santiago Cabrera, Biol. Oscar Acosta C. y Marlene Vargas Chávez tienen el agrado de presentarse y comunicar a Ud. la realización de una investigación importante para las gestantes peruanas, cual es la aparición de la presión arterial alta y pérdida de proteínas en orina durante el embarazo (denominado preeclampsia) y su posible relación con la variación de un gen materno, para lo cual estamos realizando una investigación en pequeñas muestras de sangre de 100 madres.

Para este estudio solicitamos a Ud. Su consentimiento para la obtención de datos médicos suyos y de su familia y la toma de una muestra de 300 microlitros de sangre (3 mililitros cúbicos = 3mm³= 3mL), en la cual se hará el estudio de esta variante genética y su presencia en la preeclampsia.

Tenemos la convicción que los resultados nos podrán orientar mejor en determinar cuáles gestantes tienen la predisposición a la preeclampsia y tomar las medidas de prevención necesarias.

De ahí la importancia de que nos dé su consentimiento voluntario para la toma de muestra de sangre, la cual no debe de acarrearle complicación alguna, salvo la molestia de un pequeño pinchazo y seguir las recomendaciones que le proporcionemos durante la toma de la muestra de sangre. Usted tiene todo el derecho de negarse a participar en el estudio o solicitar que retiremos sus resultados de la investigación.

Una vez completada nuestra investigación, usted tendrá el derecho de recibir información sobre nuestros resultados, en la dirección, teléfonos y contactos que figuran al final del presente Consentimiento Informado. Además, estaremos difundiendo los hallazgos en revistas biomédicas de importancia científica.

Es nuestro deseo que Ud. Quede satisfecha con la información recibida y las respuestas a cualquier duda que Ud. Considere se le haga la aclaración necesaria.

Conforme en dar mi autorización para la toma de muestra de sangre, firmo el presente Consentimiento Informado.

Lima, de del 2012

Nombre de la madre

Firma

Investigadores (Facultad de Medicina San Fernando, Av Grau s/n, Lima, Perú):

Dr. José Pacheco Romero	6197000	An 4672	999 481 979
Mg. Doris Huerta Canales	6197000	An. 4632	996 723 906
Dr. Santiago Cabrera Ramos	201 0400		999 709 110
Lic. Marlene VARGAS Chavez	619 7000	A, 4632	988 201 893

Código

Fecha:.....

DATOS MATERNOS

Datos	Apellidos y Nombres	Lugar de Nacimiento		
		Distrito	Provincia	Departamento
Participante				

Datos familia	Apellidos y Nombres	Lugar de nacimiento		
		Distrito	Provincia	Departamento
Padre				
Abuelo P.				
Abuela P.				
Madre				
Abuelo M.				
Abuela M.				

Ancestro autoreportado: Amerindio (Nativo) Asiático Africano Europeo Otros:.....

Edad (años):	
Edad (rango de años):	<15-19..... 20-24..... 25-29..... 30-34..... 3 5-39..... >40.....
Estado civil:	Casada..... Soltera..... Unión estable (conviviente)..... Separada.....
Lugar de residencia: Urbana (nombre):	Rural (nombre):
Talla (cm):	Talla (rango cm): <150..... 150-160..... >160.....
Peso (Kg):	Antes del embarazo: Al momento del parto:
Ingreso familiar mensual (soles):	<500..... 500-999..... 1000-1999..... >20000

Antecedentes personales patológicos:			
Hipertensión.....	Preeclampsia, eclampsia previa.....	Diabetes mellitus.....	Neuropatía.....
Cardiopatía.....	Síndrome metabólico.....	Otros (mencione).....	
Antecedentes familiares:			
Hipertensión.....	Preeclampsia, eclampsia previa.....	Diabetes mellitus.....	Neuropatía.....
Cardiopatía.....	Síndrome metabólico.....	Otros (mencione).....	
Número de gestaciones:	1..... 2-3..... 4-5..... >5.....		
Número de abortos:		Número de partos pretérmino:	
Numero de recién nacidos con peso bajo:			
Control prenatal:	0..... 1-3..... 4-6..... >6.....		
Presión diastólica:	<90..... 90-110..... >110.....		
Hemoglobina (g/mL):	<10..... 10 a 12..... > 12.....		
Tipo termino embarazo:	Parto eutocico..... Fórceps..... Vacuum..... Cesárea.....		
Edad de gestación al termino del embarazo (en semanas cumplidas):			
<25.....	26-28.....	30-32.....	33-35..... 36-37..... 38-40..... 41-42..... >42.....
Estadía (días):	Hospital:	UCI:	

DATOS FEONEONATALES

Peso (gramos):	
Peso (rango g.): <1500..... 1501 - 1800..... 1801 - 2200..... 2201 - 2500..... 2501 - 2800..... 2801 - 3000..... 3001 - 3200..... 3201 - 3500..... 3501 - 3800..... 3801 - 4000..... >4000.....	
Apgar al minuto:	Apgar al minuto (rango): 0..... <4..... 4 - 7..... >7.....
Apgar a los 5 min.	Apgar a los 5 min. (rango): 0..... <4..... 4 - 7..... >7.....
Edad gestacional por Capurro 8semanas):	
Edad gestacional por capirro (rango sem.): <35..... 36 - 37..... 38 - 40..... >40.....	
Complicaciones:	
Asfisia perinatal/Sufrimiento feal..... Síndrome dificultad respiratoria/distrés respiratorio	
Restricción del crecimiento uterino (RCIU) Prematuridad Ictericia	
Infección Muerte neonatal (24 h. 2 - 7 días, >7 días)	
Hipertensión arterial Malformaciones Otros (mencione):	
Estadía (días):	Hospital: UCI:

OTROS DATOS DE INTERÉS – OBSERVACIONES

Sello y Firma Evaluador (a):