



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
“Asociación del polimorfismo 677CT del Gen MTHFR,
niveles séricos de ácido fólico y de homocisteína en madres de niños

con y sin cardiopatía congénita”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestría En Ciencias De La Salud

PRESENTA

Penélope Antonieta Noriega Zapata.

Director de Tesis:

D. en C. José Alfredo Sierra Ramírez.

D. en C. Rocío Sánchez Urbina.

México, D.F., Julio de 2011



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 13:30 horas del día 30 del mes de Mayo del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESM para examinar la tesis titulada:

“Valor pronóstico de la elevación del S-T en el daño por reperfusión en infarto agudo del miocardio”

Presentada por la alumna:

Rodríguez
 Apellido paterno

Somarriba
 Apellido materno

Martha Elena
 Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	2	0	6	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias de la Salud

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


 Dr. Carlos Castillo Henkel


 Dr. Gustavo Guevara Balcázar


 Dr. Juan Asbun Bojalil

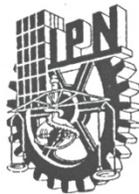

 Dra. Elvia Mera Jiménez


 Dra. María del Carmen Castillo
 Hernández

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


 Dr. Eleazar Lara Padilla


 ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
 I.P.N.
 SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
 E INVESTIGACION
 Y CONTINUACIÓN

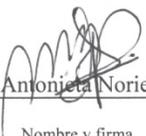


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 30 del mes Mayo del año 2011, el que suscribe Penélope Antonieta Noriega Zapata alumna del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud con número de registro B091908 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. José Alfredo Sierra Ramírez y Dra. Roció Sánchez Urbina y cede los derechos del trabajo intitulado "Asociación del polimorfismo 677CT del Gen MTHFR, niveles sericos de acido fólico y de homocisteina en madres de niños con y sin cardiopatía congénita", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección nozpneo@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Penélope Antonieta Noriega Zapata

Nombre y firma

Este trabajo fue realizado en la Clínica de Especialidades de la Mujer de la Secretaria de la Defensa Nacional, el Departamento de Genética y Cardiología Pediátrica del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, el departamento de Biología Molecular de l Centro medico nacional Siglo XXI y en la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional bajo la Dirección del Dr. D.en C:José Alfredo Sierra Ramírez y la D.en C. Rocío Sánchez Urbina.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT, por su interés para el progreso y el crecimiento profesional con miras a la excelencia y el apoyo económico otorgado para la realización de los estudios de Maestría en Ciencias de la Salud a través de la beca número: _____.

Al Instituto Politécnico Nacional, por ser cuna del conocimiento, haberme brindado los primeros cimientos en mi formación profesional y ahora abrirme las puertas de sus aulas y laboratorios, así como el conocimiento infinito de mis profesores.

A el Dr. José Alfredo Sierra Ramírez, director de esta tesis, por su invaluable apoyo y atención, en especial por brindarme su mano y la oportunidad de compartir sus conocimientos y experiencias.

A los miembros del comité tutorial:

Dra. Rocío Sánchez Urbina mi maestra y amiga, llena de una chispa interminable de conocimiento y paciencia.

Dra. María Elena Reyes Gutiérrez por esa luz constante de sabiduría que siempre brota de ella y su incondicional afán de enseñar.

Dra. Esther Ocharan por la experiencia enriquecedora de haberla conocido y su interés en el crecimiento profesional de sus alumnos.

Dra. Liliana Anguiano Robledo por su paciencia, buena disposición y cordura.

Al Teniente Coronel M.C. Jorge Mauricio Acosta García mi jefe y amigo, quien ha sido clave en este proceso, por su gran apoyo y excelente persona.

A todos mis amigos de generación María Elena, Selene, Doris, Liz, Tatis, Susy, Paty, Rafael, Hugo, David, Liborio, Darinel, Roberto, Celso, Poblano y Fernando por toda esa mezcla interminable de matices, conocimiento y experiencia, por su amistad, su apoyo en los buenos y malos momentos, y por todos los éxitos a seguir.

DEDICATORIAS

A Dios por su amor, compañía, su presencia interminable, por demostrarme cada mañana que me levanto que siempre ha estado conmigo, que estoy bajo su manto y que es un padre bondadoso.

A mi padre por su amor, su apoyo, por enseñarme que el tropiezo es el camino al éxito, que hay que perseverar y ver siempre adelante te amo.

A mi madre por su muestra infinita paciencia, fortaleza, amor e inteligencia, porque siempre a sido un apoyo incondicional cuando creo que el camino se ha terminado, te amo.

A Kepler por su caminar juntos en la vida , por enseñarme que el amor es noble, desinteresado y suave , pero a la vez fuerte, constante, sin obstáculos, por apoyar cada nueva locura, cada paso incierto, por todo ese amor y esos hijos maravillosos te amo.

A mis hermanos Francisco, Hanzel y Erika por todos esos gratos momentos de la infancia, su amor incondicional, sus palabras de aliento y su compañía durante las pausas en el camino, mi vida no sería igual sin ustedes.

A mis Hijos: Emmanuel por haberme abierto el camino a la experiencia maravillosa de ser madre, por tu fuerza y compañía, por tomarme siempre de la mano y por ser una fuente de ideas, Joanna por poder ver todos los días tu sonrisa, tu inteligencia y sentido de humanidad, por ese humor interminable y tus ganas de seguir adelante, Dayra por ese gesto de amor y ternura que siempre estas dispuesta a dar, esas miles de cartas y dibujos de amor que dejas por toda la casa y esa chispa que siempre brota de tu ser, Pepito por tus besos tiernos, tus manos amorosas por estar siempre convencido que soy la mejor, a los cuatro porque con esa gama de personalidades han logrado hacerme feliz, mejor persona y más consciente de mi, los amo.

INDICE	PAG.
ABREVIATURAS.....	I
RESUMEN.....	II
ABSTRAC.....	III
1. Introducción.....	
2. Marco Teórico	
3. Justificación.....	
4. Hipótesis.....	
5. Objetivos.....	
5.1. Objetivo General	
5.2. Objetivos Particulares.....	
6. Material y Métodos.....	
7. Resultados.....	
8. Discusión	
9. Conclusiones.....	
10. Perspectivas	
11. Bibliografía.....	
12. Anexos.....	
12.1. Anexo No. 1.....	
12.2. Anexo No. 2.....	

ABREVIATURAS:**5-MTHF:** 5-Metiltetrahidrofolato**677CT:** Polimorfismo 677Citosina-Timina**C:** Citosina**CAD:** Enfermedad coronaria y arterial**CBS:** Cistatinona B sintetasa**CC:** Cardiopatías congénitas.**CEM:** Clínica de especialidades de la Mujer.**DNA:** Acido desoxirribonucleico**DTN:** Defectos de Tubo neural.**HCY:** Homocisteína**HIMFG:** Hospital Infantil de México Federico Gómez.**MS:** Metionina sintetasa**MTHFR:** Metiltetrahidrofolatoreductasa**NMDA:** N-metilo-D aspartato**RCIU:** Restricción en el crecimiento intrauterino**PCR:** Reacción en cadena de la Polimerasa**SAH:** S-Adenosilhomocisteína**SAM:** S-Adenosilmetionina**SEDENA:** Secretaría de la Defensa Nacional.**T:** Timina

RESUMEN:

Las cardiopatías congénitas (CC) son las alteraciones multifactoriales más comunes en la población general, representan uno de los problemas de salud con mayor impacto en la mortalidad infantil. Las CC afectan de 3 a 8 por 1,000 recién nacidos vivos. En México las CC son la tercera causa de muerte en niños preescolares. A pesar de los numerosos estudios para establecer la etiología de las CC no todas las causas están bien establecido, se considera un origen multifactorial. Dentro de los factores genéticos implicados se encuentra el polimorfismo del gen 677CT que codifica para la enzima *Metiltetrahidrofolato reductasa* (MTHFR) elemento fundamental en el metabolismo del ácido fólico, el cual se encuentra relacionado estrechamente con el metabolismo de la metionina y la homocisteína. Participa en la donación de grupos metilos y la alteración en su actividad produce daño endotelial, siendo una posibilidad causal de las CC. El reconocer si existe esta asociación permitirá influir en el aspecto nutricional para disminuir su incidencia.

El objetivo de este estudio fue comparar la frecuencia del polimorfismo 677CT del gen MTHFR en madres de niños mexicanos con CC y madres con niños sanos, así como establecer si existe alguna asociación entre la presencia del polimorfismo con los niveles séricos de homocisteína y de ácido fólico. Estudio comparativo de casos y controles. Se incluyeron madres de recién nacidos o lactantes con diagnóstico de CC y de recién nacidos o lactantes. Los niveles séricos de homocisteína y de ácido fólico fueron determinados por inmunoanálisis y RFLP's del polimorfismo 677CT del gen *MTHFR*.

RESULTADOS: Fueron estudiadas, 30 pacientes en los casos y 64 controles, la edad promedio de las madres de hijos con CC de 26.1 (D.E.8.48) y para las pacientes controles 27.4 años (D.E.8.96). La frecuencia de ingesta de ácido fólico entre las madres de hijos con CC fue del 85% y 92% para los controles. Un 9.7% de los casos ingirieron en forma prenatal ácido fólico, mientras los controles lo hicieron en un 23%. La cardiopatía congénita más frecuente fue la Conexión anómala total de venas pulmonares con un 54%. Las frecuencias genotípicas el homocigoto mutado TT se observó en el 38% de los casos y solo 8% de los controles.

Se observó una proporción mayor en la ingesta de ácido fólico prenatal y su concentración sérica, menores niveles de homocisteína y menor frecuencia del homocigoto mutado en los controles comparados con los casos, lo que nos habla que los niveles de homocisteína, ácido fólico y la presencia de alelo mutado puede ser una asociación que aumente el riesgo de desarrollar Cardiopatía Congénita.

ABSTRACT

Congenital heart disease (CHD) are the most common multifactorial disorders in the general population, they represent one of the health problems with greater impact on infant mortality. The CC affect 3 to 8 per 1,000 live births. In Mexico, the CC is the third leading cause of death among preschool children. Despite numerous studies to establish the etiology of CC not all causes are well established, is considered a multifactorial origin. Among the genetic factors involved is the 677CT polymorphism coding for the enzyme Metiltetrahidrofolatoreductasa (MTHFR) fundamental element in the metabolism of folic acid, which is closely related to the metabolism of methionine and homocysteine. Involved in the donation of methyl groups and the change in their activity produces endothelial damage, with a possibility of causal CC.

Recognizing if this partnership will influence the nutritional aspect to reduce its incidence. The aim of this study was to compare the frequency of the 677CT Polymorphism of the MTHFR gene in mothers of Mexican children with CHD and mothers with healthy children, and to establish whether there is any association between polymorphism with serum homocysteine and folic acid. Comparative study of cases and controls. It included mothers of newborns or infants with a diagnosis of CC and newborns or infants. Serum homocysteine and folic acid were determined by RFLP's immunoassays and 677CT polymorphism of the MTHFR gene.

RESULTS: We studied 31 patients in the cases and 64 controls, the average age of mothers of children with CC of 26.1 (DE8.48) and for control patients 27.4 years (DE8.96). The frequency of intake of folic acid mothers of children with CHD was 85% and 92% for controls. 9.7% of the cases ate in folic acid prenatally, while the controls did so by 23%. The most common congenital heart disease was the total anomalous connection of pulmonary veins with 54%. The homozygous mutant genotype frequencies the TT was observed in 38% of cases and only 8% of controls. Higher proportion was observed in prenatal folic acid intake and serum concentration, lower levels of homocysteine and lower frequency of homozygous mutated in cases compared with controls, which tells us the levels of homocysteine, folic acid and the presence mutated allele may be an association that increases the risk of Congenital Heart Diseases

INTRODUCCIÓN:

Las Cardiopatías (CC) son un defecto cardíaco de nacimiento causado por el desarrollo inadecuado del corazón durante el período fetal. En la mayoría de los casos de niños nacidos con CC, no existe un motivo conocido para la malformación.

Incidencia

La incidencia de CC ha sido estimada en 8 a 9 x 1 000 nacidos vivos y se considera que 2 x 1000 son malformaciones complejas de difícil tratamiento y mal pronóstico. En nuestro país representan la segunda causa de muerte en niños menores de un año y la tercera causa de muerte en niños mayores de 3 años (2) En el 13% de los casos existe una alteración cromosómica, en el 5% son debidas por una alteración mendeliana o monogénica y asociadas a síndromes. En el resto no existe una causa identificable para el defecto cardíaco y se considera que puede producirse por una herencia multifactorial.^{SE} asocian a otras malformaciones en un 30 a 50%. Durante el embarazo pueden ser causa de *hidrops fetalis*, RCIU y muerte fetal. En el periodo neonatal, 1/3 fallece en el primer mes y la mitad de estas muertes ocurren en la primera semana. Las CC más frecuentes son: comunicación interventricular, estenosis pulmonar, canal auriculoventricular y tetralogía de Fallot().

CLASIFICACIÓN:

Existen numerosas cardiopatías congénitas y también diversas formas de clasificarlas tanto de acuerdo a su fisiopatología como a su presentación clínica (Tabla N°1). La clasificación más básica es dividir las en cianóticas y en acianóticas. Las cardiopatías acianóticas son las más frecuentes y las más diversas, su característica común es la que las define: la ausencia de cianosis . Dentro de las cardiopatías acianóticas están las cardiopatías con cortocircuito de izquierda a derecha, que constituyen algo más del 50% del total de las cardiopatías congénitas, las cardiopatías obstructivas del corazón izquierdo, y otras menos frecuentes como las insuficiencias valvulares y las cardiopatías obstructivas.

<p>CARDIOPATIAS CONGENITAS ACIANOTICAS</p>	<p>Cortocircuito de izquierda a derecha: CIV, CIA, ductus, canal aurículo-ventricular, drenaje venoso anómalo pulmonar parcial.</p> <p>Obstructivas Corazón Izquierdo: Coartación aórtica, estenosis aórtica, estenosis mitral, hipoplasia ventrículo izquierdo.</p> <p>Insuficiencias valvulares y otras: Insuficiencia mitral, insuficiencia aórtica, estenosis pulmonar, estenosis ramas pulmonares</p>
<p>CARDIOPATIAS CONGENITAS CIANOTICAS</p> <p>(cortocircuito de derecha a izquierda)</p>	<p>Obstructivas Corazón Derecho: Tetralogía de Fallot, atresia pulmonar, ventrículo único o atresia tricuspídea con estenosis pulmonar.</p> <p>Mezcla Total: Ventrículo único o atresia tricuspídea sin estenosis pulmonar, conducto arterioso, drenaje venoso anómalo pulmonar total.</p> <p>Falta de Mezcla: Transposición de Grandes Arterias</p>

Tabla.No.1 Clasificación de las cardiopatías congénitas.

CARDIOGÉNESIS.

El desarrollo cardíaco en su totalidad el corazón, los vasos y las células sanguíneas inicia su formación en la tercera semana de gestación originándose en la hoja germinativa mesodérmica aún cuando en una etapa inicial forman una estructura par, hacia el vigésimo segundo día de desarrollo los dos tubos forman un único tubo cardíaco ligeramente incurvado constituido por un tubo endocardio interno y una hoja miocárdica que lo rodea.

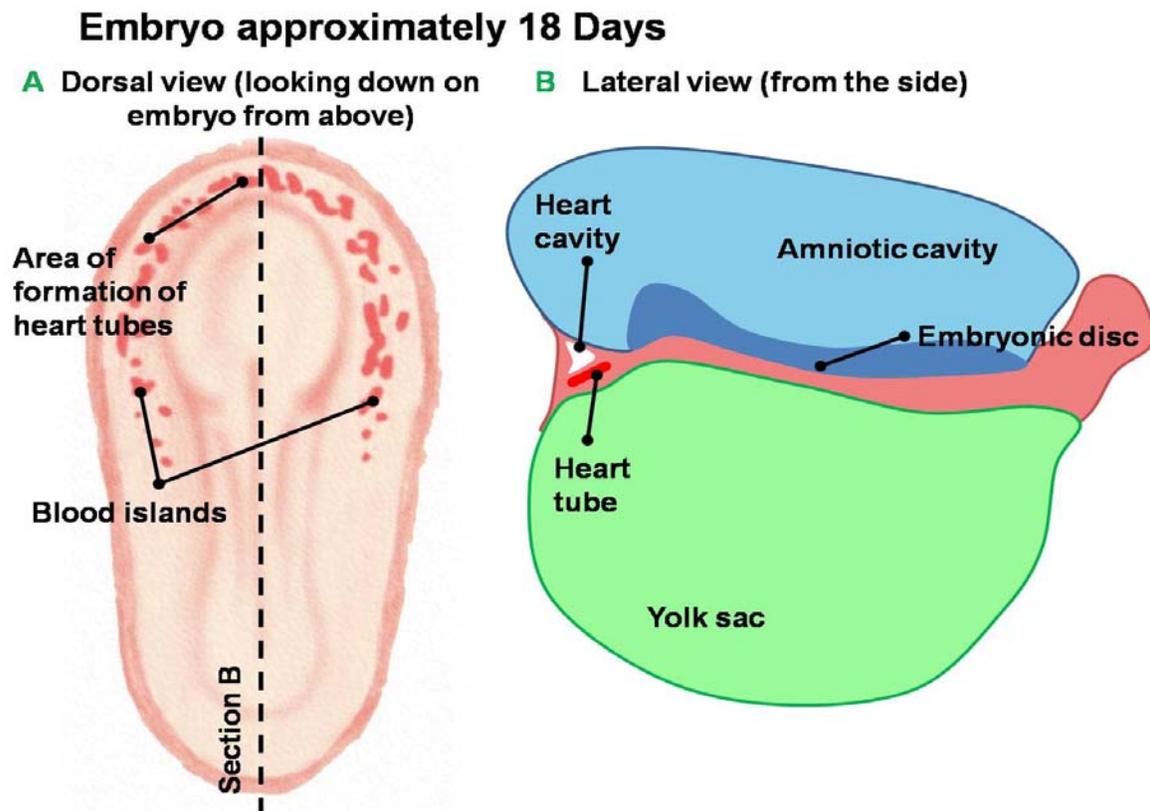


Figura 1.-Desarrollo temprano del tubo cardíaco.

En el curso de la cuarta a la séptima semana el corazón se divide en una estructura típica con cuatro cámaras.⁽¹¹⁾

Tabicamiento del bulbo:

- El bulbo esta dividido en el tronco (aorta y tronco pulmonar)
- El cono (infundíbulo de la aorta y del tronco pulmonar)
- La porción trabeculada del ventrículo derecho

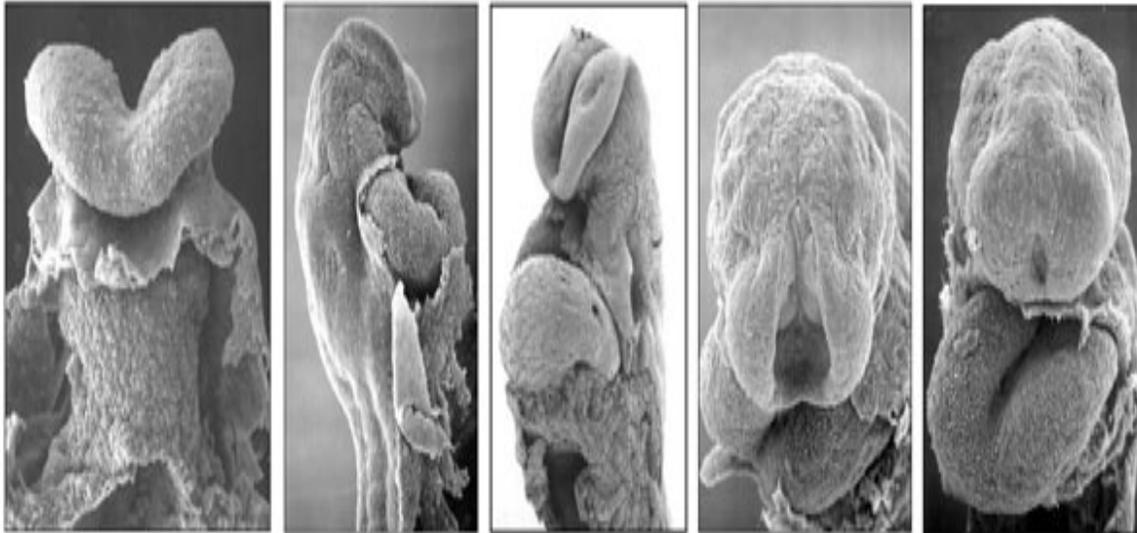


Figura 2.-El corazón humano a partir del día 10 al 25 (micrografía electrónica de barrido)

La región del tronco se halla dividida por el tabique aórtico pulmonar en forma de espiral, en dos arterias principales, las tumefacciones del cono dividen a los infundíbulo de los canales aórticos y pulmonar ocluyen el orificio interventricular con tejido de la almohadilla endocardica inferior, muchas anomalías vasculares se generan de la división anormal en la región tronco conal y en ellos pueden intervenir las células de la cresta neural que contribuye a la formación de las tumefacciones del tronco.

En consecuencia, la aorta nace del ventrículo derecho y la arteria pulmonar del izquierdo, a veces se acompaña de un defecto en la porción membranosa del tabique interventricular llamado foramen oval, por lo común esta combinada con un conducto arterioso persistente; dado que las células de la cresta neural contribuye a la formación de la almohadilla troncales, las lesiones de esta célula pueden provocar defectos cardíacos de la región infundibular.

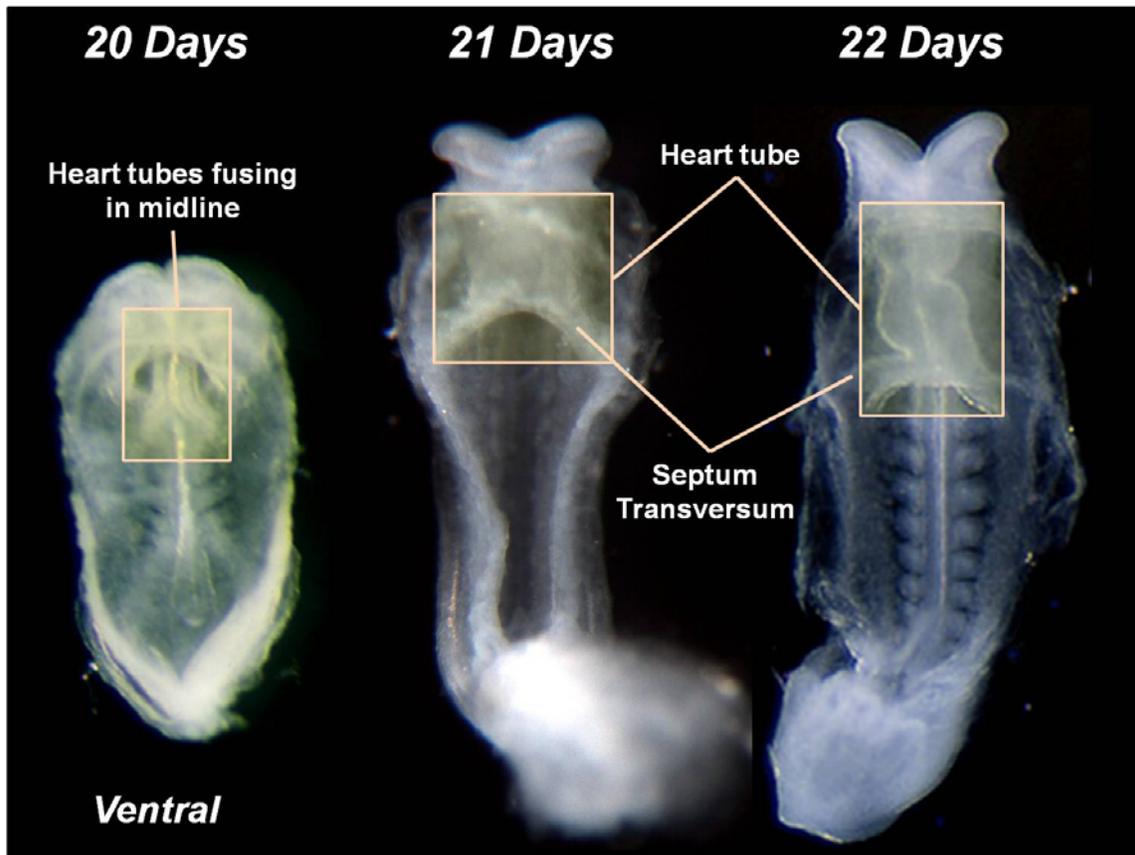


Figura.3.-Fusión del tubo cardiaco

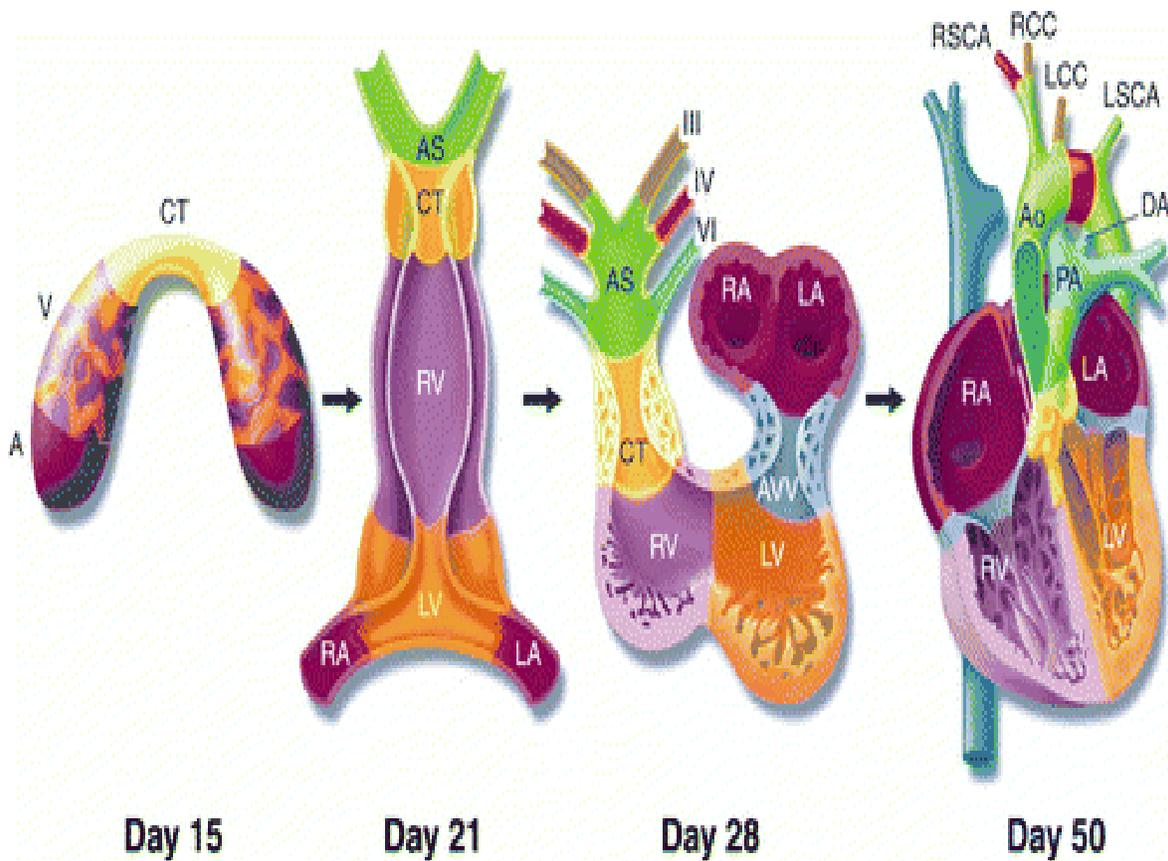


Figura.4.- Torsión del tubo cardiaco y desarrollo de las diversas regiones cardiacas

ETIOLOGIA:

Los defectos cardiovasculares tienen heterogeneidad genética. Se observan en gran grupo de síndromes, tanto genéticos como ambientales y con una relativa frecuencia, forman parte de cuadros polimalformativos de causa desconocida. Dada la complejidad de los procesos embriológicos que tienen lugar en la morfogénesis cardiovascular (integración de las funciones celulares, crecimiento, plegamiento, rotación, septación, constitución de cámaras) existen una multitud de genes implicados en dicho desarrollo.

Las cardiopatías congénitas se asocian con frecuencia a alteraciones cromosómicas (síndrome de Down 30-40%, síndrome velocardiofacial 75-85%, Turner 45%) y a noxias ambientales. Sin embargo un porcentaje alto son consideradas como multifactoriales ya que se presenta un factor genético predisponente y un factor ambiental desencadenante. Tabla.2.

Los factores de riesgo reconocidos en la generación de las CC son:

*Embriofetales: Aberraciones cromosómicas, mutaciones génicas, gemelaridad..

*Perinatales: Nacimiento pretérmino, hipoxia/asfixia.

*Maternos: Edad materna avanzada (>35años), cromosomopatías desbalanceadas, enfermedades maternas infecciosas y no infecciosas, ingesta de medicamentos, toxicomanías, exposición ambiental a tóxicos, hipertermia, carencias nutricionales, período intergenésico menor de dos años y multiparidad.

*Familiares: Presencia de CC en familiares de primer grado o antecedente de algún síndrome genético asociados a CC y consanguinidad .

HERENCIA	PRESENTACIÓN	RIESGO DE RECURRENCIA
MONOGENICA	Síndrome de Goldenhar (microsomía hemifacial). Asociación VACTERL Síndrome de Marfan. Síndrome de Ehlers Danlos Miocardopatía Hipertrofica.	50% 2-3% 50% 50% 50%
CROMOSOMICA	Síndrome velocardio facial (del22q11.2) Trisomía 21,18 y 13. Síndrome de Turner (45,X). Síndrome de 5p- (Cri du Chat)	50% 1%
MULTIFACTORIAL	Cardiopatías congénitas aisladas	1-3% hermanos. 10-14% padre afectado.
EXPOSICION MATERNA A TERATOGENOS: FISICOS QUIMICOS BIOLOGICOS	Fenilcetonuria. Diabetes Lupus eritematoso sistémico. Rubeola. Hipertermia. Deficiencia de folatos. Hiperhomocisteina.	

TABLA 2.-Etiología de las cardiopatías congénitas.Modificado de tal referencia

RIESGO DE RECURRENCIA:

Depende de la etiología que se refiera en la CC siendo en: Herencia multifactorial (2 al 5 %), herencia monogénica: autosómica dominante (50 %), herencia autosómica recesiva (25 %), herencia ligada al X recesivo (50 % para descendencia masculina), cromosomopatías por no disyunción (1 %), y en síndromes por microdelección en progenitores (50 %). (1,6)

ALTERACIONES FISIOPATOLÓGICAS DE LAS CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS:

Los trastornos fisiopatológicos asociados con las enfermedades cardiovasculares se puede resumir en:

1. Sobrecarga de volumen (precarga aumentada).
2. Sobrecarga de presión (poscarga aumentada).
3. Hipoxemia arterial (cortocircuito de D-I).
4. Alteración de la contractilidad (inotropismo).
5. Alteración en la función diastólica (lusotropismo).
6. Trastornos electrocardiofisiológicos (arritmias, disincronía AV o interventricular).
7. Desbalance aporte/demanda coronario (isquemia miocárdica).
8. Mixto.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

Dependeran tipo y severidad de la cardiopatía. El cuadro sintomático en recién nacidos y lactantes puede ser inespecífico (Ej.: un recién nacido con una coartación de aorta severa puede presentarse con un cuadro clínico que sugiere choque séptico; lactantes con Comunicación intraventricular moderadas inicialmente pueden presentarse con falla ponderal o con infecciones pulmonares repetidas). Figura No.

CAUSAS Y SINTOMAS DE REFERENCIA PACIENTES CON CARDIOPATIAS CONGENITAS:
Historia familiar de cardiopatía congénita o de muerte súbita en padres o hermanos.
Hallazgo de un soplo en tórax, cráneo, cuello o abdomen.
Portador de una anomalía extracardiaca que frecuentemente se asocia con cardiopatías
Portador de un dismorfismo sindromático que se asocia frecuentemente con cardiopatía
Paciente con una enfermedad autosómica dominante o recesiva que frecuentemente se asocia con cardiopatía
Madre embarazada con enfermedad que se asocia frecuentemente con cardiopatía
Crisis de cianosis de causa no determinada.
Sospecha de disritmias (palpitaciones, ritmo irregular).
Pobre tolerancia al ejercicio sin una causa definida.
Dolor precordial recurrente de origen no determinado y o Síncope.
Coreatetosis.
Pobre ganancia de peso sin etiología aparente.
Síndrome de insuficiencia cardiaca.
Síndrome de bajo gasto.
Cianosis central sin enfermedad pulmonar o neurológica.
Ausencia de pulsos femorales.
Hipertensión arterial sistémica.
Cardiomegalia en Rx de tórax.

Tabla 3. Cuadro clínico de las cardiopatías congénitas.

DIAGNOSTICO:

El diagnóstico de las cardiopatías congénitas puede hacerse en forma prenatal entre las 18 y las 22 semanas de gestación. El profesor *Bonilla-Musoles* plantea que la época ideal para estudiar la anatomía cardíaca y sus posibles malformaciones, oscila entre 24 y 34 semanas, por la escasa refringencia del pulmón en estas edades gestacionales, la existencia de una abundante cantidad de líquido amniótico y el menor grado de calcificación de las estructuras de la caja torácica.

El diagnóstico precoz de las cardiopatías es importante, ya que la presentación clínica puede ser brusca, pudiendo producir incluso la muerte. Son reconocidas las dificultades incluso para el diagnóstico de las CC durante el examen neonatal aun defectos mayores pueden pasar inadvertidos, manifestándose clínicamente en forma tardía.

El método más efectivo para el diagnóstico de las CC es la ecografía. Como es imposible efectuar este examen a toda la población de recién nacidos, su inclusión al examen sonográfico obstétrico rutinario aparece como la forma más efectiva de incrementar la pesquisa antenatal y revelar una cifra de incidencia más real de CC.

El momento ideal para el diagnóstico es a partir de la semana 18 de gestación, la cifra de CC que pueden detectarse por equipos especializados puede llegar hasta el 75%. Sin embargo un USG en la 12-13+6 SDG con un aumento de la translucencia nucal >2mm, es un marcador temprano probable de CC REF.

ESTUDIO ACTUAL DE FACTORES ASOCIADOS A CARDIOPATIAS CONGENITAS:

Con respecto a los factores ambientales que se han encontrado en el desarrollo de las CC se ha asociado la ingesta periconcepcional de multivitamínicos y la disminución del riesgo del 24% en las CC y del 59% en los defectos cardíacos cono-troncales aislados REF. En diversos estudios se ha demostrado un efecto protector del uso de multivitamínicos, evidente en las madres que ingirieron estos en el período periconcepcional, comparada con las que tomaron la suplementación después del segundo mes de la concepción, teniendo un efecto más evidente en la comunicación interventricular y en los defectos los tractos de salida de ambos ventrículos. Experimentos en embriones de pollo demuestran que una deficiencia de ácido fólico, es asociada con Defecto del tubo Neural y defectos del tabique aórto-pulmonar. La íntima relación esta en el origen común de las células de la cresta neural, la que da origen a las células del músculo liso vascular del tabique cono-troncal,

originado del ectodermo neural. Estas células indiferenciadas de ambos sitios, son intercambiables en el desarrollo embrionario temprano.

La incidencia de defectos congénitos relacionados a la interrupción de la formación del tubo neural y la del tabique cono-troncal, puede ser reducida por el uso de suplementación con ácido fólico durante el embarazo. La base biológica no está completamente aclarada, sin embargo, debido a la participación de los folatos para mantener a la S-adenosilmetionina que es el donador primario de grupos metilo; el efecto teratogénico de la disminución de folatos sería el resultado de una insuficiencia de ácidos nucleicos para la rápida división celular del desarrollo embrionarioREF().

El ácido fólico, no solo mantiene los grupos metilo necesarios para los diferentes procesos bioquímicos, también es uno de los sustratos que dentro del metabolismo de la homocisteína, disminuye los niveles de la misma, por lo tanto una disminución de ácido fólico, condiciona un incremento de la homocisteína. Se sabe que la homocisteína es teratogénica, provocando DTN y CC entre otras malformaciones(28)

En madres de hijos con CC se ha observado hiperhomocisteinemia en el 46.2% después de ayuno y sin suplementación de multivitamínicos comparadas con las madres de los controles sanos que se encontró en solo el 14.3% REF. Recientes estudios en madres de pacientes con CC encuentran una asociación entre la hiperhomocisteinemia en las madres de estos pacientes como un factor de riesgo teniendo 2.9 veces más probabilidad de tener un hijo con CC que las que no presentan los niveles elevados de homocisteínaREF.

ÁCIDO FÓLICO. CARACTERÍSTICAS, METABOLISMO:

El ácido fólico, descubierto en 1945 por los laboratorios Lederle, también conocido, como folato, es una vitamina perteneciente al complejo B y es la vitamina B₉. Folato, es el término más utilizado para referirse a una familia de vitámeros de actividad biológica relacionada que toma su nombre del latín folium (hoja), ya que por primera vez se aisló de las hojas verdes de verduras.

El ácido fólico, que suele presentarse en la forma de poliglutamato en los alimentos, se descompone a la forma de monoglutamato por la folil conjugasa del páncreas y la conjugasa? de la mucosa de la pared intestinal.

Su función principal de este grupo de compuestos es actuar como coenzima en el transporte de fragmentos simples de carbono. El ácido tetrahidrofólico es un portador de formil de carbón único, hidroximetilo o grupos metilo. Tiene una acción importante en la síntesis de las purinas, guanina y adenina y de la pirimidina timina, que son compuestos que se utilizan para la formación de nucleoproteínas: ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), que son esenciales para la división celular.

El ácido fólico (ácido pteroilmonoglutámico, PGA) es la forma sintética farmacéutica de la vitamina y la que encontramos en los diferentes medicamentos y complejos vitamínicos así como en los suplementos que se añaden a los diferentes alimentos para así enriquecerlos.

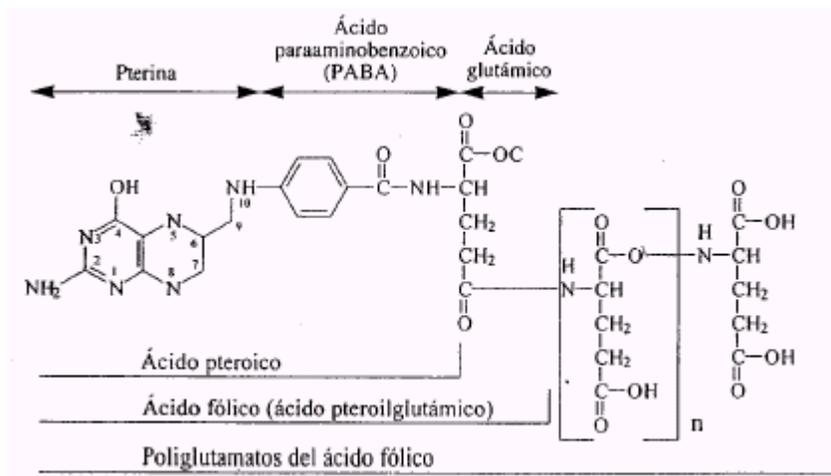


Fig 5. Estructura del ácido fólico REF.

La molécula de ácido fólico se compone de un anillo de pterina unida por la mitad por medio de un puente de metileno a un ácido p-aminobenzoico (figura 5). Al extremo carboxilo de este radical ácido se pueden unir de uno a 7 restos glutamato. En los alimentos se encuentran los folatos preferentemente en forma de poliglutamatos aunque también existen como mezcla de mono y poliglutamatos, siendo mayor la biodisponibilidad de los primeros. Además, los folatos naturales presentan diferentes grados de hidrogenación del anillo de pterina.

El ácido fólico debe ser sintetizado a través de su ingesta por lo cual es considerado como un nutriente fundamental. Cuando se agrega artificialmente se llama Ácido Fólico y como componente natural de las comidas se llama folato. Se requiere de ingesta diaria. Como el organismo lo almacena en pequeñas cantidades, las dietas sin ácido fólico ocasionan deficiencias en pocos meses. Es un compuesto crucial para el crecimiento, multiplicación, y migración celular.

<i>Causas de la deficiencia de folatos</i>	
Causas de deficiencia de folato	Necesidades aumentadas
Aporte deficitario	Embarazo
Elección incorrecta de alimentos.	Lactancia
Pérdidas debidas a almacenamiento y cocinado incorrectos	Prematuridad
Restricciones dietéticas frecuentes y mal planteadas	Crecimiento
Consumo elevado de alcohol	Hemólisi crónica
	Dermatitis exfoliativacrónica
Trastornos en la absorción	Situaciones hipercatabólicas (postoperatorio,
Enfermedad celíaca quemaduras)	Hemodiálisis
Esprue Tropical	
Enfermedad de Whipple	
Esclerodermia	
Amiloidosis	
Trastornos congénitos del metabolismo	
Diverticulosis intestinal	
Consumo crónico de alcohol	Homocisteinuria

Figura 6. Deficiencia de folatos. En mujeres que estén planificando un embarazo se recomienda una ingesta adicional diaria de 400 µg en forma de suplementos o alimentos enriquecidos tres meses antes del embarazo, se asume que las mujeres seguirán tomando la ingesta adicional diaria de 400 microgramos en forma de suplementos o alimentos enriquecidos al menos durante las primeras 12 semanas de gestación periodo crítico de la embriogénesis.

La enzima 5,10 metil tetrahidrofolato reductasa es la encargada de convertir el folato que se ingiere en la dieta en tetrahidrofolato. Alteraciones en el gen para esta enzima (polimorfismos genéticos) pueden restringir la disponibilidad del tetrahidrofolato, lo que provoca defectos congénitos. En presencia del adenosín difosfato (NAD) el ácido fólico se

reduce a ácido tetrahidrofólico (THFA), que se une con una unidad de carbono para formar ácido formiltetrahidrofólico que es mucho más estable. El THFA participa en la interconversión de la serina y glicina, la oxidación de la glicina, la metilación de la homocisteína a metionina con vitamina B₁₂ como cofactor y la metilación del precursor etanolamina a la vitamina colina.

La enzima MTHFR cataliza la reducción de 5,10-metiltetrahidrofolato a 5, metiltetrahidrofolato el cual es la forma circulante de folato. El 5 metiltetrahidrofolato dona su grupo metilo a la homocisteína y forma así metionina y tetrahidrofolato. El gen de la enzima 5,10 metil tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) tiene su locus en la región 1p36.3. El gen *MTHFR* se ha estudiado con respecto a la participación genética en el origen de diversas enfermedades de origen multifactorial, principalmente el polimorfismo 677CT del gen *MTHFR*, provocando una substitución de un aminoácido citosina por un aminoácido de timina en la posición 677 en la estructura primaria de la enzima, lo que genera con una deficiencia de folatos la elevación secundaria de Homocisteína^{9, 15, 17}.

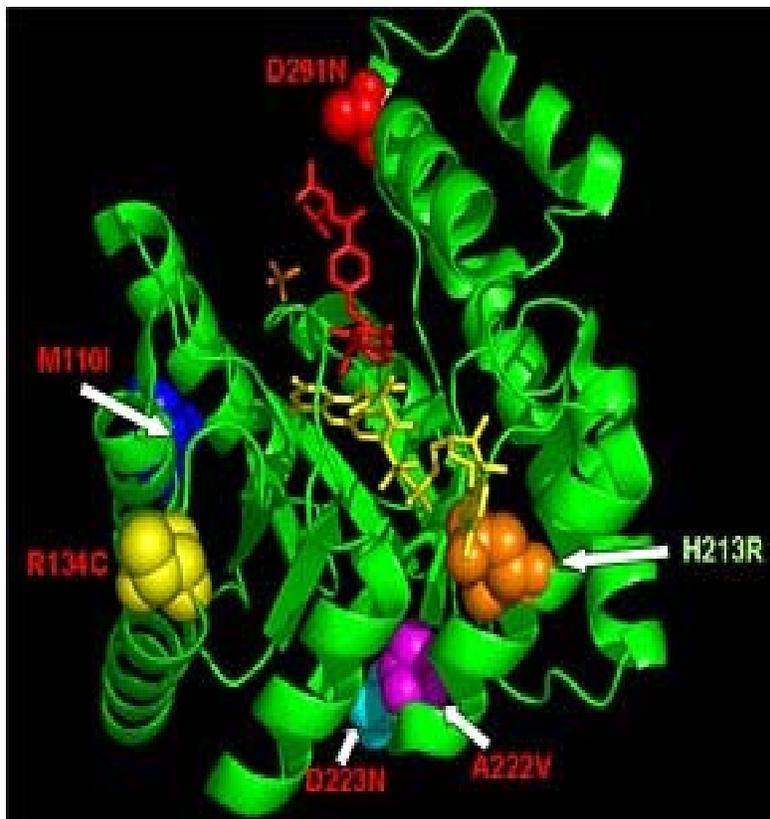


Figura 6. La mutación 677CT crea el cambio de una valina por una alanina en el codón 222 de la proteína, lo cual se asocia con una enzima termolábil con disminución del 70% de su actividad.

La homocigocidad para el alelo 677CT resulta en la disminución de la actividad en un 70% de la enzima MTHFR comparado con sujetos no homocigotos para este polimorfismo ^{9, 14}. . A la fecha, además de los 2 polimorfismos que le dan termolabilidad a la enzima (677CT y A1298C¹⁸), se han identificado más de 20 mutaciones en el gen *MTHFR*, que causan deficiencia enzimática severa, provocando una enfermedad llamada homocistinuria, patología con herencia autosómica recesiva en que las mutaciones descritas son poco frecuentes y solo están presentes en algunas familias con un cuadro clínico que incluye; retardo psicomotor, debilidad muscular proximal, marcha inestable, patología vascular (trombosis vascular) y homocistinuria ^{31,39}

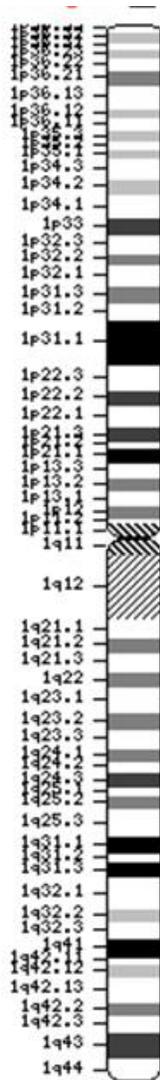


Figura 7. MTHFR: codifica una proteína (homodímero) de 656 aminoácidos, de peso molecular de 150KD.



Los estudios experimentales y epidemiológicos han mostrado una relación clara entre déficit de folato y defectos del tubo neural y actualmente han girado su relación a defectos en la septación cardiaca, ya que ambos defectos parecen tener un origen embriogénico común y una probable relación con el polimorfismo 677CT, hiperhomocisteinemia y deficiencia de folatos.

Las mutaciones de la MTHFR también se han asociado a la no disyunción productora de aneuploidías además de defectos congénitos como los cardiovasculares y del Sistema Nervioso Central. La frecuencia de este polimorfismo en la población es un argumento

esencial a favor de la suplementación preventiva de ácido fólico sintético y natural a la población, además de la dieta.

LOS DEFECTOS DE CIERRE DEL TUBO NEURAL (DTN) DESDE EL PUNTO DE VISTA EPIDEMIOLÓGICO.

El déficit de ácido fólico ocasiona daños en la formación de la médula espinal y el cerebro. Los defectos de tubo neural (DTN), de los puntos de cierre 2 y 5 se ha observado que presentan una asociación con el genotipo 677TT FIG8. Determinándose como una entidad en la que intervienen factores genéticos y medioambientales que reducen la disponibilidad de tetrahidrofolato y que predisponen a anencefalia y espina bifida principalmente.

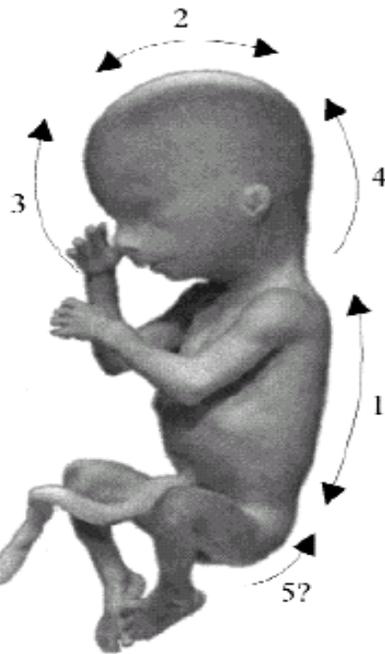


FIG. 8. Defectos de Tubo Neural: 2-anencefalia, 5-espina bifida ^{Van der Put et al, 2001}

EL VALOR DEL ÁCIDO FÓLICO EN LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES.

Las cardiopatías congénitas constituyen el 50% de todos los defectos congénitos y de ellas el 50% causan muerte en el primer año de vida. Algunas de ellas dependen de la migración de las células de la cresta neural cardiaca. Se ha involucrado a un gen en el transporte de folatos (RFC-1), cuyas variantes polimórficas G80/G80 y G80/A80 están estadísticamente

asociados a estos defectos, por lo que en este caso, también el ácido fólico sería una herramienta útil para su prevención(17)

Muchos estudios han reportado aumento en el riesgo de enfermedad coronaria isquémica, asociada con ingestas bajas ó niveles sanguíneos bajos de folatos por su relación con el metabolismo de la homocisteína, que se encuentra normalmente en el organismo y se origina en el proceso de metilación de aminoácidos. Los niveles de homocisteína mayores de 10 micromoles/litro actúan como factor de riesgo cardiovascular para el infarto del miocardio, tromboembolismo y estenosis carotídea. Igualmente se ha relacionado con la patogénesis de la enfermedad vascular y con la aterosclerosis.¹²⁻¹⁴

El mecanismo involucrado se relaciona con los cambios en el efecto sobre el fibrinógeno y la lipoproteína a (LPa), que aumenta la coagulación y disminuye la capacidad vasomotora hasta producir rigidez arterial(13,16)

Estudios realizados de forma aleatoria han evidenciado que un suplemento de ácido fólico preconcepcional previene los defectos del tubo neural y otras malformaciones. Se ha asociado con la aparición de paladar hendido y labio leporino, malformaciones del tractus urinario como la extrofia de vejiga, de las extremidades, defectos abiertos de la pared abdominal como la gastrosquisis u onfalocele y las CC (15,16).

El nivel de riesgo para las personas que sufren determinadas mutaciones en las enzimas que intervienen en el metabolismo del ácido fólico, tales como la mutación 677CT del gen *MTHFR* y otras hacen que el riesgo de una deficiencia de folatos varíe.

CONSECUENCIAS FUNCIONALES DE LA VARIANTE C677T DEL GEN 5,10 METILENETETRAHIDROFOLATO REDUCTASA

Efectos bioquímicos directos

El folato estabiliza la enzima polimórfica codificada por el gen variable C667 evitando que abandone su cofactor flavínico. Como la 5,10metilene tetrahidrofolato reductasa es una proteína flavínica, varios autores han sugerido que personas con el genotipo recesivo TT podrían responder más rápidamente a suplementos de riboflavina (vit B2)

Biosíntesis de nucleótidos

El dTMP usado por el DNA es sintetizado por la timidilato- sintetasa desde dUMP y requiere una unidad de carbono de la 5,10metilene tetrahidrofolato. Si los niveles de folato son bajos, se produce una mala incorporación del uracilo, conduciendo a las roturas en el filamento de la DNA, lo cual puede predisponer al cáncer. La enzima polimórfica codificada por el C677T puede realizar la síntesis del dtmp si el nivel de folato es bueno, y esto puede ser una estrategia para producir la protección contra el cáncer de colon y leucemia. Si los niveles de folato son pobres, el polimorfismo puede conferir quizás más riesgo que protección

Metilaciones biológicas

La metionina dietética no puede proporcionar todos los grupos metílicos necesarios para las reacciones de metilación celular, conduciendo a una dependencia de la síntesis en novo de la metionina gracias a la fuente de carbono que proporciona el folato. Los niveles del S-adenosil-metionina (SAM) regulan la metilación de proteínas, lípidos, aminos y ADN y así la SAM regula la expresión de los genes (en lugares específicos CpG) y desempeña un papel crítico en el proceso de desarrollo. La metilación en racimos de los sitios de CpG asociados a regiones promotoras tienden a silenciar la expresión del gen. Una deficiencia de los grupos metilo puede por tanto alterar el control normal de la expresión de los protooncogenes. La enzima polimórfica codificada por el gen C677t puede reducir la disponibilidad de los grupos metílicos en novo para estas reacciones

Figura 8. Consecuencias funcionales de la variante 677CT MTHFR.

HOMOCISTEINA:

La homocisteína es un aminoácido sulfurado cuyo metabolismo ocurre por tres vías: remetilación, transulfuración y la activación a homocisteinil-RNAt. En su metabolismo existen dos mecanismos el de la remetilación y el de la transulfuración (fig.1)

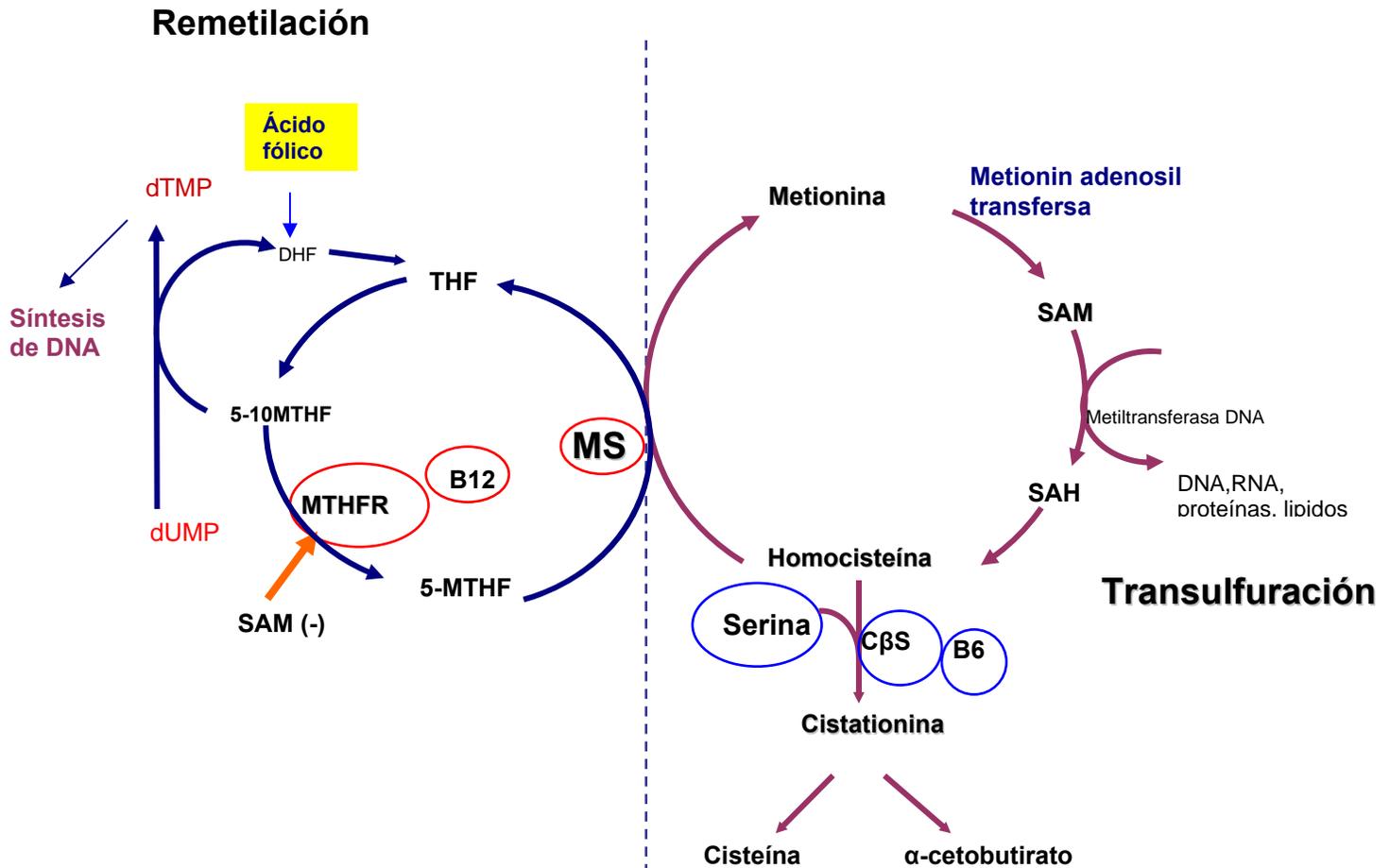


Figura 9. Metabolismo de la homocisteína a través de dos vías: Remetilación y transulfuración Cistionina β sintasa (CBS), 5,10-metilenetetrahidrofolato (5,10-MTHF), metilenetetrahidrofolato reductasa (MTHFR), 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF), metionina sintetasa (MS), S-adenosilmetionina (SAM), tetrahidrofolato (THF)⁶.

REGULACIÓN NUTRICIONAL DEL METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA:

La capacidad que tiene el cuerpo para discriminar entre las vías de remetilación y transulfuración, es un mecanismo de adaptación dependiendo de la cantidad de metionina en la dieta o el estado de ayuno lo que lleva a una regulación coordinada entre las dos vías

El primer mecanismo por el que las dos vías son coordinadas, está en la función de la S-adenosilmetionina (SAM) para actuar como un inhibidor alostérico de la metilendetrahidrofolato reductasa y como un activador de Cistationa Beta Sintetasa (CBS). Así SAM suprime la síntesis de N-5 metilendetrahidrofolato (Fig.) requerido para la remetilación, además de ser promotor inicial de la reacción de transulfuración (síntesis de cistationina). Así la concentración de SAM es un importante determinante del destino de las moléculas de homocisteína.

El segundo mecanismo consiste en la regulación de la concentración de SAM por sí misma. Así los cambios en la metionina intracelular, especialmente debido a la dieta, afectan la síntesis de SAM basada en la actividad de las enzimas sintetasa de SAM⁶.

Inversamente cuando las cantidades de metionina provenientes de la dieta son bajas, la concentración de SAM es insuficiente para la inhibición de MTHFR lo que lleva a un aumento en la síntesis de 5-metilendetrahidrofolato. El resultado de la elevación de la concentración intracelular de N-5-metilendetrahidrofolato será asociada con un aumento en la disponibilidad del substrato para la remetilación de metionina así la remetilación será favorecida sobre la transulfuración por la concentración de SAM que es baja para activar a la enzima CBS⁶.

El control de los niveles de homocisteína es regulado por las enzimas MTHFR, MS y CBS. Este control se lleva a cabo de una forma natural en nuestro organismo. No obstante en la presencia de hiperhomocisteinemia, además de la activación de las vías metabólicas normales, lleva a la acumulación de S-adenosilhomocisteína el cual es un inhibidor de las metiltransferasas, esta hiperhomocisteinemia puede ser debido por alteraciones en la función de las enzimas reguladoras del ciclo de la metionina o por factores externos tales como algunos medicamentos o ingesta de alcohol entre otras causas, contribuyendo al bloqueo de la vía por medio de la remetilación en la que participa la MTHFR.

Al establecer el ayuno de más de 4 horas en las madres de los pacientes con CC y en el grupo control evaluaremos la función de la vía de la remetilación y no así la de la transulfuración en el metabolismo de la metionina la cual es dependiente de vitamina B₆ y provocaría hiperhomocisteinemia con deficiencia de ácido fólico. Corregible si las madres de ambos grupos ingirieran ácido fólico de forma perinatal con una dieta rica de alimentos que contengan ácido fólico o por lo menos un mes con dosis de 400mcg de ácido fólico en presentación farmacológica.

ESTADO ACTUAL DEL POLIMORFISMO DEL GEN DE LA ENZIMA MTHFR, NIVELES DE ACIDO FOLICO Y HOMOCISTEINA EN LAS CARDIOPATIAS CONGENITAS:

Se ha evidenciado en estudios clínicos a nivel mundial que este polimorfismo está presente en el 10-12% de la población caucásica del norte de Europa con niveles de homocisteína en sangre más elevados que aquellos con un genotipo 677CC silvestre en un 25%. El efecto que un genotipo 677TT mutado tiene sobre los niveles de la homocisteína es más pronunciado ante un estatus de niveles de ácido fólico bajo.

La deficiencia de ácido fólico y el aumento de los niveles de homocisteína pueden condicionar la presentación de diversas patologías incluyendo las CC. Tanto los niveles de homocisteína como de ácido fólico pueden verse modificados por la presencia del polimorfismo 677CT del gen MTHFR en estado heterocigoto y homocigoto. La prevalencia del polimorfismo varía dependiendo de la población estudiada, se ha encontrado con mayor frecuencia en población italiana (44-47%); en hispanos de Atlanta y California (41,1% y 42%), así como en población de Francia y Japón (36% y 34%)^{14, 15}.

En población mexicana el polimorfismo del gen *MTHFR* (677CT) es más frecuente que en otras poblaciones, en el grupo étnico mestizo se presenta entre el 50% y el 58.5%, estudios de la población de Guadalajara reportan una frecuencia del 44% y en población de Tarahumaras del 34%^{14, 20, 21, 22, 23}. Las frecuencias genotípicas para el homocigoto *TT* han sido reportadas del 32-35.7%^{14, 16, 21, 22, 23}.

El polimorfismo 677CT del gen *MTHFR* se ha encontrado en mayor proporción en pacientes con CC que en población sana (sugiriendo que la presencia del polimorfismo es un factor de riesgo para el desarrollo de CC²⁴). Además, el análisis del líquido amniótico en madres de productos con CC, reveló que en el 50% de ellas se encuentran niveles elevados de homocisteína, aunado al genotipo para el polimorfismo 677CT, el cual se encontró en el 35% de las madres y solo en el 12% presentaban tanto el polimorfismo como niveles elevados de homocisteína en líquido amniótico²⁵.

En madres de hijos con CC se ha observado hiper-homocisteinemia en el 46.2% después de ayuno y sin suplementación de multivitamínicos comparadas con las madres de los controles sanos que se encontró en solo el 14.3%.²⁶ Recientes estudios en madres de pacientes con CC encuentran una asociación entre la hiper-homocisteinemia en las madres de estos pacientes como un factor de riesgo con 2.9 veces más probabilidad de tener un hijo con CC que las que no presentan los niveles elevados de homocisteína²⁷.

La incidencia de defectos congénitos relacionados a la interrupción de la formación del tubo neural y la del tabique cono-troncal, puede ser reducida por el uso de suplementación con ácido fólico durante el embarazo. La base biológica no está completamente aclarada, sin embargo, debido a la participación de los folatos para mantener a la S-adenosilmetionina que es el donador primario de grupos metilo; el efecto teratogénico de la deficiencia de folato sería el resultado de una insuficiencia de ácidos nucleicos para la rápida división celular del desarrollo embrionario.()

El ácido fólico, no solo mantiene los grupos metilo necesarios para los diferentes procesos bioquímicos, también es uno de los sustratos que dentro del metabolismo de la homocisteína, disminuye los niveles de la misma, por lo tanto una disminución de ácido fólico, condiciona un incremento de la homocisteína.

Se sabe que la homocisteína es teratogénica, provocando DTN y CC entre otras malformaciones.^{28,29} La homocisteína es un antagonista para los receptores de N-metilo-D-aspartato (NMDA). Esos receptores inotrópicos, para glutamato son canales iónicos para calcio, en edad adulta los receptores se encuentran en altas concentraciones en el encéfalo, participando en la transmisión sináptica, pero su activación guarda una relación más estrecha con la inducción de diversas formas de plasticidad sináptica()

En el desarrollo embrionario los receptores NMDA se encuentran activados en la etapa de cierre de tubo neural o de la migración de las células de la cresta neural, siendo el principal regulador de migración neuronal, adhesión celular, flujo celular de calcio y apoptosis (muerte celular programada).^{32, 29} Se ha demostrado experimentalmente en embriones de pollo, que la exposición temprana en el desarrollo embrionario con antagonistas de los receptores de NMDA, provoca malformaciones craneofaciales y DTN³³. Al ser la homocisteína un antagonista de los receptores de NMDA, puede inducir desarrollo anormal como ya se ha observado.²⁸

La importancia de la ingesta de ácido fólico después de la organogénesis cardíaca no tiene un efecto preventivo, sino es en la etapa prenatal de por lo menos 4 meses con la ingesta de ácido fólico de 400 μ g diarios antes de la concepción REF.

En dos estudios previos ^{1,2} se observó una asociación entre la ingesta peri-concepcional de multivitamínicos y la disminución del riesgo del 24% en las cardiopatías congénitas y del 59% en los defectos cardíacos cono-troncales aislados.

El polimorfismo 677CT de la MTHFR se ha encontrado en mayor proporción en pacientes con CC que en población sana, sugiriendo que la presencia del polimorfismo es un factor de riesgo para el desarrollo de CC ⁴. En madres de hijos con CC se ha observado hiperhomocisteinemia en el 46.2% después de ayuno y sin suplementación de multivitamínicos comparadas con las madres de los controles sanos que se encontró en solo el 14.3% ⁵. Estudios recientes en madres de pacientes con CC encuentran una asociación entre la hiperhomocisteinemia en las madres de estos pacientes como un factor de riesgo teniendo 2.9 veces mayor probabilidad de tener un hijo con CC que las que no presentan los niveles elevados de homocisteína. ⁷.

Se ha identificado a la hiperhomocisteinemia como uno de los más importantes biomarcadores para el desarrollo de cardiopatías congénitas aisladas ⁷.

Las poblaciones analizadas en los estudios no fueron gestantes solo existe una publicación en el 2001 por Wenstrom K.D et al ⁸ en donde el análisis del líquido amniótico en madres de productos con cardiopatías congénitas, reveló que en el 50% de ellas se encuentran niveles elevados de homocisteína. Al analizar sus genotipos para el polimorfismo 677CT, el 35% de las madres presentaban el genotipo TT y solo el 12% presentaban tanto el genotipo TT como niveles elevados de homocisteína en líquido amniótico.

En este estudio se determinó si el polimorfismo C677T estuvo presente en mayor frecuencia madres de niños con CC y si la vía metabólica de la metionina que depende de la función de la enzima MTHFR está alterada en ellas dando lugar a hiper-homocisteinemia. Cuando se establece ayuno de más de 4 horas y sin suplementación de multivitamínicos se induce la vía de la remetilación y no la vía de la transulfuración con lo que en presencia de bajas concentraciones de ácido fólico, la función de la enzima MTHFR es termolábil y funcionalmente deficiente es insuficiente para mantener los niveles séricos de HCY. Lo anterior provoca hiperhomocisteinemia en el caso de no haber tenido suplementación de ácido fólico por lo menos 4 meses antes del embarazo o en el periodo perinatal. Para el funcionamiento y control de la vía se considera que:

El estudio ideal para demostrar una asociación entre niveles séricos bajos de ácido fólico, hiper-homocisteinemia y presencia o no del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* debería realizarse entre las semanas 3^a – 6^a semanas de gestación que es el momento teratogénico que presumiblemente condiciona la cardiopatía (CC) sin embargo, para realizar dicho estudio existen varias limitantes, la primera es desde el punto de vista ético, ya que al captar a una mujer embarazada en cualquier momento de la gestación estamos obligados a indicar la ingesta de ácido fólico independientemente de si existe o no cardiopatía reconocida en su producto. Por otro

lado, la posibilidad de reunir el tamaño de la muestra necesario de mujeres embarazadas entre las semanas 3^a y 6^a de gestación con un producto con CATVP es prácticamente imposible. Aunque el presente estudio tiene la limitante de que no podremos asegurar que los niveles de ácido fólico y de homocisteína en sangre encontrados al momento del estudio sean iguales a los que tuvo la madre a lo largo de la gestación, si nos permitiera establecer si existe alguna asociación entre los niveles séricos con la presencia o no del polimorfismo y si dicha asociación se mantiene o difiere en madres de niños con CC y en madres de niños sanos y establecer grupos de acuerdo a la información recabada con la historia clínica con respecto a la ingesta de ácido fólico suplementario durante el periodo peri-concepcional.

4.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Las CC representan uno de los problemas de salud con mayor impacto en la mortalidad infantil. A pesar de ello, no todas sus causas están bien establecidas. Se reconoce la participación de variantes genéticas en su etiopatogénesis. La influencia del polimorfismo C677T del gen la MTHFR y de los niveles séricos de homocisteína y de ácido fólico en las madres de niños con CC aún no está definida. Se idéntico mutaciones en el gen y conocer si existe alguna asociación entre la presencia del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* con los niveles séricos de homocisteína y de ácido fólico en las madres de niños con CC y con la presencia de la cardiopatía en sus hijos. ¿Existe asociación entre la presencia del polimorfismo C677T de MTHFR, niveles séricos de ácido fólico y de homocisteína con madres de niños con CC y madres de niños sanos?

5.-JUSTIFICACION:

En México las CC ocupan la segunda causa de muerte en niños menores de un año. Su etiología se considera multifactorial, entre las múltiples causas de su origen se encuentra la deficiencia de folatos y los polimorfismos genéticos. Entre ellos el polimorfismo 677CT del gen de la MTHFR que genera una disminución en el metabolismo de los folatos y por lo tanto deficiencia en la metilación de lípidos, proteínas, aminas e insuficiencia de ácidos nucleicos para la rápida división celular en el desarrollo embrionario, hiperhomocistinemiagenerando daño endotelial y aumentando su expresión con la deficiencia de folatos. La prevalencia del polimorfismo varía dependiendo de la población estudiada, se ha encontrado en población italiana (44-47%); en hispanos de Atlanta y California (41,1% y 42%) y en Francia y Japón (36% y 34%).

En población mexicana el polimorfismo del gen *MTHFR* (677CT) se presenta en el grupo étnico mestizo entre el 50% y el 58.5%, estudios de la población de Guadalajara reportan una frecuencia del 44% y en población de Tarahumaras del 34%. Las frecuencias genotípicas para el homocigoto *TT* han sido reportadas del 32-35.7%.

Hasta la fecha desconocemos cuál es la etiología de la CC y si la presencia de un genotipo 677TT en mujeres mexicanas tiene alguna participación en su desarrollo de ahí lo relevante de nuestra pregunta de investigación. No existe ningún estudio que analice la relación entre el polimorfismo C667T en mujeres con la presencia de CC (en donde existe un defecto de la septación auricular asociado a la conexión anormal de las venas pulmonares), en sus hijos, así como tampoco ningún otro que analice la asociación entre un genotipo 677TT de madres de niños con CC con sus niveles basales de homocisteína y de ácido fólico en suero en mujeres mexicanas.

En el Hospital Infantil de México Federico Gómez en el servicio de admisión 28.3% de las consultas de primera vez está representado por las malformaciones congénitas entre ellas las cardiopatías congénitas son la malformación más frecuente diagnosticada en la etapa de Lactante. Un porcentaje importante de estos pacientes provienen de las zonas con un nivel de pobreza alto de nuestro país entre ellos: Oaxaca, Guerrero, Puebla, por mencionar algunos, en donde la desnutrición materna e infantil representan uno de los problemas sociales y de salud más serios, que puede generar entre sus múltiples estados fisiopatológicos deficiencia de folatos y una elevación secundaria de homocisteína.

El reconocer esta asociación entre la presencia del polimorfismo 677CT *MTHFR*, niveles séricos de ácido fólico y de homocisteína en madres de niños con CC, nos permita identificar si existe deficiencia en la ingesta de ácido fólico periconcepcional, siendo más grave en presencia de polimorfismo condicionando deficiencia en la producción de grupos metilos. Si esta asociación se demuestra representa una posibilidad de intervención temprana en mujeres gestantes para disminuir la incidencia de CC a través de incidir en el aspecto nutricional para prevenir algunos de estos casos.

6.-HIPOTESIS

En las madres de los niños con CC es mayor la frecuencia del polimorfismo 677CT del gen *MTHFR*, con elevación de los niveles séricos de homocisteína y disminuyen los niveles séricos de ácido fólico comparados con las madres de los niños sanos sin cardiopatía congénita.

Para fines del cálculo del tamaño de la muestra la hipótesis se descompone en tres hipótesis:

- 1.- Las madres de los pacientes con CC tienen mayor frecuencia del polimorfismo 677CT del gen *MTHFR* que las madres de recién nacidos y lactantes sanos.
- 2.- Las madres de los pacientes con CC tienen niveles séricos de homocisteína más elevados que las madres de recién nacidos y lactantes sanos.
- 3.- Las madres de los pacientes con CC tienen niveles séricos de ácido fólico más bajos que las madres de recién nacidos y lactantes sanos.

7.-OBJETIVOS

5.1.-Objetivo General

Determinar la frecuencia del polimorfismo C677T del gen de la enzima *MTHFR*, los niveles séricos de homocisteína y de ácido fólico en madres de niños mexicanos con y sin CC.

5.2.-Objetivos específicos

- 1.- Determinar la frecuencia génica y alelica del polimorfismo 677CT del gen *MTHFR* de madres de
 Recién nacidos con CC.
- 2.- Determinar la frecuencia génica y alelica del polimorfismo 677CT del gen *MTHFR* de madres de
 Recién nacidos sano.
- 3.- Establecer si existen diferencias en la frecuencia del polimorfismo 677CT del gen *MTHFR* sano.
- 4.- Cuantificar los niveles séricos de homocisteína y de ácido fólico de madres de niños con CC.
- 5.-Cuantificar los niveles séricos de homocisteína y de ácido fólico de madres de recién nacidos sanos.
- 6.- Establecer si existen diferencias en los niveles séricos de homocisteína y de ácido fólico entre madres
 de niños con CC y madres de recién nacidos sanos.
- 7.- Establecer la asociación entre la presencia del polimorfismo 677CT del gen *MTHFR* con los niveles séricos de homocisteína y ácido fólico en madres de niños con CC y en madres de niños sanos.

8.-MATERIAL Y METODOS:

Diseño del estudio:

Se realizó un estudio observacional de casos y controles donde la población de estudio se encontró constituida por madres de hijos con y sin cardiopatía congénita. Los casos fueron captados en el HIM Federico Gómez y los controles en la CEM de la SEDENA. Los pacientes fueron incluidos a partir de las 4 horas de nacimiento y hasta los 18 meses. La edad de las madres osciló desde los 18 hasta los 40 años de edad. En el grupo de los casos fueron referidos al servicio de cardiología pediátrica del HIMFG. El grupo de controles fueron captados en el servicio de hospitalización y consulta externa de Neonatología de la CEM SEDENA.

Los casos sospechosos de CC se diagnosticaron radiografía de tórax, electrocardiograma y ecocardiograma. Para obtener las muestras del grupo control en la CEM SEDENA se identificó a las madres que acudieron para el nacimiento de su hijo y una vez confirmado que el producto era recién nacido sano, fueron invitadas a participar en el estudio, previa firma del consentimiento informado (Anexo 1).

Se extrajo una muestra de sangre periférica de 6 ml a la madre, la cual se colocó en dos tubos diferentes. En un tubo con EDTA se colocarán 3 ml de sangre y en otro tubo seco sin anticoagulante los 3 ml restantes para la obtención de suero. La sangre con anticoagulante se utilizó para el análisis de DNA y el suero se utilizó para la determinación de los niveles de homocisteína y ácido fólico.

Se revisó el expediente clínico de los pacientes con CC registrando: procedencia, tipo de conexión anómala, técnica quirúrgica empleada y evolución postquirúrgica. Durante el estudio se realizó una historia clínica donde se obtuvo información con respecto a la ingesta perinatal de ácido fólico por medio de prescripción o por toma de algún vitamínico o alimento suplementado. También se recabó información con respecto a la dieta durante los meses de la gestación, así como la ingesta de medicamentos, alcohol o tabaquismo que pueden influir en las variables de respuesta (niveles de ácido fólico y de homocisteína en sangre) (Anexo 2).

TAMAÑO DE LA MUESTRA:

$$n = \frac{\left[z_{1-\alpha/2} \sqrt{2p(1-p)} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

El tamaño de la muestra se calculó siguiendo la metodología para proporciones ; y tomando en cuenta la hipótesis alternativa unilateral; donde, la variable predictora es la presencia de CC en el hijo (dicotómica) y las variables resultado son:

Polimorfismo C677T del gen *MTHFR* (dicotómica), niveles elevados de homocisteína en sangre (dicotómica) y niveles bajos de ácido fólico en sangre (dicotómica).

Se asignaron los siguientes valores:

$$\alpha \text{ unilateral} = 0,05$$

$$\beta = 0,20 \text{ (} 1 - \beta = 0,8 \text{)}$$

$$Z_{1-\alpha/2} = 1,645$$

$$Z_{1-\beta} = 0,84$$

La magnitud del efecto para el polimorfismo se calculó con la información que se obtuvo de un trabajo previamente publicado en CC en general donde;

Para el polimorfismo:

$$P1 = .41$$

$$P2 = .24$$

$$\text{Magnitud del efecto} = p1 - p2 = .41 - .24 = .17$$

$$P = (P1 + P2) / 2 = .18$$

Siguiendo la fórmula:

37 pacientes a estudiar por grupo.

Para niveles elevados de homocisteína

$$P1 = .462$$

$$P2 = .143$$

$$P = .3025$$

Siguiendo la fórmula:

16 pacientes a estudiar por grupo.

Para niveles bajos de ácido fólico:

$$P1 = .5$$

$$P2 = .25$$

$$P = .375$$

Siguiendo la fórmula:

45 pacientes a estudiar por grupo.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Criterios de inclusión:

Casos: Madres de pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) con diagnóstico de CC que acepten participar en el estudio y firmen una carta de consentimiento informado.

Controles: Madres de recién nacidos sanos del Clínica de Especialidades de la Mujer SEDENA que acepten participar en el estudio y firmen una carta de consentimiento informado.

La edad de las madres fue entre 18 y 42 años, la edad de los recién nacido y lactantes fue a las 4 horas de vida y 18 meses de edad.

Criterios de exclusión:

- a) Madres de pacientes que no deseen participar en el estudio.
- b) Madres de niños con alguna otra enfermedad diferente a la CC.
- c) Madres de pacientes con CC y alguna otra cardiopatía congénita asociada (incluyendo heterotaxia visceral).
- d) Madres de pacientes con CC o de recién nacidos sanos que hayan sido transfundidas en los tres meses anteriores a la toma de la muestra.

OPERAZIONALIZACION DE VARIABLES:

Nombre y tipo de variable	Definición tipo de variable	Definición operacional	Escala de medición.
CARDIOPATIA CONGENITA.	.		Nominal dicotomica
POLIMORFISMO 677CT.MTHFR	Mutuación puntual gen 1-5% poblaci677		Nominal dicotomica
NIVELES DE HOMOCISTEINA			Ordinal Dicotomicas
NIVELES DE ACIDO FOLICO			Ordinal Dicotomicas

METODOLOGIA:**Toma de muestra:****Procesamiento de las muestras:**

Las muestras almacenadas en el laboratorio de CEM SEDENA se transportaron al laboratorio de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional cada semana en los refrigerantes para la determinación sérica de homocisteína y ácido fólico.

Se realizo el análisis por PCR y digestión por enzimas de restricción del polimorfismo 677CT del gen de la enzima MTHFR.

Para la determinación de homocisteína y ácido fólico se utilizo un equipo Immulite 2000.

Utilidad del análisis: Para su uso en el diagnóstico *in Vitro* con los analizadores INMULITE e INMULITE 2000 para la determinación cuantitativa de la L-homocisteína humana y ácido fólico en plasma o suero.

Metodología de la prueba (Immulite 2000)

La homocisteína es un aminoácido que contiene un grupo tiol, producto de la desmetilación intracelular de la metionina, Por tanto, la homocisteína sirve como pool que más tarde puede ser utilizado en la regeneración de la metionina, a través de la acción de la enzima metionina sintasa folato dependiente. La homocisteína se localiza en plasma principalmente unida a proteínas, pero también puede estar presentes las formas libres, oxidadas o disulfuro.

El análisis consiste en un Inmunoensayo competitivo. INMULITE/INMULITE 1000-2000 requiere un pre-tratamiento manual preliminar de la muestra. La homocisteína presente en el plasma o suero del paciente es liberada de sus proteínas de unión y convertida en S-adenosilhomocisteína (SAH) durante una incubación de 30 minutos a 37⁰C en presencia de la S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa y ditioniol (DTT).

La muestra tratada y anticuerpos antiSAH marcados con fosfatasa alcalina son introducidos simultáneamente en la unidad de reacción que contiene una esfera de poliestireno recubierta con SAH. Durante 30 minutos de incubación, la SAH obtenida a partir de la muestra pretratada del paciente compite con la SAH inmovilizada por la unión al anticuerpo anti-SAH unido a fosfatasa alcalina.

El conjugado enzimático no unido es eliminado mediante un lavado por centrifugación. El substrato es añadido y el proceso continúa como el resto de los inmunoensayos. Se realiza solo un ciclo de incubación por 30 minutos. Se utilizó una ultracentrífuga para aclarar las muestras lipémicas. Las muestras hemolizadas podrían indicar una mala manipulación de la muestra antes de ser recibida por el laboratorio; en este caso los resultados deben interpretarse con precaución.

Plasma heparinizado y EDTA son las muestras de elección, pero el suero también puede ser utilizado. Es importante separar el plasma o suero de las células lo antes posible después de la recogida de la muestra, debido a que la síntesis de HCY puede tener lugar en los eritrocitos después de la toma de la muestra.

Volumen requerido – muestra no tratada: 0.5 ml de suero.

Conservación de las muestras: Hasta 14 días a 2-8⁰ C o hasta 6 meses a -20⁰C.

Los resultados se expresan en umol/L, la sensibilidad es de 0.5umol/L, el ensayo es altamente específico para homocisteína.

Niveles de homocisteína y ácido fólico

La muestra de sangre de 3 ml. colocada en un tubo seco, se centrifugo para separar plasma, el plasma se colocará en tubos ependorff de 2 ml sellados y se conservaron a -20⁰C por un máximo de tres semanas antes de su traslado al laboratorio de estudios especiales del Instituto Nacional de Perinatología donde se realizará la determinación de los niveles séricos de homocisteína y ácido fólico. El análisis bioquímico se realizó en un equipo Immulite. Este equipo determina los niveles de ambas sustancias por inmunoensayo por electro quimioluminiscencia. Es un método completamente automatizado que permite una cuantificación rápida, fiable y exactamente.

ANÁLISIS MOLECULAR:

Extracción de DNA genómico

La muestra de sangre de 3ml, colocada en un tubo con anticoagulante EDTA se utilizo para la extracción de DNA genómico utilizando el kit de Pure-gene con la técnica realizada y publicada por Frostt y col.

Análisis del polimorfismo C677T: Se realizo el análisis por PCR y digestión por enzimas de restricción del polimorfismo 677CT del gen de la enzima MTHFR

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizo PCR de Secuencia de oligonucleótidos del gen MTHFR:

5' TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA 3'

5' GGT GAG AGT GGC GTG GCA GGA 3'

E El tamaño esperado del fragmento de 198pb, la substitución de una citosina por una timina crea un sitio de restricción para la enzima *HinfI* que digiere el fragmento obteniendo fragmentos de 175pb y 23pb.

Ambos fragmentos fueron analizados en gel de agarosa al 4% por electroforesis. La determinación del polimorfismo 677CT para el gen MTHFR se realizo en el laboratorio de Genética del Hospital de Pediatría del Centro Médico Siglo XXI IMSS.

Plan de análisis

Los hallazgos moleculares serán reportados como:

Polimorfismo: Cuando exista algún cambio en la secuencia con respecto a la reportada en el GenBank pero que no modifica la traducción de la proteína en el aminoácido de interés, que se encuentre en el 5% de la población general o en los controles

Frecuencias alelicas: Frecuencia del alelo C y T en la población de estudio y control.

Homocigoto: Cuando en ambos alelos se demuestre el cambio de una base C por T.

Heterocigoto: Cuando en uno de los alelos se demuestre el cambio de una base C por T.

Se comparo la frecuencia del polimorfismo C677T del gen MTHFR entre madres de niños con CC y madres de recién nacidos sano.

Se comparo los niveles séricos de homocisteína entre madres de niños con CC y madres de recién nacidos sanos.

Se comparo los niveles séricos de ácido fólico entre madres de niños con CC y madres de recién nacidos sanos.

Limitaciones del estudio

El presente estudio es un estudio de asociación no permitirá establecer las causas de la CC

Consideraciones éticas

El presente protocolo de investigación es de riesgo mínimo. Incluyo la revisión del expediente clínico y la extracción de 6 ml de sangre periférica. Se explico claramente a la naturaleza del estudio y solo se incluyo a las madres de niños con CC y controles que aceptaron participar en el estudio y firmaron una carta de consentimiento informado.

Consideraciones de bioseguridad

Se incluyen los formatos de bioseguridad debidamente llenados y aceptados por el comité de bioseguridad, bioética e investigación del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Para el presente proyecto de investigación se realizó una punción de una vena periférica en la sala de cardiología del Hospital Infantil de México Federico Gómez y en CEM e la SEDENA. Se obtuvieron 6 ml de sangre periférica. El material de desecho se trato con cloración y depósito en los contenedores apropiados y se puso a disposición de CRETI para su desecho definitivo.

ANALISIS ESTADISTICO:

- Tabla de 2 por 2.
- X² frecuencias genotípicas alelicas y asociación con la frecuencia del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* entre madres de niños con CC y madres de recién nacidos sanos.
- T student niveles de homocisteína y ac fólico.
- Se compararon los niveles séricos de homocisteína entre madres de niños con CC y madres de recién nacidos sanos.
- Se compararon los niveles séricos de ácido fólico entre madres de niños con CC y madres de recién nacidos sanos.

7.-RESULTADOS:

Se captaron casos con 31 pacientes y el grupo control con 62 individuos, previa firma de consentimiento informado. El grupo de casos se seleccionados entre las madres de recién nacidos y lactantes con diagnostico de Cardiopatía congénita que acudieron a consulta o estuvieron hospitalizados en el servicio de Cardiología Pediátrica del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Los controles fueron las madres de recién nacidos y lactantes sanos que acudieron al servicio de Ginecología y Neonatología de la Clínica de Especialidades de la Mujer de la SEDENA.

Especímenes: La extracción de 6 ml de sangre se separo en dos tubos uno seco y otro tubo con anticoagulante (EDTA tripotásico) y con sistema de vacío. Se centrifugaron para obtención del plasma y fueron almacenadas en refrigeradores de 4 y -20 C. La recolección y el almacenamiento de las muestras se llevaron a cabo de la misma forma en los casos y controles. Cada muestra fue etiquetada con un número y nombre el pacientes que coincidieran con la lista de control y cotejo de las mismas.

Las características demográficas de la población de estudio se resumen en la tabla .
La edad promedio entre las madres de los casos fue de 24.93 (DE±6.9) y 25.8 (DE ±5.8) entre los controles.Predomino el sexo masculino entre los hijos de ambos grupos, 87.5% tuvo control prenatal de los controles y la ingesta de acido fólico en forma temprana (antes de la semana 6) fue temprana en un 29.04%% en los casos y 64.28% en los controles.

Tabla 3. Características demográficas de la población.

VARIABLE	CASOS	CONTROLES
EDAD MATERNA	24.93(DE± 6.9)	25.8(DE±5.8)
MASCULINO	51.6%	54.6%
FEMENINO	48.5%	45.5%
CONTROL PRENATAL	9.7%	90.34%
INGESTA DE ACIDO FOLICO	87.9%	90.34%
<u>ETAPA DE INGESTA</u>		
PRENATAL	16.12%	19.64%
TEMPRANO	12.92%	44.64%
TARDIO	70.96%	35.72%

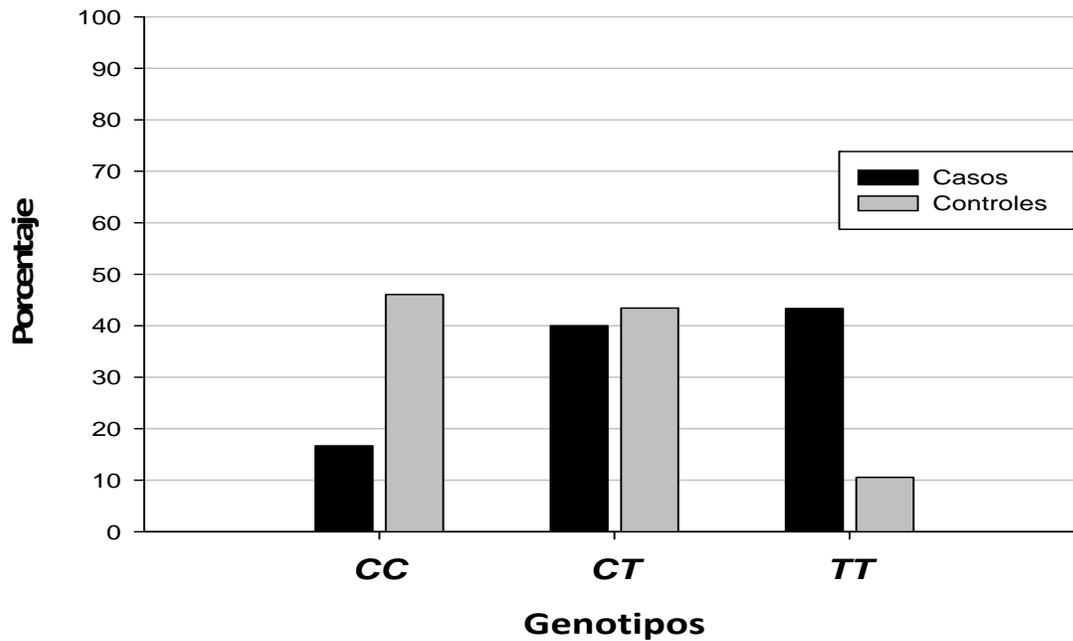
En los casos la cardiopatía congénita más frecuente fue Conexión anómala total de venas pulmonares con un 45.16%, seguida de la transposición de grandes vasos, la comunicación interventricular amplia y la coartación aortica con comunicación intraventricular.

Tabla 4. Tipo de Cardiopatías congénitas.

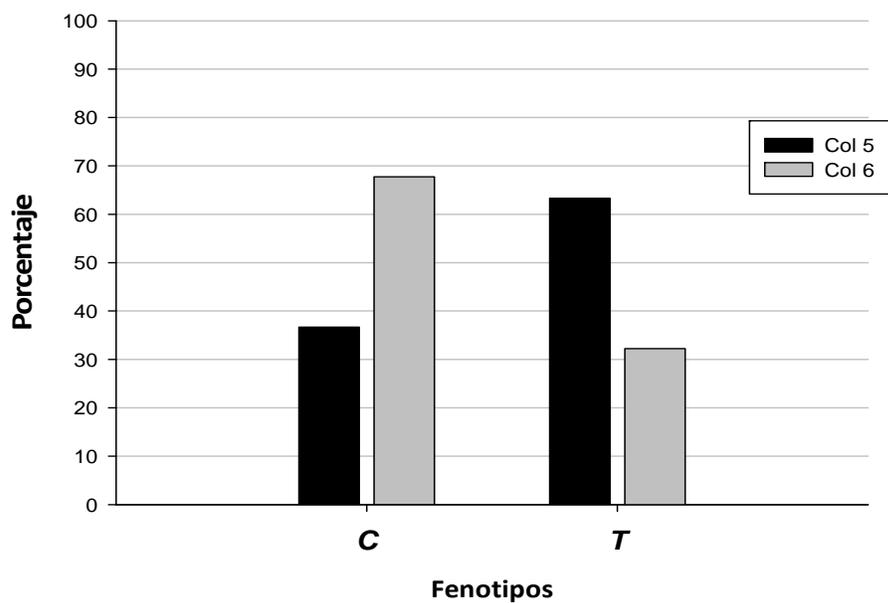
Tipo de Cardiopatía	N.	%
Conexión anómala total de venas pulmonares	14	45.16
Transposición de grandes vasos	3	9.67
Atresia pulmonar + CIV	2	6.45
CIV amplia.	2	6.45
Coartación aortica + CIV.	2	6.45
Atresia pulmonar	1	3.23
Anomalia de Epstein	1	3.23
Atresia tricuspidea	1	3.23
CIV + atresia tricuspidea	1	3.23
Coartación aortica	1	3.23
Doble salida de ventrículo derecho	1	3.23

En la Gráfica no.1 se representan las frecuencias relativas de los genotipos obtenidos del polimorfismo 677CT en función de los grupos estudiados. Se observó una frecuencia mayor de Homocigotos TT en los casos que en los controles con diferencia significativa ($p < 0.003$)

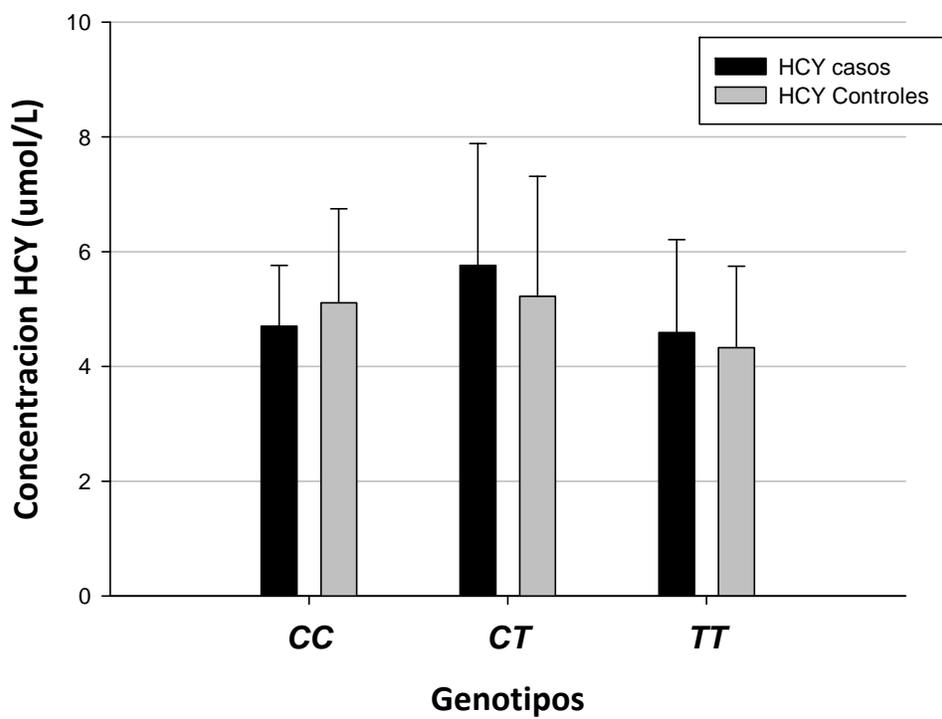
Frecuencias Genotípicas



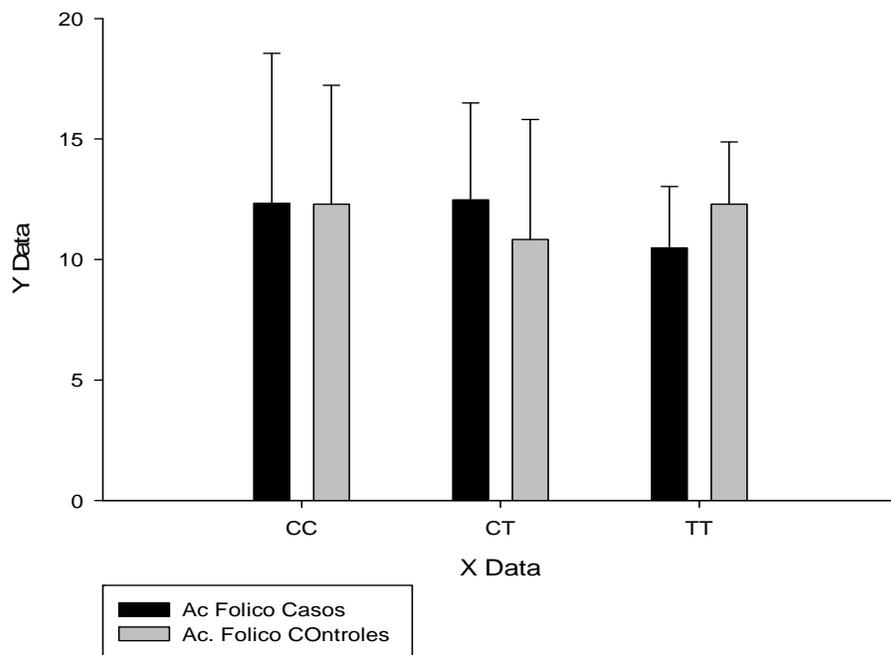
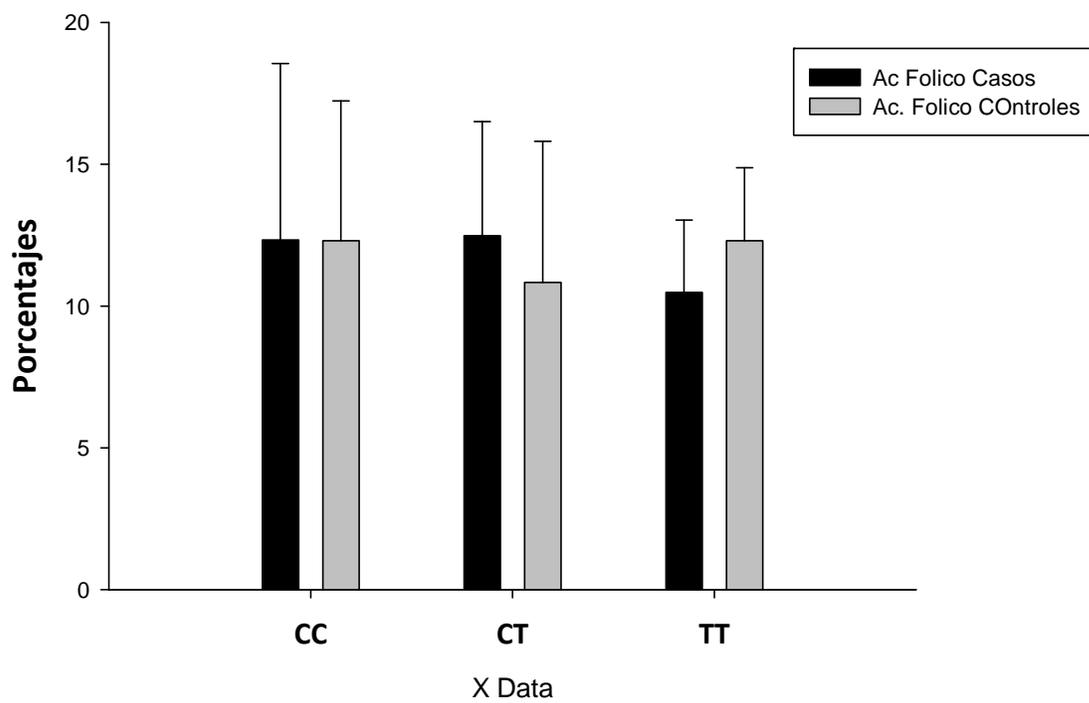
Frecuencias Fenotípicas

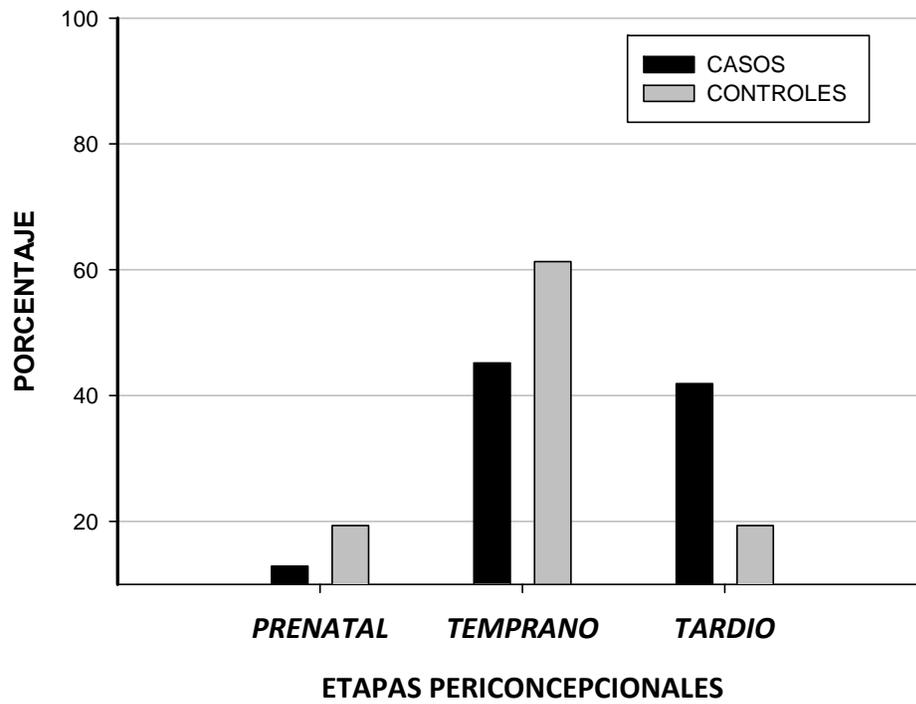


Homocisteína



2D Graph 1

**Acido fólico**

ETAPA INGESTA ACIDO FOLICO

9.-CONCLUSIONES:

En los estudios epidemiológicos actuales se aprecia que las CC constituyen una de las causas de muerte más frecuentes en niños tanto en México como en otros países, esto es en principio debido a que al conseguirse exitosamente el control y manejo de algunas enfermedades infecciosas, queden dichas patologías como causa principal de mortalidad infantil.

El tratamiento de las CC, es costoso, tanto para los sistemas institucionales de salud, como para la familia e implica infraestructura médica de alta tecnología que no es siempre accesible para todos los estratos socioeconómicos. Esta situación expone la trascendencia que tiene el proveer un adecuado conocimiento de estas patologías desde establecer su etiología hasta considerar las diferentes opciones de tratamiento, pero sobre todo, en busca de posibles métodos de prevención primaria.

La heterogeneidad genética asociada a las CC así como el efecto aditivo de su asociación con patrones de herencia multifactorial, en la mayoría de los casos de CC aisladas, subrayan la necesidad de dilucidar y comprender el mecanismo de acción tanto los factores ambientales (teratógeno) como de los genéticos que pudieran estar involucrados en la causalidad de las mismas, teniendo estos aspectos importantes implicaciones en el asesoramiento genético relacionado con estas enfermedades.

Existen múltiples estudios realizados en diferentes países para establecer la relación entre las CC, la ingesta de ácido fólico, el genotipo *T/T* y la hiperhomocistinemia, que apoyan la suposición de que la hiperhomocistinemia ya sea por deficiencia en la ingesta de folatos o por un metabolismo inadecuado mediado por una MTHFR de menor actividad pueden ser origen de una falla en la organogénesis cardíaca en etapas tempranas del desarrollo embrionario, esto sería por el mantenimiento inadecuado de la vía de la metionina-homocisteína, lo cual provocaría alteraciones en los diversos mecanismos celulares como metilación, síntesis de bases nitrogenadas, apoptosis, etc.

Esta investigación se calculo el tamaño de la muestra en base a la frecuencia del polimorfismo en población mexicana que ya ha sido establecida en diferentes estudios; la cual fue de 61 pacientes con CC.

No se llevo al tamaño de muestra calculado debido a dificultades en encontrar pacientes que llenaran los criterios de inclusión, posiblemente es debido porque el hospital donde se realizo la captación es de concentración y en los casos más graves y complicados son los

que se atienden; esto es que una CC aislada son menos frecuentes que las asociadas a síndromes en hospitales de tercer nivel, además muchos de los casos hospitalizados aún correspondiendo a CC únicas por su gravedad fue imposible tomar muestra de sangre para el análisis (sepsis, transfusiones, inaccesibilidad a venopunción). A pesar de que la muestra no completo el numero que previamente se había calculado la consideramos representativa y suficiente, puesto que mostró concordancia con lo ya reportado en cuanto a frecuencias alélicas en nuestra población.

El lugar de origen de nuestros pacientes con CC fue muy diverso debido porque fueron captados en un hospital de concentración, sin embargo, a pesar de esto mostraron una homogeneidad en las frecuencias alélicas y genotípicas comparado con los controles que eran originarios de la Ciudad de México y del Estado de México, esto sugiere que las frecuencias son homogéneas de acuerdo con las poblaciones estudiadas por Davalos, et al., en el Noroccidente, Mutchinick, et al., en el centro y por Gonzales-Herrera, et al., en el sureste de la Republica Mexicana.

No fue posible indagar la ingesta de ácido fólico en madres de controles durante el embarazo. Sin embargo el promedio de edad de los controles es de 20 años y en la época en que ocurrieron la mayoría de los embarazos apenas despuntaba el conocimiento del papel de la ingesta materna del ácido fólico en la génesis y prevención de los defectos de tubo neural.

Los niveles de homocisteína encontrados en pacientes con CC ($p=0.06$) sugieren que puede existir una relación entre esta y el padecimiento. Es de relevancia observar que en las madres de los pacientes los niveles de homocisteína se encuentran dentro de valores normales y no se asocia con el genotipo; si consideramos que la madre es un control del ambiental en relación a la dieta familiar, la hiperhomocisteinemia encontrada en los pacientes es posible que no este relacionada con una deficiente dieta en ácido fólico y pudiera existir otro tipo de factor no alimenticio ni tampoco no relacionado con el genotipo T/T o relacionada con otro tipo de factores, su CC o su información genómica que interrelaciona con la vía metabólica de la homocisteína, esto apoyado al observar que se presenta hiperhomocisteinemia en etapas de la infancia con una edad media de 5 años en nuestros paciente y que fue posible cuantificar.

Con los datos obtenidos por anamnesis no es factible concluir una relación causa efecto entre la ausencia de ácido fólico y la presencia de la CC por que no contamos con controles del mismo grupo etareo; el apareamiento por grupo etareo en el análisis de la ingesta materna de ácido fólico es muy importante debido a que hay fluctuaciones en los criterios médicos para indicar ácido fólico pregestacional y gestacional y estos criterios se han modificado a través de los años con mucha rapidez.

Las frecuencias alélicas para el alelo *T* y *C* en el grupo de pacientes con CC ($C=45.8\%$, $T=54.2\%$), en madres de pacientes con CC ($C=45\%$, $T=55\%$) se encuentran dentro de lo ya reportado en nuestra población mexicana como ya lo hemos mencionado con anterioridad en esta misma discusión. Así como en controles ($C=51.6\%$, $T=48.4\%$) y madres de los controles ($C=50.8\%$, $T=49.2\%$). Se encontraron diferencias significativas entre los grupos analizados, que permite establecer una asociación entre el entre el genotipo *T/T* y las CC., ya sea en pacientes o madres de los pacientes comparado con el grupo control y sus madres. Esto es posible que sea debido al tamaño de la muestra, ya que si el efecto negativo del genotipo *T/T* y la deficiencia de ácido fólico es reducido con lo que es necesaria una muestra de las dimensiones del presente estudio difícilmente se podría comprobar. Con mayor importancia tenemos que recalcar que la diferencia entre las diferencias alélicas *C* o *T*.

El análisis de las frecuencias genotípicas *C/C*, *C/T*, *T/T* entre los grupos de pacientes con CC y los controles, así como las frecuencias genotípicas de las madres de los sujetos de ambos grupos no mostraron diferencias significativas con $p>0.05$. Por lo que, no se puede asociar ningún genotipo a la CC.

Se incluyeron pacientes con CC de diferentes tipos, por lo que nuestro grupo es muy heterogéneo de la embriopatía cardíaca ya que implican diferentes defectos y etapas del desarrollo cardíaco así como la presencia de eventos celulares. Esto hace más compleja la interpretación de los resultados y permite sostener una vez más el origen multifactorial de las CC.

Si hay una asociación entre el genotipo *T/T* de la enzima MTHFR y las CC esta debe de ser una asociación débil que para comprobarla se requiere un tamaño de muestra mayor para detectarse.

11. Conclusiones

- 1.- En el presente estudio la hipótesis es validada ya que se encontró diferencia significativa entre el genotipo *T/T* y la presencia de CC.
- 2.-Existe tendencia a presentar niveles de homocisteína elevados en los niños con CC y genotipo *T/T* vs. genotipo *C/C*.
- 3.- Establecer programas de prevención materna con suplementación de ácido fólico preconcepcional en población general y en madres con antecedente de un hijo con CC.

11.-BIBLIOGRAFIA.

1. Blanco Barbeito K, Blanco Barbeito N. Propuesta de una estrategia preventiva preconcepcional de asesoramiento genético para las cardiopatías congénitas. Villa Clara; 2006. Disponible en: Nora Fernández L. Malformaciones congénitas cardiovasculares en el municipio Cerro en el período 2001 al 2004.La Habana;2005. 2.-Hernández de Alba C. Guía Práctica en Diagnóstico Prenatal. La Habana;2005.Disponible en: <http://www.encolombia.com/>. [Consultado 4 Abr 2006]
2. Ávila RE, Somar ME. El embrión como paciente. En: Ávila RE, Somar ME, Ferraris RV. El embrión como persona y paciente. Córdoba-Argentina;2006. p.115
3. Saddler TW.Embriología Médica con orientación clínica. 8va ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2005.
4. Herrera López GD, Blanco Balveito K. Cardiopatías. Villa Clara, Cuba;2006.Disponible en: <http://temas-estudio.com/trabajos-tesis-monografias-resumenes/es/node/60> Consulta 22/6/2008
5. The 19th meeting of European Network of Teratology Information Services [homepage on the internet]. Edinburgh, Scotland; 2008. Disponible en: Consulta el 23/7/2008
6. Taboada Lugo N.Comportamiento de algunos factores de riesgo para malformaciones congénitas mayores en el municipio de Ranchuelo. Rev Elect Inf. [serie en internet] [publicada el 2 de enero 2007]. Centro Provincial de Genética Médica Villa Clara. Disponible en: <http://www.revistaciencias.com/publicaciones>
7. Rossenquist JH, Ratashak SA. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: Effect of folic acid. Proc Nat.2004; 93: 15227-32.
8. Peña Zacca E. Prevención de las enfermedades y otros daños a la salud. En:Toledo Curbelo GL. Fundamentos de Salud Pública. La Habana: Ciencias Médicas; 2005. p. 541-6.
9. Equipo Médico de Babysitio . Prevención de defectos congénitos;2006. Disponible en: Moreno F. Epidemiología de las Cardiopatías Congénitas. Hospital Universitario La Paz; 2004. Disponible en: 1. - Hoffman JIE, Incidence of congenital Heart Disease: II. Prenatal Incidence, Pediatr Cardiol 1995, 15:155-165.
- 11.- Mitchell SC, Korones SB Berendes HW, Congenital Herat Disease in 56,109 Births incidence and Natural History, Circulation 1971, XLIII: 323-332.

12. - Hoffman JIE, Chistianson R, Congenital Heart Disease in a Cohort of 19,502 Births With Long-Term Follow-Up, *Am J Cardiol*, 1978, 42: 641-647.
13. - Ferencz C, Rubin JD, McCarter RJ, Brenner JI, Neill CA, Perry LW, Herpner SI, Downing JW, CONGENITAL HEART DISEASE: PREVALENCE AT LIVEBIRTH, *Am J Epidemiol* 1985, 121(1): 31-36.
14. - Loffredo CA, Epidemiology of Cardiovascular Malformations: Prevalence and Risk Factors, *Am J Med Genet* 2000, 97:319-325.
- 15.- Dirección General de Información en Salud, Secretaria de Salud, Mortalidad preescolar, *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 2005, 62(1):69-82.
16. - Johnson MC, Hing A, Wood MK, Watson MS, Chromosome Abnormalities in Congenital Heart Disease, *Am J Med Genet* 1997, 70: 292-298.
17. - Ferencz C, Neill CA., Boughman JA., Rubin JD, Brenner JI, Perry LW, Congenital cardiovascular malformations associated with chromosome abnormalities: An epidemiologic study, *J Pediatr*, 1989, 114:79-86.
18. - Frosst P, Blom H., Milos R, Identification of a candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, *Nat Genet* 1995, 10:111-113.
- 19.- Nussbaum RL., Mc Inees RR, Willard HF Thompson & Thompson Genetics in Medicine, 6th ed., Ed.Saunders, 2001:304-310.
- 20.- Relton CL, Wilding CS, Pearce MS Laffing AJ, Jonas PA, Lynch SA, Tawn EJ, Burn J, Gene-gene interaction in folate-related genes and risk of neural tube defects in a UK population, *J. Med. Genet.* 2004, 41:256-260.
21. - Boyles AL, Hammock P, Speer MC, Candidate Gene Analysis in Human Neural Tube Defects. *Am J Med Genet (Semin Med Genet)* 2005, 135C:9-23
- 22.- Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R, Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification, *Nat Genet* 1994, 7:195-200.
- 23.- Guéant-Rodriguez RM, Guéant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP, Namour F, Chabi NW, Sanni A, Anello G, Bosco P, Romano C, Amouzou E, Arrieta HR, Sánchez BE, Romano A, Herbeth B, Guillard JC, Mutchinick OM, Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 6777T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations, *Am J Clin Nutr*, 2006, 83: 701-707.

- 24.- Botto L.D, 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies. *AhuGE Review, Am J Epidemiol*, 2000, 151(9):862-877.
- 25.- Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, Stoll C, Alembik Y, Dott B, Czeizel AE, Gelman-Kohan Z, Scarano G, Bianca S, Ettore G, Tenconi R, Bellato S, Scala I, Mutchinick OM, Lopez MA, de Walle H, Hofstra R, Joutchenko L, Kavteladze L, Bermejo E, Martinez-Frias ML, Gallagher M, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, Andria G, Botto LD, Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide, *J Med Genet*. 2003 Aug; 40 (8):619-25.
- 26.- www.ncbi.nlm.nih.gov
- 27.- Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R, Congenital heart defects and maternal derangement of homocysteine metabolism, *Mol Genet Metab*, 1998, 64(3): 169-172.
- 28.- Scriver CR, Beaudet AL, William SS, Valle D, *The Metabolic & Molecular Bases Inherited Disease*, eighth edition, McGraw-Hill, 2001, pp 3897-3933.
- 29.- Davalos R I P, Olivares P, Castillo MT, Cantú JM, Ibarra B, Moran MC, Gallegos MP, Chakraborty R, Rivas F, The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Ann Genet* 2002, 43: 89-92.
- 30.- Mutchinick OM, López MA, Luna L., Waxman J, Babinsky VE, RYVEMCE collaborative Group., High Prevalence of the Thermolabile Metylenetetrahydrofolate Reductase Variant in México: A Country with a Very High Prevalence of Neural Tube Defects, *Mol Genet Metab*, 1999, 68: 461-467.
- 31.- González-Herrera L, García-Escalante G, Castillo-Zapata I, Canto-Herrera J, Pinto-Escalante D, Díaz-Rubio F, Del Ángel RM, Orozco-Orozco L, Frequency of thermolabile variant defects in the State of Yucatan, México. *Clin Genet* 2002, 62:394-398.
- 32.- Botto LD, Khoury MJ, Mulinare J, Erickson JD, Periconceptional Multivitamin Use and the Occurrence of Conotruncal Heart Defects: Results From a Population-based, Case-Control Study, *Pediatrics* 1996, 98:911-917.
- 33.- Junker R, Kotthoff S, heintich V, Halimeh S, Kosch A., Koch HG, Kassenböhmer R, Heineking B, Nowak-Göttl U, Infant methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype is a risk factor for congenital heart disease , *Cardiovasc Res* 2001, 51: 251-254.
- 34.- Wenstrom KD, Johanning GL., Johnston KE, Dubard M, Association of the C677T

methylenetetrahydrofolate reductase mutation and elevated homocysteine levels with congenital cardiac malformations. *Am J Obstet Gynecol*, 2001, 184(5):806-817.

35.- Kapusta L, Haagmans MLM, Steegers EAP, Cuypers MHM, Blom HJ, Eskes TKAB, Congenital heart defects and maternal derangement of metabolism, 1999, *J Pediatr*, 135:773-774.

36.- Verkleij-Hagoort AC, Verlinde M, Ursem, Lindemans J, Helbing WA, Ottenkamp J, Siebel FMH, Gittenberger-de Groot, de Jonge R, Bartelings MM, Steegers EAP, Steegers-Theunissen RPM, Maternal Hyperhomocysteinemia is a risk factor for congenital heart disease. *BJOG*, 2006, 113:1412-1418.

37.- Rosenquist TH, Tatashak S A, Selhub J, Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: Effect of folic acid, *Proc Natl Acad Sci*. 1996, 93:1527-15232.

38.- Rosenquist TH, Schneider AM, Monaghan DT, N-methyl-D-aspartate receptor agonists modulate homocysteine-induced developmental abnormalities, *FASEB J* 1999, 13: 1523-1531.

39.- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH, Heteromeric NMDA Receptors: Molecular and Functional Distinction of Subtypes, *Science* 1992, 256: 1217-1221.

40.- Goodman & Guillian A, Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 10 edición, Ed. Mc Graw Hill, Interamericana, S.A. de C.V., 2003

41.- Komuro H, Rakic P, Modulation of Neural Migration by NMDA Receptors, *Science*, 1993, 260: 95-97.

42. Andoloro VJ, Monaghan DT, Rosenquist TH, Dextromethorphan and Other N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonists Are Teratogenic in the Avian Embryo Model, *Pediatr Res* 1998, 43(1): 1-7.

12.-ANEXOS 1:**DEPARTAMENTO DE NEONATOLOGIA.
CLINICA DE ESPECIALIDADES DE LA MUJER.
SECRETARIA DE LA DEFENSA NACIONAL.****Carta de consentimiento para participar en el protocolo de investigación titulado:**

Búsqueda del polimorfismo 677CT del gen de la metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en madres de niños mexicanos con conexión anómala total de venas pulmonares (CATVP) y la asociación con niveles séricos de homocisteína y de ácido fólico en las madres de hijos con enfermedad cardíaca y comparación con madres de hijos sanos.

Estimada madre del paciente: _____

Por medio de esta carta, la invitamos a participar en este estudio, el cual es una investigación que pretende conocer y entender mejor porque se presentan enfermedades del corazón en hijos de madres mexicanas y si usted puede tener o no un hijo que presente una enfermedad del corazón; es decir, estudia si usted puede tener herencia para malformaciones del corazón y poder pasarlo a las siguientes generaciones. Esta investigación nos proporcionara conocimientos que ayuden a usted y otras personas en un futuro.

Su participación en esta investigación es totalmente voluntario y gratuito, usted tiene total libertad, para decidir no participar en el estudio sin que esto afecte al tratamiento médico, al que tiene derecho su hijo (a).

Si usted está de acuerdo en participar, se le tomara una muestra de sangre de 6 mililitros, estudiaremos sus células que cuentan con sus genes (material que contiene la información para nuestro desarrollo que es heredable a nuestros hijos). Se le entregaran los resultados en aproximadamente 6 meses y en caso de encontrarse alguna alteración se le citará para consulta por el servicio de Genética. Además, se medirán en sangre las cantidades de ácido fólico y una sustancia llamada homocisteína, que cuando están alterados pueden aumentar el riesgo de que nazca un niño con problemas en su corazón. En base a los resultados, de este estudio podrá realizarse como propuesta el mejorar la suplementación de vitaminas en el embarazo.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO:

1.- Con una jeringa desechable se le tomará a Usted con una sola punción, dos muestra de sangre de la vena del brazo, aproximadamente de 3ml cada una. Se enviara a laboratorio para su procesamiento y análisis. Los resultados son confidenciales y solo le serán entregados y notificados a usted en forma personal por la DRA PENELOPE NORIEGA ZAPATA Pediatra Neonatologa de este servicio.

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

Si surgiera algún problema o tuviese usted una pregunta con respecto a este estudio, a sus derechos como participante en la investigación o a cualquier lesión relacionada con la investigación, deberá usted comunicarse con los investigadores participantes del departamento de Neonatología de la Clínica de Especialidades de la Mujer al teléfono 53 873384 y 3385 con la Dra. Jacqueline Gómez López o Dra.

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

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

Mexico,D. F. a _____ de _____ del 2010.

SI AUTORIZO.

NO AUTORIZO.

NOMBRE Y FIRMA.

TESTIGOS.

NOMBRE Y FIRMA.

NOMBRE Y FIRMA.

ANEXO.2

HISTORIA CLINICA No. _____

**“ASOCIACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO C677T DEL GEN *MTHFR*,
FOLATOS Y HOMOCISTEINA CARDIOPATÍAS COMPLEJAS CONGÉNITAS
 AISLADAS”**

NOMBRE: _____ FECHA: _____

MATRICULA: _____ EDAD: _____

DOMICILIO: _____

TELEFONO: _____ UNIDAD: _____

PESO: _____ PRECONCEP: _____ TALLA: _____

PRECONCEP: _____ PESO FINAL: _____

ANTECEDENTES HEREDO-FAMILIARES _____

ANTECEDENTES PERINATALES: Evolución y complicaciones del embarazo

ANTECEDENTES GO: G _____ P _____ A _____ C _____

INGESTA DE MULTIVITAMINICOS Y/O ACIDO FOLICO: Si ___ NO ___ .

Tipo: _____ Dosis: _____

Etapa del embarazo en la que se ingirió: Prenatal SI ___ NO ___ durante la gestación

SI ___ NO ___ Postnatal SI ___ NO ___ OBSERVACIONES _____

Ingesta de Alcohol SI___ NO___ Especificar cantidad y tiempo de _____ gestación _____	Infecciones perinatales: Luética SI___ NO___ ?___ Toxoplas.SI___ NO___ ?___ Rubéola SI___ NO___ ?___, Citomegal.SI___ NO___ ¿___ Herpes SI___ NO___ ?___	Ingesta de medicamentos Litio SI___ NO___ ?___ Talidomida SI___ NO___ ?___ Anticonvulsivantes SI___ NO___ Cual: _____, Otros SI___ NO___ ?___ especifique _____ tiempo de gestación _____
--	--	--

DATOS DEL CASO INDICE AL NACIMIENTO:

Apgar	Silverman	Maniobras de resucitación SI() NO().	
Características de la placenta			
CAPURRO O BALLARD:			
OTRAS COMPLICACIONES;	Sufrimiento fetal SI () NO ().	RPM SI() NO().	
	Líquido amniótico meconial SI () NO().	FECHA DE NACIMIENTO:	
Talla	Peso	Perímetro cefálico	Perímetro torácico

ANTECEDENTES PERSONALES PATOLOGICOS:**EXPLORACIÓN FÍSICA:**

Anomalías congénitas no cardíacas

SI () NO ()

Otros:

NIVELES DE HOMOCISTEÍNA EN PLASMA: _____

POLIMORFISMO PARA LA MTHFR: C677T _____

NIVELES DE FOLATOS: _____

