

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA – León**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**  
**MAESTRÍA DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS Y BIOLOGÍA CELULAR**



**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MASTER EN CIENCIAS MORFOLÓGICAS Y  
BIOLOGIA CELULAR.**

**TEMA:** Polimorfismo C677T del gen enzima 5,10-Metiltetrahidrofolato reductasa en los estudiantes de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León

**Autoras:**

**María José Moreira-Espinoza**

Master en Educación Superior en Salud - Bioanalista Clínico

**Yondra Carolina Vanegas-Padilla**

Cirujano Dentista

**Ana Yoe Cheng Chang Chan**

Master en Educación Superior en Salud - Médico y Cirujano

**Tutoras:**

**MSc. Edel María Paredes**

Profesor Titular

Departamento de Ciencias Morfológicas

Facultad de Ciencias Médicas

UNAN León

**Dr. Lizbeth Salazar-Sánchez, Ph.D.**

Profesora Catedrática/Profesor

Directora Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA)

Directora del Programa de Posgrado en Ciencias Medicas

Universidad de Costa Rica

**Diciembre, 2013**



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA –León  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
MAESTRÍA DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS Y BIOLOGÍA CELULAR



## INDICE

<b>Resumen</b>	
<b>Glosario</b>	
<b><i>Agradecimiento</i></b>	
<b><i>Dedicatoria</i></b>	
<b>Introducción</b>	1
<b>Antecedentes</b>	3
<b>Justificación</b>	7
<b>Planteamiento del Problema</b>	8
<b>Hipótesis</b>	8
<b>Objetivos</b>	9
<b>Marco Teórico</b>	10
<b>Diseño Metodológico</b>	23
<b>Resultados</b>	30
<b>Discusión</b>	33
<b>Conclusiones</b>	36
<b>Recomendaciones</b>	37
<b>Bibliografía</b>	38
<b>Anexos</b>	
<i>Gráficos</i>	48
<i>Consentimiento informado</i>	50
<i>Instrumento de recolección de datos</i>	53
<i>Aprobación del comité de ética</i>	54
Hoja de entrega de Resultados	55
<i>Resumen del III Congreso CADAN:R 2012</i>	56
Publicación de artículo científico	57



## **Polimorfismo C677T del gen enzima 5,10-Metiltetrahidrofolato reductasa en los estudiantes de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León**

Moreira–Espinoza, M. J.\*; Vanegas-Padilla, Y. C. \*; Chang- Chan A YCh\*, Paredes, E.\*; Sánchez-Salazar, L\*\*.

\*Departamento de Ciencias Morfológicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León. (UNAN-León). León, Nicaragua

\*\* Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA), Facultad de Medicina, Universidad de Costa Rica. (UCR) San José, Costa Rica

### **RESUMEN**

Este es el primer estudio de prevalencia del polimorfismo de C677T del gen de la enzima (MTHFR), que se realiza en Nicaragua. El 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es uno de la más importantes enzimas para el metabolismo del folato. El polimorfismo C677T del MTHFR disminuye la actividad de esta enzima y puede estar asociado con una hiperhomocisteinemia leve a moderada en homocigotos, especialmente cuando hay deficiencias de ácido fólico, como en las enfermedades cardiovasculares. Se determinó la prevalencia del genotipo, frecuencia alélica y génica para la mutación C677T del gen de la enzima en una población nicaragüense para establecer bases para investigaciones posteriores con patologías asociadas con el polimorfismo. Se analizó 150 muestras de ADN de estudiantes procedentes de quince departamentos de Nicaragua. Con el uso del método de PCR el polimorfismo fue detectado y a través de una entrevista adicional la información fue recolectada, se relacionó la presencia del genotipo con el sexo, etnia, y procedencia. La prevalencia para el genotipo mutado como el silvestre es de 16.6% y 25.33% respectivamente. De igual manera, el genotipo se distribuye aleatoriamente en la población mestiza y miskita, no así en los criollos y mayagnas. El genotipo se distribuye de manera similar en varones como en mujeres. Tanto en la RAAN y Chinandega se encontró alta presencia del gen mutado (27.7% y 21.05%) y en León se encontró la mayor presencia del genotipo silvestre (33.96%), sin embargo en Estelí no se logró identificar la presencia de la mutación. Nosotros concluimos que la población nicaragüense estudiada se encuentra en equilibrio de H-W, no observándose diferencias significativas entre los genotipos observados y esperados.



## GLOSARIO

- Alelo:** formas alternativas de un gen.
- Asociación:** tendencia de dos caracteres (enfermedades, alelos marcadores, etc.) a ocurrir juntos en frecuencias no aleatorias. La asociación es una observación estadística simple, no un fenómeno genético, pero en ocasiones puede ser causado por desequilibrio de enlace.
- CBS:** Cistationina- $\beta$ -sintetasa.
- cDNA (DNA complementario):** DNA sintetizado por la misma transcriptasa inversa utilizando mRNA como una plantilla, sea experimentalmente o *in vitro*.
- Cebador:** oligonucleótido corto, con frecuencia de 15 a 25 bases de largo, con pares de bases específicas para una secuencia blanco a fin de permitir que una polimerasa inicie las síntesis de un filamento complementario.
- Dinucleótido CpG:** la secuencia 5´CG3´ dentro de una molécula de DNA más larga. Los dinucleótidos CpG son blancos para un sistema específico de metilación del DNA en mamíferos que es importante para controlar la expresión génica.
- Distancia genética:** distancia en un mapa genético, definida por fracciones de recombinación y la función de mapeo, y que se mide en centiMorgans.
- Distribución de Hardy-Weinberg:** la relación más simple entre frecuencias génicas y frecuencias de genotipo que se encuentran en una población bajo ciertas condiciones.
- DNA:** ácido desoxirribonucleico
- DNA codificante:** DNA que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido (o en ocasiones un RNA maduro funcional que no especifica un polipéptido).
- DNA recombinante:** híbrido de DNA construido artificialmente que contiene secuencias enlazadas de manera covalente con orígenes diferentes; por ejemplo, un vector con un inserto.
- DNA repetitivo:** secuencias de DNA que se encuentran en muchas copias idénticas o similares en el genoma.



*Dominante:* en genética humana, cualquier carácter que se expresa en un heterocigoto.

*DTN:* defectos del tubo neural.

*Empalme (Splicing):* normalmente empalme de RNA en el cual se eliminan las secuencias de RNA transcritas de intrones de un transcrito primario y se empalma entre sí los transcritos de exones en el mismo orden lineal que los exones.

*Endogamia:* matrimonio con un familiar sanguíneo. El coeficiente de endogamia es la proporción de genes de una persona que son idénticos por descendencia.

*Epigenético:* heredable (de la célula madre a la célula hija, o en ocasiones del padre al hijo), pero no producido por un cambio en la secuencia del DNA.

*Exón:* segmento de un gen representado en el producto del DNA maduro. Los exones individuales pueden contener DNA de codificación, DNA no codificante (secuencias no traducidas), o ambos.

*Expresión variable:* extensión o intensidad variable de signos fenotípicos en personas con un genotipo en personas con un genotipo determinado.

*Fenotipo:* característica observable de una célula o un organismo, incluyendo el resultado de cualquier estudio que no sea una prueba directa de genotipos.

*Frecuencia génica:* proporción de todos los alelos en un locus que son el alelo en cuestión.

*Genotipo:* constitución genética de un individuo, sea en su totalidad o en un locus específico.

*Hibridación de fluorescencia in Situ:* hibridación in situ utilizando una sonda de DNA o RNA marcada con fluorescencia.

*Hinf1:* enzima de restricción *Haemophilus Influenzae I* utilizada para la amplificación de productos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

*Herencia:* proporción de la razón de una característica que se debe a causas genéticas.



**Homocigoto:** individuo que tiene dos alelos idénticos en un locus particular. Con propósitos clínicos, una persona suele describirse como homocigoto AA si tiene dos alelos que funcionan normalmente, u homocigoto aa cuando presenta dos alelos patogénicos en un locus, prescindiendo que los alelos sean de hecho completamente idénticos a nivel de secuencias de DNA. La homocigosidad para alelos idénticos por descendencia se denomina autocigosidad.

**Homología de Secuencias:** medición de la similitud de las secuencias de los ácidos nucleicos o dos polipéptidos.

**Homólogos (cromosomas):** las dos copias de un cromosoma en una célula diploide. a diferencia de la cromátides hermanas, los cromosomas homólogos no son copias entre sí; uno se heredó del padre y el otro de la madre.

**Homólogos (genes):** dos genes o más cuyas secuencias están relacionadas significativamente por una relación evolutiva cercana, sea entre especies o dentro de una especie.

**Intrón:** DNA no codificante que separa exones vecinos en un gen. Durante la expresión génica, se transcriben intrones al RNA, pero a continuación se elimina las secuencias del intrón del pre-mRNA mediante empalme (*Splicing*). Pueden clasificarse según el mecanismo de empalme o si se separan secuencias de codificación del DNA, por su localización precisa dentro de codones.

**Islas CpG:** tira corta de DNA, con frecuencia < 1kb, que contiene dinucleótidos CpG no metilados frecuentes. Las islas CpG tienden a marcar los extremos 5' de los genes.

**K<sup>3</sup> EDTA:** Acido Etilendiaminotetraacético sal tripotásica.

**Locus:** localización cromosómica de única que define la posición de un gen individual o la secuencia de DNA.

**MTHFR:** Metiltetrahidrofolato reductasa.

**Marcador genético:** cualquier carácter mendeliano polimórfico que puede utilizarse para seguir un segmento cromosómico a través de una genealogía. Los marcadores genéticos suelen ser polimorfismos de DNA.



*Marco de lectura:* la forma en que se lee la secuencia continua del mRNA como una serie de codones tripletes. Para cualquier mRNA hay tres posibles marcos de lectura y el marco de lectura correcto se establece por el reconocimiento correcto del codón de inicio AUG.

*Metilación del DNA:* en el contexto del DNA humano, casi siempre significa conversión de citosina (por lo general en un dinucleótido CpG) en una metilcitosina.

*Mutación de punto:* mutación que causa una alteración pequeña en la secuencia de DNA en un locus. El significado es un poco impreciso: cuando se compara con las mutaciones cromosómicas, el término mutación de punto podría utilizarse para incluir cambios muy grandes (pero submicroscópicos) dentro de un gen aislado, normalmente las mutaciones de punto significan sustitución, inserción o delección solo de un nucleótido.

*Mutación sin sentido (Missense):* mutación que causa la sustitución de un aminoácido para otro en una proteína.

*Northern blot:* moléculas de membrana que llevan RNA que se fraccionaron de tamaño mediante electroforesis en gel y se utilizan para detectar los tamaños de un gen de interés en un conjunto de tejidos adultos o fetales.

*OMIM: (del inglés, On-Line Mendelian Inheritance in Man).* Herencia mendeliana en el hombre en línea, la base de datos central de genes humanos y caracteres mendelianos: <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>. Los MIM son los números índice para entrar en OMIM.

*PHW:* Principio o Ley de Hardy-Weinberg.

*PCAG:* Glaucoma primario de ángulo cerrado.

*POAG:* Glaucoma primario de ángulo abierto.

*Polimorfismos:* estrictamente, existencia de dos o más variantes (alelos, fenotípicos, variantes de secuencias, variantes de estructura cromosómica) a frecuencia importantes en la población. Los usos más laxos entre genetistas moleculares incluyen 1-cualquier variante de secuencias que



se encuentra a una frecuencia  $>1\%$  en una población, 2- cualquier variante de secuencia no patogénica, prescindiendo de la frecuencia.

*Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs):* marcador genético que consiste en tamaños variables de fragmentos de restricción alélica que resulta de un polimorfismo de secuencia de DNA. Los RFLPs se valoran originalmente mediante Southern blotting, pero en la actualidad por lo general PCR.

*Polimorfismo de repetición tándem de número variable (VNTR):* microsatélites, minisatélites y DNA satélite son ordenamientos de secuencias repetidas en tándem que con frecuencia varían entre las personas en el número de unidades repetidas. El termino VNTR se utiliza con frecuencia para indicar específicamente minisatélites.

*SAM:* S-adenosil metionina.

*SE:* *buffer Solución de Cloruro de Sodio EDTA (Etilendiaminotetraacético)*

*SDS:* *dodecil sulfato de sodio*

*SNPs (Single Nucleotide Polymorphism, pronunciado SNIP)* es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) de una secuencia del genoma.

*Promotor:* combinación de elementos de secuencias corta, normalmente justo corriente arriba de un gen, a la que se une la polimerasa de RNA a fin de iniciar la transcripción del gen.

*RNA:* *ácido ribonucleico.*

*Recesivo:* un carácter es recesivo si sólo se manifiesta en homocigotos.

*TE:* Buffer Tris EDTA (Etilendiaminotetraacético)

*THF:* Tetrahidrofolato

*Temperatura de fusión (T<sub>m</sub>):* medida de estabilidad de un dúplex de ácido nucleico, es la temperatura que corresponde al punto medio en la transición de forma de cadena doble a cadena única. De manera conveniente, esta transición puede seguirse midiendo la densidad óptica del DNA a una longitud de onda de 260nm.



*Transcriptasa inversa*: enzima que puede formar un filamento de DNA utilizando una plantilla de cDNA y para PCR-TI. La transcripción inversa es una parte esencial del ciclo de vida retroviral, pero hasta donde se sabe no del metabolismo celular normal.

*Transición*: sustitución nucleótida G↔A (purina por purina) ó C↔T (pirimidina por pirimidina).



## AGRADECIMIENTOS

A cada una de las personas que nos apoyaron a lo largo de la maestría y los que hicieron posible este trabajo de una u otra forma:

A los *estudiantes* que nos apoyaron, aceptando ser partícipes de este estudio.

Al personal del Centro de Investigación en Hematología y trastornos afines (CIHATA), Costa Rica, especialmente a la Dra. Lizbeth Salazar y Br. Leonardo Calvo.

Dra. Mayra Cartin y MSc. Haroldo Argeñal por su gran apoyo en con el análisis de los datos.

A nuestras tutoras, MSc. Edel Paredes y Dra. Lisbeth Salazar, quienes nos han guiado sabia y pacientemente a lo largo de la realización de este estudio.

A nuestras autoridades de la Facultad de Ciencias Médicas:

Dr. Armando Matúte

MSc. Orlando Mayorga

Dra. Lilliam López Narváez

Dr. Feliz Espinoza y Msc. Margarita Paniagua, por su apoyo en nuestra formación.

Dr. Efrén Castellón Cisneros, por su apoyo incondicional.

Lic. Rosa Moreno y Lic. David Calero por su gran apoyo para la realización de esta tesis.



## DEDICACIÓN

A Dios y nuestra buena Madre *María Santísima*

A mis padres Alba María y José Moreira, que siempre han sido un gran pilar en mi vida, mis bellos ángeles de la guarda.

A *Sofía Alejandra y Elvin*, los amo, son la luz de mi vida.

A mis abuelitos, Rosa, Anita, Orlando, (Q.U.E.P) que cada uno desde su humildad y sencillez dejaron una pequeña semilla que poco a poco ha dado sus frutos.

A mi tíos *Martha y Máximo*, mis segundos padres que siempre están cuando más los necesito.

A *Roxana*, mi única hermana sé que con su insipidez, siempre de una u otra forma está conmigo, sin decir una palabra ahí está.

A los *Pérez; tía Yásmina, Martha, Paquita, mi padrino Roberto y mi Mita*, que siempre han sido un gran eje en mi familia, gracias por aceptarnos y apoyarnos en esos momentos tristes y felices como un integrante más en la familia.

A mis madrinas *Cristina y tita*.

Y como olvidar a mis grandes maestras, *Doña María del Carmen Caballero Bravo y Doña Edel María Paredes*, con nuestras grandes diferencias sé que son mi familia leonesa.

A *Doña María Salinas, Doña Antonia Berrios a, Alma Nubia Morales y Doña Guadalupe Pacheco; amigas y consejeras*, gracias por cada uno de los abrazos que me dieron, cuando más lo necesite.

A mis amigos, hermanos y amores, (*Carmen Alicia, Melissa, Katya, Marielos, Fabiola, Yondra, Kenia, Carmen Isabel, Rolando, Francisco, Alexander, Alan, Alberto y Elliot*).

A *Dra. María Eugenia Lara, Dra. Emérita Berrios y Dr. Efrén Castellón*; seres a lo largo de mi carrera, con su gran ejemplo siempre dejaron tachado una gran huella en mi caminar.

A cada uno de mis profesores que participaron en cada etapa de mi formación, que con cada semilla que aportaron siguen dando frutos que perduraran con el tiempo.

*María José Moreira-Espinoza*



## DEDICACIÓN

*A Dios, y a la virgen Santísima por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy.*

*A mis queridos Padres Gustavo Vanegas y Xiomara Padilla, por darme la vida, por creer en mí y su apoyo incondicional de cada día.*

*A mis dos grandes amores, mi esposo David Enrique Calero y mi hija Dayanna Carolina por estar conmigo cada día dando fortaleza y amor para poder llegar hasta el final.*

*Mis hermanos, Gustavo Isaac y Eduardo Javier, por estar conmigo y apoyarme siempre.*

*A las MSc. Edel Paredes, MSc. Carmen Caballero, Dra. María Eugenia Lara por ser mis grandes maestras en esta nueva etapa de mi vida.*

*A mi compañera y amiga María José que cada día me alienta para seguir adelante y me da su mano para no caer.*

*A todas las personas que nos apoyaron para que esta tesis se pudiera llevar a cabo.*

*Yondra Carolina Vanegas-Padilla*



## DEDICACIÓN

Sin duda alguna, han sido muchas las personas que han contribuido en mi formación profesional, pero en esta ocasión este producto, que aunque no ha sido uno de mis mejores esfuerzos, lo considero igual de importante en mi formación, lo quiero dedicar a una persona que siempre ha estado presente en mi vida, de la cual he aprendido la disciplina, la responsabilidad, el amor al estudio y que hace 3 años y medio me dio una gran lección de vida...

Me refiero a mi tía, a **tía Amparo**, quien hace 3 años cuando le diagnosticaron cáncer demostró Fortaleza, Fe en Dios y una increíble Fuerza de Voluntad... Ella siempre fue y ha sido el pilar fuerte de la familia y a pesar de que tenía derecho de quebrantarse en ese momento fue cuando la ví aún más fuerte y su fortaleza nos ayudó a todos a aceptar el diagnóstico y a la vez a apoyarla en su lucha contra el cáncer.

Ella demostró que cuando de verdad se quiere, se puede. Abandonó de un día para otro su hábito de tabaquismo, sin ningún pero, sin ninguna excusa, sólo con el deseo de vencer el cáncer. Y hasta el momento no ha tenido ninguna recaída en el tabaquismo.

A ella, a tía Amparo, que también ha sido como una madre para mí, una de las personas que más admiro en mi vida, porque si he llegado hasta aquí, es porque ella ha sido uno de mis motores principales.

**Gracias Tía Amparo** por ser un ejemplo a seguir para mí, por cuidarme y guiarme... y porque siempre está cuando la necesito... **usted es el viento bajo mis alas...**

*Ana Yoe Cheng Chang Chan*



## INTRODUCCIÓN

El Metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es una de las enzimas más importantes del metabolismo del folato<sup>(1)</sup>. Fue caracterizada bioquímicamente en 1991 por Kang et al.<sup>(3)</sup> Posteriormente, Goyette et al. en 1994 identificaron la localización del gen en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36.3),<sup>(4)</sup> y sus siete mutaciones<sup>(5)</sup>. El polimorfismo común del MTHFR C677T afecta la actividad de la enzima y por lo tanto la distribución de folato. En condiciones de un estado deteriorado de folato, el genotipo TT homocigoto ha sido considerado como perjudicial, porque ha sido asociado con una alta concentración de homocisteína total en plasma<sup>(6)</sup>. La alta prevalencia de este polimorfismo en la mayoría de las poblaciones, podría representar un adaptación genética ancestrales asociado a las limitaciones de la vida, que ha llegado a ser un determinante de perfiles de enfermedades en la actualidad<sup>(7)</sup>.

La causa de esta variante de MTHFR ha sido identificada como un cambio de base única alterada.<sup>(8)</sup> Se ha reportado una prevalencia general del C677T de 23% en poblaciones con características similares a la nuestra.<sup>(9)</sup> En grupos indígenas es de un 44.7% y en grupo de raza negra es de 12.5%.<sup>(9)</sup> Salazar et al, estudiaron la frecuencia del polimorfismo MTHFR en pacientes con infarto agudo al miocardio, encontrando el 25.80% de pacientes con el genotipo TT, el 48.40% pacientes portadores de CT y el 25.80% portadores con el genotipo CC. <sup>(10)</sup>

La mutación C677T en el MTHFR fue muy frecuente en los indios-americanos costarricenses. La prevalencia de sujetos homocigotos del genotipo TT fue 70% encontrada en los Guaymi, siendo la prevalencia de mayor porcentaje reportada en la literatura hasta ahora, pero el genotipo en este grupo no fue distribuido como se esperaba por el equilibrio de Hardy-Weinberg<sup>(11)</sup>. En indios Yupka del oeste de Venezuela, en cinco tribus de la amazonia brasileña y en indios parakana amazonianos, se encontró una prevalencia del genotipo TT de 15%,<sup>(12)</sup> 7.8%,<sup>(13)</sup> y 1.2%,<sup>(14)</sup> respectivamente fue determinada. En africanos-costarricense del Limón, el genotipo TT y la frecuencia del alelo T fue similar a la de los Caucásicos. La más



alta frecuencia del alelo T en africanos-costarricenses de Guanacaste<sup>(11)</sup>, puede probablemente ser explicada por la mezcla con Indios de esa área desde el siglo XVI - XVII<sup>(15)</sup>.

El alelo 677C>T del gen MTHFR ha sido una fuente de interés creciente para los investigadores de todo el mundo, debido a su relación con complicaciones en el embarazo<sup>(16)</sup>, nacimientos adversos<sup>(17)</sup>, cáncer<sup>(18)</sup>, enfermedades cardiovasculares en el adulto,<sup>(19)</sup> desórdenes psiquiátricos <sup>(20)</sup>, y espina bífida<sup>(21)</sup>. Con esta tesis se pretende conocer la prevalencia de los genotipos del MTHFR en un grupo de la población nicaragüense; además de establecer una línea de base, para las patologías asociadas a esta mutación.



## ANTECEDENTES

Debido a que la deficiencia de MTHFR está relacionada con distintas patologías tales como enfermedades cardiovasculares, trastornos psiquiátricos, problemas obstétricos y defectos congénitos, entre otras, ha sido motivo de distintos estudios en las distintas edades, razas y diferentes regiones geográficas, los cuales buscan la prevalencia de esta mutación y la posible asociación de esta enzima como un factor de riesgo a desarrollar estas patologías.

Partiendo de la distribución de los alelos mostrado en etnias marcadas y variaciones geográficas del genotipo homocigoto TT, fue particularmente común en el norte de China (20%), sur de Italia (26%) y México (32%). Hay también algunas evidencias para gradientes geográficos en Europa (creciendo de norte a sur) y China (disminuyendo de norte a sur). La frecuencia del genotipo TT fue baja entre los recién nacidos de ascendencia africana, intermedia entre recién nacido de origen Europeo y alta entre recién nacidos de ascendencia hispanoamericanos<sup>(24)</sup>.

Shaw et al. estudiaron la frecuencia genotípica del MTHFR entre infantes con casos de espina bífida e infantes controles en la población de California por raza y etnia entre 1987 a 1991, donde encontraron una frecuencia genotípica para todas las razas y grupos étnicos de 19.2% del genotipo mutado TT, 46.7% de heterocigotos y 34.1% para el genotipo silvestre. En grupos blancos no hispanicos fue de TT 14.8%, TC 47.7% y CC 37.5%; en blancos hispanos genotipo mutado 25.7%, heterocigotos 49.5% y silvestre de 24.8%. En grupos negros reportaron 12.5 % para el genotipo TT, 37.5% para el CT y 50.0% para el genotipo CC. En otras razas y etnias no se encontró el genotipo mutado, el genotipo heterocigoto fue de 23.1% y el genotipo silvestre fue de 76.9%<sup>(25)</sup>.

En España se estudió la frecuencia de la mutación en recién nacidos procedentes de las comunidades autónomas y Principado de Andorra, encontrando Martínez-Frías et al, que el genotipo TT 11.96% (IC 95%, 9.46 – 14.94%), mientras que la frecuencia



de los alelos 33.82% (IC 95%, 3.74 – 37.13%) para el alelo mutado T y del 66.18% (IC 95%, 61.84 – 70,75%) para el alelo normal C<sup>(26)</sup>.

Zappacosta et al., concluye que la variante polimórfica C677T en los recién nacidos sanos es más frecuente (25%) que el polimorfismo 1298CC (12.5%). La distribución genotípica fue muy similar a las distribuciones esperadas según el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $X^2=0.04$ ,  $P=0.844$  para C677T y  $X^2= 0.401$  para A1298C). La frecuencia de los alelos mutados fue de 50.5% (IC DEL 95%, 43.7 – 57.3) para 677T y 32.7% (IC de 95%, 26.3 – 39.1) para 1298C<sup>(27)</sup>.

Al estudiar la asociación entre el nivel de la homocisteína y la presencia de la variante polimórfica del MTHFR con las enfermedades arterio-coronarias en la población del Norte de India, Tripathi et al, encontraron que la frecuencia del alelo T fue altamente significativa en el grupo de pacientes (11.9%) que en el grupo control (7.3%), con un valor de  $p^*=0.004$  y un OR 1.75, 95%<sup>(28)</sup>.

En individuos del Sur de Chile, se asoció las variantes funcionales en genes del metabolismo de la homocisteína con riesgo de trombosis venosa profunda e hiperhomocisteinemia donde la distribución genotípica y frecuencias alélicas del polimorfismo MTHFR, fue significativamente diferente entre pacientes y controles ( $p^* < 0.01$ ). Odds Ratio para trombosis venosa profunda asociada al genotipo homocigoto fue 3.68 (IC. 95%: 1.628-8.337,  $p < 0.01$ ). Los resultados encontrados mostraron que los individuos portadores del genotipo homocigoto MTHFR T/T677, presentaron niveles más elevados de homocisteína plasmática<sup>(29)</sup>.

Al estudiar, Markus et al, cuatro genes candidatos para enfermedades cardiovasculares, concluyeron que el gen de la metiltetrahidrofolato reductasa es una enzima clave para el metabolismo de la homocisteína, ya que es un aminoácido citotóxico productor de disfunción endotelial. Los hallazgos de este trabajo también determinaron que el polimorfismo de la MTHFR es más común en los caribeños africanos que en la población caucásica, sin embargo no encontraron relación entre



el grosor de la túnica íntima y la túnica media de los vasos sanguíneos con la frecuencia del polimorfismo genético estudiado<sup>(30)</sup>.

En la población de Costa Rica, Herman et al, estudiaron la prevalencia de ocho marcadores moleculares asociados con las enfermedades trombóticas, en seis tribus indio-americanas y dos grupos africanos, encontrándose que la mutación 677CT es más frecuente en los indio-americanos Costarricenses. La prevalencia de 70% de homocigotos (TT) encontrada en los Guaymi, es la más alta reportada en la literatura, pero el genotipo en este grupo no fue distribuido como se esperaría por el equilibrio de la Ley de Hardy-Weinberg<sup>(11)</sup>.

Al realizar estudios de casos y controles en la población en Pakistán, Iqbal et al, encontraron frecuencia para el alelo 677T del 13% en el grupo de estudio y del 14% en el grupo control. Estos hallazgos mostraron que la población Pakistán estudiada se encuentra en proporción normal del equilibrio de Hardy-Weinberg para ambos grupos  $P^* = 0.53$  y  $P^* = 0.45$ <sup>(31)</sup>.

Así mismo Sinthuwat et al, realizaron un análisis de genotipo C677T, del gen de la MTHFR por medio Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (*RFLPs*, de sus siglas en inglés Restriction Fragment Length Polimorphism) en 56 muestras de personas Tailandesas con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) donde la presencia de los genotipos de MTHFR encontrado fue CC (63.33%), CT (33.33%) y TT (3.3)<sup>(32)</sup>.

En la literatura también se han encontrado estudios que relacionan el polimorfismo del gen MTHFR con otras patologías, así tenemos que Boris et al, asociaron la variante del gen de la MTHFR con el Autismo, donde observaron un significativo incremento de la frecuencia de la mutación homocigótica para el alelo T (23%) comparado con población control (11%)  $P^* < 0.0001$ . Adicionalmente, los niños autistas heterocigotos para esta mutación se presentaron en el 56% en relación con la población control que fue de 41%<sup>(33)</sup>.



Shazia et al, consideraron que la distribución del genotipo 677T estaba significativamente asociada con Glaucoma primario de ángulo cerrado (PCAG)  $P^*=0.001$ ,  $X^2=12.6$ , sin embargo no se encontró asociación con Glaucoma primario de ángulo abierto (POAG)  $P^*=0.98$ ;  $X^2= 0.02^{(34)}$ .



## JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, el polimorfismo C677T del gen de la MTHFR tiene una prevalencia relativamente variada. En población hispanoamericana se encuentra una prevalencia alrededor del 25%, en Costa Rica se obtuvo una prevalencia del 23% heterocigoto (Hz) en la población general.

En Nicaragua, no se ha estudiado la prevalencia en la población general, sin embargo se ha investigado la frecuencia del polimorfismo del C677T del gen MTHFR en madres nicaragüenses de individuos con espina bífida reportando un 7%<sup>(35)</sup>.

El propósito de la investigación es conocer la prevalencia de este polimorfismo, ya que es un factor genético que codifica para enzimas o proteínas de transporte, cuyas consecuencias se observan en el tejido en desarrollo (etapa embrionaria), enfermedades cardiovasculares, apoplejía, defectos congénitos, depresión post menopáusica, trombosis venosa, algunos cánceres, complicaciones del embarazo y defecto del tubo neural; entre otros. Por lo cual es de gran utilidad estimar su prevalencia en la población general, ya que contribuirá a establecer un conocimiento básico de su prevalencia y permitirá continuar con estudios moleculares en poblaciones afectadas clínicamente con lo que puede explicarse la presencia de estas variantes.



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿Se encuentra presente la variante polimórfica C677T del gen de la MTHFR en los estudiantes de la Carrera de Medicina de la Facultad de Ciencias Médicas UNAN–León?

## **HIPÓTESIS**

La prevalencia de la variante polimórfica C677T del gen MTHFR en Nicaragua presenta una situación similar a la descrita en Latinoamérica.



## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia de la variante polimórfica C677T del gen de la MTHFR en muestras de ADN de estudiantes de la carrera de Medicina de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNAN León en el año 2012.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❖ Determinar la prevalencia del polimorfismo C677T del gen de la MTHFR en muestras de ADN de estudiantes de la carrera de Medicina de la Facultad de Ciencias Médicas en relación a sexo, etnia y procedencia.
  
- ❖ Estimar la frecuencia alélica y génica del polimorfismo C677T del gen de la MTHFR, según la fórmula de Hardy-Weinberg.
  
- ❖ Comparar los resultados del estudio con otras poblaciones latinoamericanas.



## MARCO TEÓRICO

El polimorfismo genético es la variación estructural o funcional encontrada entre miembros de una misma especie, se presenta en lo general, en regiones genéticas que codifican para regiones estructurales básicas de las proteínas (36, 37, 38, 39, 40).

En el polimorfismo la secuencia de DNA se presenta en varios fenotipos alternativos normales y comunes de la población, por la ocurrencia de múltiples alelos en un locus, donde por lo menos dos alelos aparecen con una frecuencia  $>1\%$  en la población general. En este caso el alelo es considerado como la secuencia normal por lo que hay dos o más alternativas aceptables (36, 37, 38, 39, 40).

El polimorfismo genético se puede presentar en regiones codificantes o exones, lo cual da lugar a mutaciones generalmente visibles en la proteína correspondiente; o en regiones no codificantes o intrones, éste puede ser invisible al nivel del fenotipo, dando lugar a las mutaciones silenciosas que son la mayoría (36, 37, 38, 39, 40).

Las regiones protéicas altamente polimórficas son un cambio de la estructura de las mutaciones en las regiones codificantes, se presenta en algunos casos una diversidad aumentada e independiente del polimorfismo propiamente genético en proteínas como los anticuerpos o los receptores de los linfocitos T. Este polimorfismo aumentado, o hiper variabilidad, resulta de mecanismos epigenéticos, tales como el rearrreglo de fragmentos de genes o la inserción nucleotídica<sup>(41)</sup>.

*Polimorfismo de un solo nucleótido, (SNPs de sus siglas en inglés Single- Nucleotide Polimorphism)*

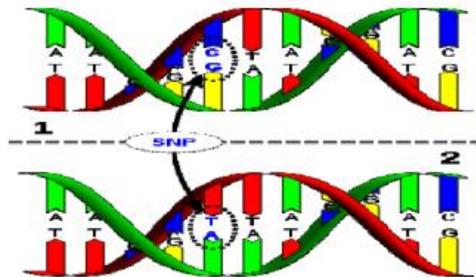


Figura 1: Polimorfismo de un solo nucleótido, SNPs



Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), son variaciones en la secuencia del DNA que ocurren cuando solo un nucleótido (A, T, C, ó G) es alterado, en la secuencia genómica. Por ejemplo, un SNP puede cambiar la secuencia de DNA, AAGGCTAA a ATGGCTAA. Para que una variación sea considerada como un SNPs, debe de ocurrir por lo menos en más de 1% de la población<sup>(42)</sup>.

Aunque más del 99% de la secuencia del DNA humano es igual, las variaciones en la secuencia del DNA pueden tener gran impacto sobre la respuesta humana a enfermedades. Entre los factores que interfieren en dichas variaciones se encuentran: bacterias, virus, toxinas, productos químicos, drogas y otras terapias. Esto hace que la SNPs sea valiosa para la investigación biomédica y para el desarrollo de productos farmacéuticos o de diagnóstico médico. También evolutivamente estables, no cambian mucho de generación en generación, lo que facilita su seguimiento en los estudios de población<sup>(43)</sup>.

La mayoría de los polimorfismos no tienen efecto sobre el fenotipo (caen en regiones no codificantes y son completamente neutrales). Algunos pocos afectan el fenotipo (estatura: alta/baja; cabello: claro/oscuro; color de ojos, en lugar de características de importancia médica) muy pocos polimorfismos son responsables de enfermedades genéticas<sup>(41)</sup>.

El mapeo de SNPs ayudará a identificar los genes asociados a múltiples enfermedades complejas como el cáncer, la diabetes, enfermedad vascular, y algunas formas de enfermedad mental. Estas asociaciones son difíciles de establecer con los métodos convencionales de identificación del gen debido a que un único gen alterado puede hacer sólo una pequeña contribución a la enfermedad<sup>(42)</sup>.

Los SNPs no causan enfermedades, pero pueden ayudar a determinar la probabilidad de que alguien va a desarrollar una enfermedad en particular. Sin embargo, la variación de secuencias polimórficas puede contribuir a la susceptibilidad a la enfermedad y también puede influir en las respuestas de drogas.



Por lo cual es de gran utilidad para la investigación médica en el desarrollo de fármacos. (41, 42, 44)

Las variaciones genéticas pueden estar asociadas directa o indirectamente con enfermedades específicas. El caso más claro de asociación directa de un alelo a una enfermedad particular es cuando el producto de este alelo es determinante por su función para una patología<sup>(37, 39)</sup>.

En cuanto a las asociaciones indirectas de algunos alelos de estas enfermedades particulares, estas resultan de la presencia del alelo en la misma región cromosómica de los genes alterados que intervienen en una patología, comportándose de esta manera apenas como un marcador fortuito de la enfermedad<sup>(38)</sup>.

Los SNPs no son indicadores absolutos de desarrollo de la enfermedad. Como algunas patologías son de patrón multifactorial, la presencia de un SNP no condiciona al individuo mientras no se reúnen los factores necesarios para el desarrollo de la enfermedad. Un individuo que ha heredado dos alelos mutados puede nunca desarrollar la enfermedad predispuesta, mientras otro, que ha heredado dos alelos silvestre llegar a desarrollar la enfermedad relacionada. Por lo cual la presencia de un alelo mutado se considera como un marcador de susceptibilidad a una enfermedad, aunque el riesgo a desarrollar una patología dada en la población general es bajo, por lo tanto un polimorfismo, resulta muchas veces significativo para su diagnóstico y/o pronóstico<sup>(39)</sup>.

### **Genética del gen *MTHFR***

El MTHFR es el gen que proporciona la instrucción completa de la biosíntesis de la enzima metabólicamente importante llamada metiltetrahidrofolato reductasa. Esta enzima cataliza la conversión del ácido fólico en su forma biológicamente activa que es tetrahidrofolato (THF). El metiltetrahidrofolato (CH<sub>3</sub>-THF) es importante en la regulación genética, ya que está implicado en el silenciamiento de genes uniendo su grupo metilo al ADN. Si el gen no está debidamente regulado debido a la mutación



perjudica la eficacia de la enzima para producir suficiente THF, por ende un individuo con deficiencia en la síntesis del CH<sub>3</sub>-THF interrumpe la síntesis de ADN y la división celular, causando distintas patologías<sup>(45)</sup>.

Goyette et al. mapearon el gen a través de la Hibridación in Situ con Fluorescencia (FISH de sus siglas en inglés Fluorescence *in situ* Hibridation) localizado en el brazo corto del cromosoma 1 región 3 banda 6.3, tiene bien descrito varios polimorfismos de nucleótidos simple (SNPs) (4).

Goyette et al. definió la estructura de genes en humanos y ratones<sup>(4)</sup>. El gen humano de MTHFR está compuesto de 11 exones. Gaughan et al. analizó la región promotora del gen de la MTHFR, encontrando que no tiene la caja TATA pero contiene islas CpG, múltiples de sitios de unión SP1 y varios sitios de unión para otros factores de transcripción<sup>(46)</sup>. Por análisis de Northern Blot identificó la transcripción de la MTHFR de alrededor 2.8 y 7.2 kb en todos los tejidos examinados, y otros de aproximadamente 9.0kb en el cerebro, músculo, placenta y estómago. Los transcritos de diferentes tamaños son el resultado de los sitios de inicio alterno de la transcripción y las señales de poliadenilación. La síntesis total es lenta y la proporción de cada transcripción difiere entre cada tejido<sup>(46, 47)</sup>.

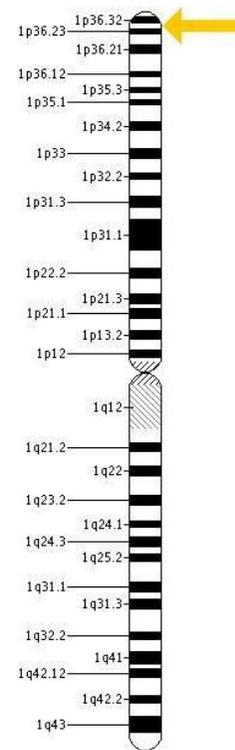


Fig. 2 Idiograma del Cromosoma 1

El gen de la metiltetrahidrofolato reductasa contiene 2,2 kb que codifica para una proteína de 77kDa, que constituye una enzima clave en el metabolismo del folato y la homocisteína. En condiciones fisiológicas la reacción es irreversible y su actividad está regulada por la concentración de S-adenosil metionina (SAM). El déficit hereditario de MTHFR es una de las causas de homocisteinemia, en general, menos grave que la observada en la homocisteinemia clásica por deficiencia de la cistationina-β-sintetasa (CBS) <sup>(48)</sup>.



El alelo C667T en una variante termolábil, se caracteriza por una mutación puntual en la posición 677 del exón 4 del gen, que consiste en una transposición de una Citosina (C) por Timina (T). Esta mutación determina la sustitución del aminoácido Alanina (GCC) por Valina (GTC) denominando a dicho polimorfismo Ala225Val, el cual es una mutación de tipo sin sentido (missense, en inglés) en el dominio catalítico de la enzima. Esto cambia la actividad catalítica de la enzima, disminuye su afinidad por el cofactor, flavina adenina dinucleótido<sup>(48)</sup>.

Como resultado de esta mutación se produce un descenso en la actividad de la enzima MTHFR, aunque ni el estado homocigoto ni el heterocigoto están asociados con el aumento de la concentración plasmática de homocisteína o disminución de la concentración de folato en plasma, fenómeno que es evidente en estado homocigoto 677TT. Sin embargo, parece haber una interacción entre estas dos mutaciones. Por lo tanto el genotipo 677TT de la MTHFR, está asociado con una deficiencia parcial de esta enzima que se traduce en la disminución de 50% de la actividad enzimática; en condiciones de baja ingesta de folatos, esta mutación se ha demostrado que causa disminución en los niveles de 5-metiltetrahidrofolato, se asocia a una moderada hiperhomocisteinemia; disminución de la concentración de folatos en el plasma, disminución de la metilación del DNA genómico, riesgo aumentado de tener hijos con defectos del tubo neural (DTN), además se ha asociado a Síndrome de Down, enfermedad cardiovascular, algún tipo de cáncer y por consiguiente a una menor respuesta a la suplementación con folatos<sup>(48)</sup>.

Otra variante polimórfica del gen de la MTHFR es A1298C donde se da la sustitución de Adenina (A) por Citosina (C), causando un cambio de los aminoácidos de Glutamina a Alanina en la posición 429 (Glu429Ala), este cambio no parece afectar directamente la función de la enzima, sin embargo puede tener un efecto cuando se combina con el polimorfismo C677T, por lo tanto la heterocigocidad combinada para las mutaciones A1298C y C677T está asociada con una reducción de la actividad específica de la enzima MTHFR, homocisteína elevada y descenso en las concentraciones plasmáticas de folato. De esta forma, se producen unas



características similares a las observadas en individuos homocigotos para la mutación C677T, lo que induce a pensar que está relacionada con una proporción de los DTN, que no son explicados por homocigocidad de la mutación C677T y puede ser un factor de riesgo genético adicional para DTN<sup>(48)</sup>.

Se han identificado más de 20 mutaciones en el gen MTHFR, que causan deficiencia enzimática severa. Algunos otros cambios descritos son poco frecuentes y sólo están presentes en algunas familias con un cuadro clínico que incluye: retardo psicomotor, debilidad muscular proximal, patología vascular y homocisteinemia<sup>(4, 5)</sup>.

Los estudios en poblaciones han descrito la frecuencia y las condiciones de los SNPs de la MTHFR común en muchas poblaciones. El SNP C667T de la MTHFR, es más frecuente en ciertas condiciones, tales como enfermedad vascular, defectos del tubo neural (DTN), aborto espontáneo, leucemias, malignidad de algunos cánceres, fisuras del paladar, complicaciones en el síndrome de Down, ansiedad, depresión, niños con falla renal, hipertensión, arteriosclerosis, artritis reumatoide <sup>(7, 49, 50, 51, 52)</sup>.

Wilcken et al. estudió la distribución geográfica y étnica del polimorfismo 677CT en el gen MTHFR en más de 7,000 recién nacidos de 16 áreas de Europa, Asia, América, Oriente Medio y Australia <sup>(24)</sup>. El genotipo TT es particularmente común en el norte de China (20%), el sur de Italia (26%) y México (32%). Además hubo evidencias geográficas con aumento del norte al sur de Europa y con descenso de norte a sur en China. La frecuencia genotípica para TT fue baja en los recién nacidos de ascendencia africana, intermedio entre los recién nacidos de origen europeo, y alta entre los recién nacidos de ascendencia hispanoamericana. En áreas extremas la distribución de la frecuencia muestra derivaciones del equilibrio de la ley de Hardy-Weinberg. Los hallazgos sugieren la existencia de presiones selectivas que pueden haber generado un cierto grado de microdiferenciación genética que conducen a una marcada variación<sup>(24)</sup>.



Frosst et al. identificó una mutación 677C-T en el gen MTHFR, resultando en un Ala222 Val (A222V) sustitución<sup>(53)</sup>. La alteración creó un sitio *Hinfl* que se utilizó para la pantalla 114 seleccionando cromosomas franco-canadienses, la frecuencia del alelo de la sustitución fue de 0,38. La mutación en el estado homocigotos o heterocigotos correlacionados con la actividad enzimática reducida y termolabilidad aumento en los extractos de linfocitos; expresión in vitro de la ADNc mutagenizado que contiene la mutación confirmó su efecto sobre la termolabilidad de la MTHFR. Los individuos homocigotos para la mutación tenían niveles significativamente elevados de homocisteína en plasma. Por lo tanto, la mutación 677CT puede representar un importante factor de riesgo genético en la enfermedad vascular<sup>(53)</sup>.

### **Estudio de Poblaciones humanas**

El estudio de la genética en poblaciones comienza por definir qué es una población desde perspectiva genética. Una población es un grupo de individuos de la misma especie que ocupan colectivamente una localidad geográfica en particular y que real o potencialmente son capaces de cruzarse entre sí, compartiendo un acervo común de genes. Población de genes o “pool” génico se definen como un grupo de individuos que se cruzan entre sí y se caracterizan por su continuidad genética a lo largo de varias generaciones<sup>(54)</sup>. También se considera una población, cualquier grupo en el cual se estudia algunas características variables y del cual pueden extraerse diversas muestras con fines estadísticos. (37, 40)

Los individuos de una población:

1. Tienen entre sí una semejanza genética mayor que entre individuos de diferentes poblaciones, (por tener ascendientes comunes).
2. Comparten los mismos genes, un acervo génico común por el hecho de aparearse entre sí.

Por lo cual también se puede definir una población por el conjunto de los genes de sus individuos.



En genética de poblaciones, el principio de Hardy-Weinberg (PHW) conocido también equilibrio de Hardy-Weinberg o ley de Hardy-Weinberg, que recibe su nombre de G. H. Hardy y Wilhelm Weinberg, establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural ni ningún otro factor y no se produzca ninguna mutación. Es decir, la herencia mendeliana, por sí misma, no engendra cambio evolutivo<sup>(36, 37, 38, 39, 40)</sup>.

La ley de Hardy-Weinberg afirma que, bajo ciertas condiciones, tras una generación de apareamiento al azar, las frecuencias de los genotipos de un locus individual se fijarán en un valor de equilibrio particular. También especifica que esas frecuencias de equilibrio se pueden representar como una función sencilla de las frecuencias alélicas en ese locus. En el caso más sencillo, con un locus con dos alelos A y a, con frecuencias alélicas de p y q respectivamente, la ley de Hardy-Weinberg predice que la frecuencia genotípica para el homocigoto dominante AA es  $p^2$ , la del heterocigoto Aa es  $2pq$  y la del homocigoto recesivo aa, es  $q^2$ . El principio de Hardy-Weinberg es una expresión de la noción de una población que está en "equilibrio genético", y es un principio básico de la genética de poblaciones<sup>(36, 37, 38, 39, 40)</sup>.

En una población en equilibrio se debe considerar que exista apareamiento aleatorio, que tenga un tamaño infinito (o lo bastante grande para minimizar el efecto de la deriva genética) y que no experimente selección, mutación y migración (*flujo genético*)<sup>(37, 55)</sup>.

Una descripción probabilística del PHW es que los alelos de la siguiente generación para cualquier individuo se eligen aleatoria e independientemente unos de otros. Consideremos dos alelos A y a con frecuencias en la población de p y q respectivamente. Las distintas maneras de formar nuevos genotipos se pueden derivar utilizando un cuadro de Punnett <sup>(37, 55)</sup>.

A veces una población se crea juntando machos y hembras con distintas frecuencias alélicas. En este caso, la suposición de una sola población queda violada hasta la



siguiente generación, de manera que la primera generación no tendrá equilibrio de Hardy-Weinberg. Las generaciones sucesivas sí tendrán equilibrio de Hardy-Weinberg<sup>(36, 37, 38, 39, 40, 55)</sup>.

Los tres genotipos AA; Aa y aa aparecen en una relación  $p^2: 2pq: q^2$ . Si las sumamos, obtenemos la unidad:  $p^2 + 2pq + q^2 = (p + q)^2 = 1$ . Las violaciones de las suposiciones de Hardy-Weinberg pueden causar desviaciones de los valores esperados. Cómo afecta esto a la población depende de las suposiciones que son violadas<sup>(36, 37, 38, 39, 40, 55)</sup>.

El apareamiento aleatorio en el PHW establece que la población tendrá las frecuencias genotípicas especificadas (llamadas proporciones de Hardy-Weinberg) tras una generación de apareamiento aleatorio dentro de la población. Cuando suceden trasgresiones de este requisito, la población no tendrá proporciones de Hardy-Weinberg. Tres de estas violaciones son:

- Endogamia, que provoca un aumento de la homocigosidad en todos los genes.
- Emparejamiento selectivo, que causa un aumento en la homocigosidad de los genes implicados en el carácter que se está seleccionando para el apareamiento (y de los genes que están en desequilibrio de ligamiento con ellos).
- Población de poco tamaño, que causa un cambio aleatorio en las frecuencias genotípicas, especialmente si la población es muy pequeña. Ésto es debido al efecto de muestreo, y se llama deriva genética <sup>(36, 37, 38, 39, 40, 55)</sup>.

Las demás suposiciones afectan a las frecuencias alélicas, pero no afectan por sí misma al apareamiento aleatorio. Si una población viola alguna de éstas, la población seguirá teniendo proporciones de Hardy-Weinberg en cada generación, pero las frecuencias alélicas cambiarán con esa fuerza<sup>(36, 37, 38, 39, 40, 55)</sup>.

La selección, en general, hace que cambien las frecuencias alélicas, a menudo con mucha rapidez. Aunque la selección direccional conduce finalmente a la pérdida de



todos los alelos excepto el favorecido, algunas formas de selección, como la selección estabilizadora, conducen a un equilibrio sin pérdida de alelos<sup>(36, 37, 38, 39, 40, 55)</sup>.

La mutación tendrá un efecto muy sutil en las frecuencias alélicas. Los ritmos de mutación son del orden de  $10^{-4}$  a  $10^{-8}$  y el cambio en las frecuencias alélicas será, como mucho, del mismo orden. Las mutaciones recurrentes mantendrán a los alelos en la población, aunque haya una fuerte selección en contra de ellos<sup>(36, 37, 38, 39, 40, 55)</sup>. La migración enlaza genéticamente dos o más poblaciones. En general, las frecuencias alélicas se harán más homogéneas entre las dos poblaciones. Algunos modelos de migración incluyen inherentemente el apareamiento no aleatorio. La selección estabilizadora conduce a una población en equilibrio con proporciones de Hardy-Weinberg. Esta propiedad que enfrenta a la selección con la mutación es la base de muchas estimaciones del ritmo de mutación (equilibrio mutación-selección)<sup>(36, 37, 38, 39, 40, 55)</sup>.

### **Patología del Polimorfismo C677T del gen MTHFR**

La actividad enzimática reducida de los polimorfismos C677T y A1298C se asocia con riesgo reducido para varios tipos de cáncer como la leucemia linfocítica aguda, cáncer de pulmón, colon y recto, mientras que estos mismos polimorfismos comunes están asociados con hiperhomocisteinemia la cual se reportó como factor de riesgo para defectos de tubo neural y enfermedades<sup>(56)</sup>.

### **MTHFR C677T y pérdidas gestacionales**

La patogénesis de los abortos espontáneos es compleja, que involucra interacción de varios factores genéticos y ambientales. El polimorfismo C677T y A1298C del gen Metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR) se asocian comúnmente con defectos en el metabolismo de homocisteina dependiente de folatos y está implicado como factor de riesgo para pérdida de embarazo temprano<sup>(57, 58)</sup>.



El defecto de vascularización de las vellosidades coriónicas parece estar asociado con muerte embrionaria. Los niveles de homocisteína se relacionan con perímetros y diámetros más pequeños de los elementos vasculares coriónicos<sup>(59)</sup>. Así como los abortos recurrentes<sup>(60, 61, 62)</sup>.

### **MTHFR C677T y complicaciones del embarazo**

La MTHFR C677T se considera como un marcador genético para identificar mujeres con riesgo aumentado de producto con peso bajo para la edad gestacional <sup>(63)</sup>. .

Las mujeres que desarrollan pre-eclampsia severa tienen niveles plasmáticos más altos de homocisteína plasmática que las mujeres que siguen normotensas durante todo el embarazo. Un nivel alto de homocisteína plasmática temprano en el embarazo puede aumentar casi al triple el riesgo para desarrollar pre-eclampsia severa. Así mismo las mujeres que desarrollan pre-eclampsia no severa tienen niveles más altos de homocisteína durante la etapa temprana del embarazo, los niveles altos de homocisteína se asocian con cuatro veces más riesgo para desarrollar preeclampsia no severa<sup>(63)</sup>.

### **MTHFR C677T y defectos de tubo neural**

El polimorfismo C677T predispone a leve hiperhomocisteína especialmente si se acompaña con baja concentración de folatos. La interacción genética – nutricional puede aumentar el riesgo para defectos de tubo neural<sup>(21)</sup>. Varios estudios iniciales reportan mayor frecuencia del polimorfismo C677T entre madres, padres, pacientes y óbitos <sup>(51, 65, 66)</sup>.

### **MTHFR C677T y Síndrome de Down**

Varios estudios consideran a los polimorfismos MTHFR C677T y MTHFR A1298C como factor de riesgo para el síndrome de Down. Aumentado el riesgo en madres jóvenes menores de 31de edad<sup>(52, 67)</sup>.



### **MTHFR C677T y enfermedad cardiovascular**

Está bien establecido que esta leve elevación de la concentración de homocisteína plasmática total confiere mayor riesgo para enfermedad cardiovascular. Debido a que los pacientes con dos alelos 677T de la MTHFR son propensos a desarrollar leve hiperhomocisteína, se ha propuesto el polimorfismo C677T como un factor de riesgo genético para enfermedad vascular (68, 69, 70, 71).

### **MTHFR C677T y cáncer**

Los derivados del ácido fólico son esenciales para la síntesis y metilación adecuados del DNA. Por lo cual la deficiencia de folatos puede relacionarse con carcinogénesis parece que el alelo C677T es un factor protector en algunos tipos de cáncer, pero los reportes de investigación en relación a la asociación varían. Además es un factor de riesgo en cáncer de órganos como esófago, pulmón, carcinomas de células escamosas de mama bilateral, ovario y páncreas (77).

### **MTHFR C677T y alteraciones psiquiátricas**

Individuos con deficiencia severa de MTHFR presentan manifestaciones psiquiátricas que responden a tratamientos con folatos<sup>(2, 71)</sup>, por lo tanto, se sugirió que el alelo 677T se asocia con alteraciones psiquiátricas, esquizofrenia, depresión mayor, trastornos bipolares, psicosis tipo esquizofrenia y depresión<sup>(20, 72, 73, 74)</sup>. Así como en la ansiedad, enfermedad de alzhéimer<sup>(75)</sup>.

### **MTHFR C677T relacionado con procedimientos**

El polimorfismo C677T ha asociado a la enfermedad del injerto de la vena safena en individuos sometidos a by-pass coronario. Así como en la incidencia de eventos cardiovasculares después de by-pass coronario<sup>(76)</sup>.

### **MTHFR C677T relacionado con medicamentos**

Los polimorfismos de la MTHFR afecta el metabolismo de los folatos y puede modificar la farmacodinamia de los antifolatos (como el caso del metotrexate que presenta mayor toxicidad entre pacientes con MTHFR 677T, llegando a presentar



insuficiencia renal y muchos otros fármacos cuyo metabolismo, efectos bioquímicos o de estructuras diana requieren reacciones de metilación<sup>(77)</sup>.

### **Prevalencia del polimorfismo C677T**

El polimorfismo C677T del gen de la MTHFR tiene una prevalencia relativamente alta en todo el mundo, y muestra una distribución heterogénea en diferentes grupos étnicos, la cual oscila entre 2 a 54.5%<sup>(9)</sup>. En un estudio realizado en población judía sana en Israel se reportó frecuencia variada para el genotipo TT entre 2 a 19% (dividiendo la población a grupos étnicos diferentes).



## MATERIAL Y MÉTODOS

### Tipo y área de estudio

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal de la variante polimórfica C677T del gen de la enzima MTHFR. Donde el área de estudio fue la Carrera de Medicina de la Facultad de Ciencias Médicas, de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua - León. La Facultad abarca cuatro carreras: Medicina con la mayor cantidad de población estudiantil, Bioanálisis Clínico, Psicología y Enfermería; para una población de estudio de 1881 estudiantes, procedentes de todo el país; incluyendo las regiones autónomas.

### Población a estudio

La Carrera de Medicina tiene de 626 estudiantes, desde II año a V año, a través de fórmula estadísticas, conociendo el tamaño de la población y la proporción de individuos con las características a estudiar a través de muestreo aleatorio estratificado se obtuvo una muestra de ADN de 150 estudiantes. Se calculó en Excel, el tamaño de la muestra partiendo de la siguiente fórmula con un margen de error máximo aceptado de 0.05 y se aplicó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2 * P * (1 - P)}{D^2}$$

Donde:

Z: nivel de confianza elegido. Si alfa = 95%, zeta = 1.96 al cuadrado 3.84

P: proporción de una categoría de la variable (incidencia reportada en su caso)

D: error máximo puede variar de 0,01 a 0,1, entre más bajo es mejor (lo usual es 0,05)

n: tamaño de la muestra;

y se realizó un ajuste para poblaciones finitas:

$$\frac{n}{1+n/N}$$



### **Criterios de inclusión:**

- ❖ Estudiantes que aceptaron ser parte del estudio y firmaron la hoja de consentimiento informado.
- ❖ Ser estudiante activo de segundo a quinto año de la carrera de Medicina, de la universidad en el año 2012.
- ❖ Ser mayor de 16 años y menor de 25 años.

### **Criterios de exclusión:**

- ❖ Estudiantes que estaban siendo tratados con medicamentos anticoagulantes (Heparina sódica, Warfarina sódica).
- ❖ Estudiantes con diagnóstico de Enfermedades como: Lupus eritematoso sistémico, Diabetes mellitus, Virus de Inmunodeficiencia Humana positivo (VIH), Hemofilia, y Anemia hemolítica autoinmune.

### **Toma y procesamiento de la Muestra**

El ADN fue aislado de sangre periférica acorde al protocolo estándar de Miller et al.<sup>(78)</sup> y procesado a través de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y análisis de restricción debido a que la mutación crea un sitio de restricción para la enzima *Hinfl*.

#### ❖ Obtención de la muestra

A cada estudiante que aceptó participar en el estudio se le extrajo una muestra de sangre venosa de 10ml. Las muestras de sangre fueron tomadas en posición sentada a través de venopunción cubital y aplicación de torniquete, cumpliendo el protocolo internacional de toma de muestras sanguíneas.

Se recolectaron dos tubos vacutainer con K<sup>3</sup> EDTA cada uno de 5ml de sangre. Después de tomada las muestras se colocaron en un mezclador automático. Las muestras se almacenaron en el área de Histoembriología del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Facultad de Ciencias Médicas por dos días a una



temperatura de 4°C hasta su envío al Centro de Investigación en Hematología y trastornos afines (CIHATA), Costa Rica.

❖ *Transporte de la muestra*

Para transportar las muestras hacia Costa Rica se utilizó termos con hielo seco que mantuvieron la temperatura a un máximo de 10°C.

❖ *Aislamiento de ADN y Determinación del marcador genético molecular MTHFR*

El ADN genómico fue extraído de leucocitos de sangre periférica por el método de precipitación de NaCl, por la técnica de Miller et al <sup>(78)</sup>. La Sangre periférica se suspendió en 5ml de buffer SE (Sodio EDTA), 250ul de SDS (Dodecilsulfato sódico) al 20%. Se incubó toda la noche a 37°C. Luego de la proteólisis se le agregó 14ml de NaCl 6M y se centrifugó a 2500rpm por una hora. Se precipitó el ADN a partir del sobrenadante con etanol absoluto y se suspendió para su almacenamiento en buffer TE (Tris EDTA) pH 8.0.

Para estimar la cuantificación de ADN en la muestra se midió la absorción de UV en 260nm, se determinó la pureza por medio de la proporción de densidad óptica 260nm/280nm. Si la relación fue igual o mayor a 1.6, se consideró pura para confiar en la cuantificación espectrofotométrica en el gel de agarosa al 0.8%. Los primers para el gen MTHFR utilizados fueron Cadena adelantada (Forwards) 5'TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA3', y Cadena retardada (Reverse) 5'AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG3', adquiridos de Invitrogen.

La ampliación de los fragmentos de ADN se realizó en un termociclador automatizado (Gene Amp 9700 BM-030) según la técnica de Frosst et al <sup>(53)</sup>. La mezcla (contenía 200ng de ADN, 50pmol de cada primer específico, 1.5dmmol/L de MgCl<sub>2</sub> 0.8mmol/L, dNTPs y 1.5u Taq Polimerasa, Glibco BRL), fue inicialmente desnaturada a 94°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 62°C, 45 segundos a 72°C y una extensión final de 12 minutos a 72°C. Los productos de PCR fueron observados en gel de agarosa al 2% seguido por



la tinción con bromuro de etidio al 1ug/mL. El producto de PCR amplificado fue de 198pb y 175pb, digerido con la enzima de restricción *Hinfl*, comparados con patrones de peso molecular de 100pb estándares. Los productos de digestión de restricción fueron separados en 3% de gel de agarosa y visualizado con la tinción de bromuro de etidio en un transiluminador ultravioleta BM-028.

### **Análisis estadístico**

En este estudio, la determinación de la etnia de los participantes se hizo con base a criterios, tomando en cuenta las características fenotípicas de los estudiantes, como el color de la piel, conformación labial, apariencia del cabello y forma de nariz. Clasificándolas en mestizos, miskitos, criollos y mayagnas.

La clasificación de etnias de todos los estudiantes se realizó únicamente por evaluación personal del investigador, para eliminar la variación del observador. Además se les preguntó a los participantes la raza a la que pertenecían.

Posteriormente, se desarrolló un análisis multivariante, cruzando las siguientes variables con el resultado del análisis de PCR:

- ❖ Genotipo MTHFR C677T.
- ❖ Sexo.
- ❖ Etnia.
- ❖ Procedencia.

Se procesaron los datos en el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows. Se hizo una comparación con los valores en otros países. Se calculó la prevalencia del gen, además de la frecuencia alélica y genotípicas para la población general nicaragüense. Se realizó el análisis de equilibrio poblacional según la Ley de Hardy-Weinberg (EHW), para equilibrio de poblaciones con un análisis de significativo entre la frecuencia genotípica observada y esperada por medio del análisis de chi  $X^2$ , el cálculo el valor de  $p$  a través de pruebas paramétricas de Mann Whitney.



### **Posibles sesgos**

- ❖ Participantes del estudio que cursaran con leucopenia al momento de la extracción de la muestra.
- ❖ Almacenamiento y transporte de la muestra inadecuado.
- ❖ Aplicación del protocolo de Miller et al. incorrecto.<sup>(78)</sup>
- ❖ Inadecuada técnica de PCR.
- ❖ Llenado incompleto del instrumento de recolección de datos.

### **Control de posibles sesgos**

- ❖ Cumplimiento estricto del protocolo internacional de la toma de muestras sanguíneas, su conservación y transporte.
- ❖ Supervisión del protocolo de Miller et al.<sup>(78)</sup> y la técnica de PCR por el director del CIHATA.
- ❖ Instrumento de recolección de datos llenados por los investigadores.

### **Consideraciones éticas, confidencialidad y carta de consentimiento informado.**

Todos los estudiantes que formaron parte de este estudio fueron seleccionados de manera aleatoria estratificada según el listado oficial de la Secretaría Académica. Al estudiante se le informó a través de una carta, que fue seleccionado para formar parte de este estudio, al aceptar participar el estudiante se le explicó acerca de los objetivos de la investigación mediante un lenguaje sencillo, y sobre el estudio como se establece en las actualizaciones de la Declaración de Helsinki, y en la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y Soberanía Genómica una vez que el estudiante aceptó ser parte del estudio, se procedió a la firma de la carta de consentimiento informado (anexo 2).

Así mismo, la ficha de recolección de datos (anexo 3) que fue contestado por los participantes voluntarios y contiene los datos personales, antecedentes personales y familiares, estos datos son manejados de forma confidencial acorde a la propuesta de la Ley Federal de Protección de datos personales y a la Declaración de la 30 Conferencia Internacional de Autoridades de Protección de Datos y Privacidad.



### **Divulgación de resultados**

- ❖ Con resultados previos se participó en III Congreso de Investigadores de la Red Centroamericana de Exbecarios de DAAD para la investigación, CURLA La Ceiba, Atlántida Honduras, realizado entre el 14 y 16 de noviembre del 2012.
  
- ❖ Con los datos se envió a la revista médica electrónica de la Universidad de Costa Rica un artículo publicado en la Revista Clínica Escuela de Medicina, UCR, HSID, Vol. 3, No. 6, 2013. ISSN 2215 - 2714.
  
- ❖ Los resultados de los datos una vez siendo defendida la tesis serán entregados a los estudiantes participantes del estudio.



### Operacionalización de variables

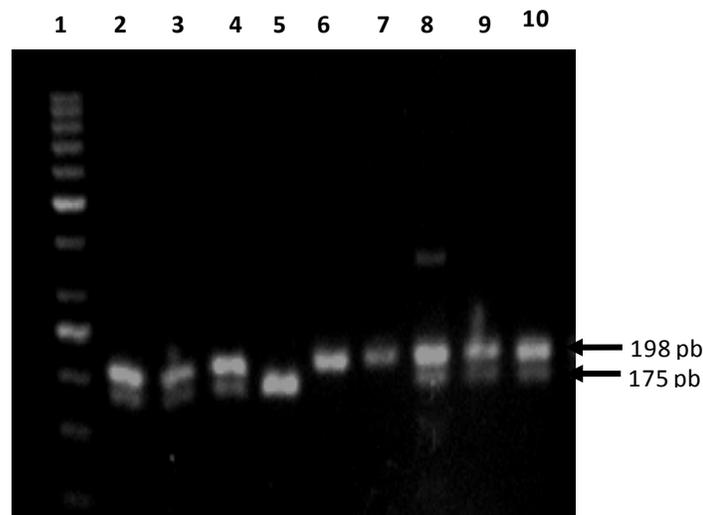
VARIABLE	DEFINICIÓN	NIVEL DE MEDICIÓN	CATEGORÍA
<b>Genotipo MTHFR C677T</b>	Constitución genética de un individuo, respecto al gen del a enzima MTHFR.	Cuantitativa	- Silvestre CC - Heterocigoto CT - Homocigoto TT
<b>Sexo</b>	Lo que diferencia al varón de la mujer	Cualitativa	- Mujer - Varón
<b>Etnia</b>	Comunidad humana definida por afinidades raciales, lingüísticas, culturales. Se refiere al grupo étnico o raza a la cual pertenece el participante en el estudio.	Cualitativa	- Mestizo - Miskito - Mayagna
<b>Procedencia</b>	Origen, principio de donde nace o deriva. Se refiere a la localización geográfica, según división política (departamento) del país, de donde procede el participante en el estudio.	Cualitativa	- León - Managua - Masaya - Chinandega - Matagalpa - Estelí - Jinotega - Boaco - Chontales - RAAS - RAAN - Rivas - Granada - Carazo - Madriz - Nueva Segovia - Río San Juan



## RESULTADOS

Se presentan los resultados de 150 muestras de sangre periférica de estudiantes de la carrera de Medicina de la facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua León, entre las edades de 16 a 25 años, provenientes de todos los departamentos de Nicaragua; donde se determinó la frecuencia de la variante polimórfica y se evaluó su equilibrio según la ley de Hardy y Weinberg en la población nicaragüenses.

En la fotografía se puede observar en el gel de poliacrilamida las bandas según pesos moleculares de los genotipos del polimorfismo C677T del gen de la MTHFR. En el carril 1 se muestra el marcador de tamaño molecular de 100pb, en los otros carriles observamos los resultados de las muestras de ADN de los estudiantes. En el carril 5 se observa el homocigoto mutado, en los carriles 6 y 7 se presentan muestras de tipo silvestre y en el resto de los carriles se presenta el estado heterocigoto con 2 bandas (198pb y 175pb).



Ho WT Hz

Figura 1. Producto de PCR digeridos con la enzima de restricción *HinfI* para la determinación de la variante polimórfica C677T del gen de la Metiltetrahidrofolato reductasa en muestra de ADN



En la población en estudio, se encontró una prevalencia del genotipo heterocigoto 58%, con una presencia del genotipo mutado (677TT) del 16.66% y un 25.33% de alelos silvestre (CC677) para el polimorfismo estudiado.

En los datos se puede observar que los genotipos de la mutación C677T del gen de la MTHFR se distribuyen de igual manera tanto en varones como en mujeres.

La mayoría de los participantes en el estudio fueron mestizos. Tanto en los mestizos como en los miskitos se pudo observar una distribución con predominio de heterocigotos. En los mayagnas se identificó un 100% de homocigotos. (Tabla 1, ver anexo 1: gráfico 1,2 y 3)

**Tabla 1. Resultados epidemiológica de la prevalencia del polimorfismo del gen de la MTHFR**

	CC		CT		TT	
	n	%	N	%	N	%
<b>Genotipo del MTHFR</b>	38	25.33	87	58.00	25	16.66
<b>Sexo (M/F)</b>	21/17	14/11.33	42/45	28/30	12/13	8/8.66
<b>Etnias:</b>						
<b>Mestizos</b>	36	25.88	82	58.99	21	15.10
<b>Miskitos</b>	2	22.22	5	55.55	2	22.22
<b>Mayagnas/Criollos</b>	0	0	0	0	2	100

TT: Homocigotos para variedad mutante de la MTHFR; CT: heterocigotos; CC: homocigotos para la variedad silvestre o normal  
SPSS, Licencia de Bioquímica Clínica

En los quince departamentos de Nicaragua se observó una distribución genotípica variada. En casi todos los departamentos hubo un predominio de genotipo heterocigoto. En la Región Autónoma Atlántica del Norte (RAAN) hay un predominio de genotipo mutado (27.27%) y una menor presencia del genotipo silvestre (4.54%). En la ciudad de León se puede observar un predominio de genotipo heterocigoto, sin embargo se encontró la mayor presencia del genotipo silvestre (33.96%). En el Estelí al norte de Nicaragua no se encontró el genotipo mutado, sin embargo, tanto el genotipo silvestre como heterocigoto se presentó en igual proporción. (Tabla 2, anexo 1: gráfico 4)



**Tabla 2: Distribución de genotipos en los departamentos de Nicaragua**

	CC		CT		TT		N N
	N	%	n	%	n	%	
León	18	33.96	29	54.71	6	11.32	53
Chinandega	4	21.05	11	57.89	4	21.05	19
RAAN	1	4.54	15	68.18	6	27.27	22
RAAS	3	37.5	3	37.5	2	25	8
Estelí	5	50	5	50	0	0	10
Matagalpa	2	13.33	11	73.33	2	13.33	15
Otros*	5	21.7	13	56.52	5	21.7	23

TT: Homocigotos para variedad mutante de la MTHFR; CT: heterocigotos; CC: homocigotos para la variedad silvestre o normal, \*Otros: Madriz, Managua, Jinotega, Chontales, Masaya, Rivas, Carazo y Rio San Juan, RAAN: Región Autónoma del Atlántico Norte; RAAS: Región Autónoma del Atlántico Sur.

Se calculó la frecuencia alélica, encontrándose una frecuencia para el alelo C de 0.5451% y para el alelo T de 0.4581%. (Tabla 3)

**Tabla 3: Frecuencia de los alelos C y T**

Alelos	Frecuencia
C	0.5451
T	0.4581

Para evaluar la población en estudio se aplicó la ley de Hardy-Weinberg, se observó que la población se encuentra en equilibrio para la mutación C677T del gen MTHFR. Se aplicaron pruebas no paramétrica de Mann-Whitney, obteniéndose  $p < 0.05$  ( $p = 0.038$ ), considerando los resultados con significancia estadística (Tabla 4)

**Tabla 4. Frecuencia genéticas observadas y esperadas del polimorfismo C677T del gen de la MTHFR**

Genotipo	N° observado	Frecuencias observada	N° esperado	Frecuencias esperadas	X <sup>2</sup>
CC	38	0.2971	44.56	0.2973	0.9657
CT	87	0.4994	74.92	0.4957	1.9477
TT	25	0.2062	30.93	0.2066	1.1369
N	150	1	150	1	4.0503* (g.l= 1) p= 0.038

CC: CC677; CT: C677T; TT: 677TT; X<sup>2</sup>: Chi Cuadrado; g.l: Grados de libertad.



## DISCUSIÓN

Se estudiaron 150 muestras de ADN de sangre periférica de estudiantes de la carrera de medicina, para determinar la presencia de la mutación polimórfica C677T del gen de la MTHFR, en relación a sus características en sexo, etnia y procedencia.

La prevalencia del genotipo mutado fue de 16.6%, similar a la reportada en poblaciones hispánicas en Estados Unidos, con un 17.7%, Italia 15.3%, Norte de China 19.8%, sin embargo esta prevalencia difiere de la reportada en países con poblaciones similares a la población estudiada como Costa Rica con un 25% en población general, México 32.2%, y otras con menor presencia de la mutación como Canadá con 5.3%, en la población blanca y Asiáticos de Estados Unidos con 2.7% y 3.8% respectivamente, e Israel 8.6%<sup>(11)</sup>. La mutación del polimorfismo causa una reducción de la actividad enzimática alrededor del 30% en los individuos heterocigotos y un 60% en los homocigotos. La importancia de realizar este estudio fue conocer la prevalencia general de la mutación en la población nicaragüense para evaluar en un futuro los efectos de esta mutación.

Los genotipos del gen del MTHFR se encuentran distribuidos de igual manera tanto en los varones así como en las mujeres, coincidiendo con lo reportado en un estudio realizado en la población de Nuevo León, México y Madrid <sup>(58, 79, 80)</sup>. Esto puede ser según la ley de Hardy – Weinberg debido a que los individuos de una población contribuyen de igual manera en el pool genético, y los cruces se realizan al azar y no por selección.

En América Latina se reportó un aumento significativo de genotipo mutado en las poblaciones américo-indias similares a la población estudiada. En la población en estudio se analizó las etnias y se observó una distribución genotípica acorde al equilibrio de Hardy - Weinberg en la población mestiza y miskitos, similar a la chorotega en Costa Rica con 30.83%, los indios Yupka del oeste del Venezuela, cinco tribus de amazonia brasileña, e Indios de la Amazonia Parakana 15%, 7.8% y



1.2% respectivamente <sup>(13, 14, 15)</sup>. Los datos presentados en este estudio diferente a la etnia guaymi en Costa Rica con una frecuencia de 70% respectivamente<sup>(12)</sup>. Este equilibrio de las etnias mestiza y miskitos se puede explicar debido a que la población en estudio cumple con las condiciones para mantener el equilibrio poblacional donde se asume que no hay selección, son poblaciones grandes, no hay cambios en la frecuencia alélica debido a fluctuaciones al azar y si se asume que hay migración permitiendo la introducción de nuevos genes en la población provocando una variabilidad genética. En las etnias criollas y mayagnas el predominio del genotipo mutado se explica debido a que estos grupos se mantienen aislados y al aumento de la consanguineidad por el alto grado de endogamia alteran por ende las condiciones para que el equilibrio poblacional se mantenga sin modificación alguna.

Al ser el primer estudio que se realiza sobre la prevalencia del genotipo del gen de la enzima MTHFR (C677T) y exponen la frecuencia de distribución del genotipo por departamentos en la población nicaragüense no podemos realizar un análisis comparativo interno, sin embargo se puede observar que en la mayoría de los departamentos predomina el genotipo heterocigoto, con un predominio del genotipo silvestre en la región del pacífico nicaragüense en cambio en el atlántico norte hay una mayor presencia del genotipo mutado, similar a la distribución de Costa Rica<sup>(12)</sup>. Esta diferencia encontrada se puede deber a las características migratorias de nuestra población nicaragüense; la región del Pacífico colonizado predominante por los españoles y el Atlántico por los ingleses, los cuales mantuvieron casi intactas su acervo genético a diferencia de los españoles.

Se puede observar al comparar la frecuencia alélica de la población en estudio con la de otros países, que la población nicaragüense posee una distribución similar a la del reportada en el resto de países en América, tales como México, Colombia y población hispana en Estados Unidos (0.547%, 0.453%; 0.513%, 0.487% y 0.577%, 0.423% respectivamente tanto para el alelo C como el T); en Europa, Italia reporta una frecuencia de 0.532% para el alelo C, y 0.468% para el alelo T. Sin embargo las datos que se presentan en este estudio difieren de los reportados en Asia centro-



occidente (India 0.990% y 0.010%; Irán 0.755% y 0.246%; para alelo C como para el alelo T.) Asia Oriental entre ellos China y Turquía con una frecuencia del alelo C y T de 0.798% y 0.202%; 0.850% y 0.150% <sup>(24)</sup>.

La distribución de la frecuencia genotípica observada del gen de la MTHFR tiene un comportamiento similar a la población colombiana e italiana para el genotipo silvestre 0.280% y 0.292%; para el genotipo heterocigoto 0.467% y 0.479%; y para el genotipo mutado 0.253% y 0.229%, respectivamente, a la vez difiere de otros países<sup>(24)</sup>.



## CONCLUSIÓN

- ❖ En la población en estudio se determinó una prevalencia de la variante polimórfica C677T del gen de la 5,10-metiltetrahidrofolato reductasa de 16.66% para el genotipo mutado, 58% de heterocigotos y un 25.33% de genotipo silvestre.
- ❖ Se estimó que la población nicaragüense estudiada se encuentra en equilibrio según la ley de Hardy – Weinberg. Con una frecuencia alélica para el alelo C de 0.5451% y para el alelo T 0.4581%. Una frecuencia genotípica observada para el genotipo silvestre 0.2971%; heterocigoto 0.4994% y genotipo mutado 0.2062%.
- ❖ Se comparó con otros estudios similares en poblaciones latinoamericanas, donde los hallazgos encontrados fueron similares.



## RECOMENDACIONES

Realizar estudios posteriores para:

- ❖ La detección de la variante polimórfica C677T del gen de la 5,-10-metilterahidrofolato reductasa en poblaciones específicas de Nicaragua.
- ❖ Realizar estudios donde se pueda evaluar la presencia de la concentración plasmática de la homocisteína, el nivel de folato, el estado nutricional y la presencia de la mutación, debido a que los portadores de la mutación tiene un 30% de la actividad in vitro de la enzima MTHFR.
- ❖ Estudiar la presencia de la variante A1298C en los casos que presentan el genotipo mutado 677TT, debido a que su ligamiento genético es de una distancia de 2.1kb.
- ❖ Evaluar la asociación de la mutación C667T del gen de la enzima MTHFR y la presencia de patologías específicas que afectan la población nicaragüense, entre ellas las enfermedades cardiovasculares, abortos espontáneos y cáncer de colon, mama, pulmón y los defectos en el tubo neural; para que el personal de salud pueda brindar un mejor abordaje en los pacientes portadores de esta mutación.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Mudd SH, Freeman JM. N-5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency and schizophrenia: A working hypothesis. *J. psychiat. Res.* 1974;11:259–62.
2. Freeman JM, Finkelstein JD, Mudd SH. Folate-responsive homocystinuria and “schizophrenia”. A defect in methylation due to deficient 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity. *The New England journal of medicine.* 1975 Mar 6;292(10):491–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1117892>
3. Kang SS, Wong PW, Susmano a, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *American journal of human genetics.* 1991 Mar;48(3):536–45. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1682970&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
4. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet.* 1994;7(jun):195–200.
5. Goyette P, Frosst P, Rosenblatt DS, Rozen R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *American journal of human genetics.* 1995 May;56(5):1052–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1801446&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
6. Hultdin J, Van Guelpen B, Winkvist A, Hallmans G, Weinehall L, Stegmayr B, et al. Prospective study of first stroke in relation to plasma homocysteine and MTHFR 677C>T and 1298A>C genotypes and haplotypes - evidence for an association with hemorrhagic stroke. *Clinical chemistry and laboratory medicine: CCLM / FESCC [Internet].* 2011 Sep [cited 2013 Apr 28];49(9):1555–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21631392>
7. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends in pharmacological sciences.* 2001 Apr;22(4):195–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11282420>
8. Angchaisuksiri P, Pingsuthiwong S, Sura T. Prevalence of the C677T Methylenetetrahydrofolate Reductase Mutation in. 2000;10400:191–6.



9. Chavez B L, Salazar L, Brilla S A, Herrmann FH. Estudio de factores trombogénicos en pacientes menores de 45 años con infarto del miocardio . Revista Costarricense de Cardiología . scielocr ; 2002. p. 5–10.
10. Salazar-Sánchez L, Chaves L, Cartin M, Schuster G, Wulff K, Schröder W, et al. Common polymorphisms and cardiovascular factors in patients with myocardial infarction of Costa Rica. Revista de biología tropical. 2006 Mar;54(1):1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18457169>
11. Herrmann FH, Salazar-Sánchez L, Schuster G, Jiménez-Arce G, Grimm R, Gomez X, et al. Prevalence of eight molecular markers associated with thrombotic diseases in six Amerindian tribes and two African groups of Costa Rica. American journal of human biology: the official journal of the Human Biology Council. 2004 [cited 2013 May 9];16(1):82–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14689519>
12. Vizcaíno G, Diez-Ewald M, Herrmann FH, Schuster G, Pérez-Requejo JL. Relationships between homocysteine, folate and vitamin B12 levels with the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, in Indians from Western Venezuela. Thrombosis and haemostasis. 2001 Jan;85(1):186–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11204578>
13. Franco RF, AG A, JF G, J E, MA. Z. Analysis of the 677 C-->T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. Thrombosis and haemostasis. 1998 Jan;79(1):119–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9459335>
14. Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, et al. Prevalence of the mutation C677-->T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. American journal of medical genetics. 1998 Jul 24;78(4):332–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9714434>
15. Ibarra Rojas E. Fronteras étnicas en la conquista de Nicaragua y Nicoya entre la solidaridad y el conflicto 800d.c- 1544. San Jose, Costa Rica: Universidad de Costa Rica; 2001. p. 232.
16. Rodríguez-Guillén MDR, Torres-Sánchez L, Chen J, Galván-Portillo M, Blanco-Muñoz J, Anaya MA, et al. Maternal MTHFR polymorphisms and risk of spontaneous abortion. Salud pública de México. 2009;51(1):19–25. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2890227&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
17. Cyril C, Rai P, Chandra N, Gopinath PM, Satyamoorthy K. MTHFR Gene variants C677T, A1298C and association with Down syndrome: A Case-control



- study from South India. *Indian journal of human genetics*. 2009 May [cited 2013 Mar 11];15(2):60–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2910950&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
18. Mao R, Fan Y, Chen F, Fu S. Genetic polymorphism of MTHFR G1793A in Chinese populations. *European journal of epidemiology* [Internet]. 2008 Jan [cited 2013 Mar 11];23(5):363–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18409008>
  19. Varga E a, Sturm AC, Misita CP, Moll S. Cardiology patient pages. Homocysteine and MTHFR mutations: relation to thrombosis and coronary artery disease. *Circulation*. 2005 May 17 [cited 2013 Mar 2];111(19):e289–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15897349>
  20. Gilbody S, Lewis S, Lightfoot T. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genetic polymorphisms and psychiatric disorders: a HuGE review. *American journal of epidemiology*. 2007 Jan 1 [cited 2013 Aug 25];165(1):1–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17074966>
  21. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies: A HuGE Review Vol. 151, No. 9 Printed in U.S.A. Lorenzo. *American Journal of Epidemiology*. 2000;151(9).
  22. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society* [Internet]. Department of Human Genetics, McGill University Health Center, Montreal, Quebec, Canada H3H 1P3.; 1998 Aug;9(8):652–6. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/9680386>
  23. Sabbagh AS, Mahfoud Z, Taher A, Zaarti G, Daher R, Mahfouz RA. High prevalence of MTHFR gene A1298C polymorphism in. *Genet Test*. 2008;12(1):2008.
  24. Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Redlund M, et al. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase ( ). *J Med Genet*. 2003;40(Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase ( ): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide)::619–625.
  25. Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, Wasserman CR, Lammer EJ. Maternal vitamin use, genetic variation of infant methylenetetrahydrofolate reductase, and risk for spina bifida. *American journal of epidemiology* [Internet]. 1998 Jul 1;148(1):30–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9663401>



26. Martínez-Frías ML, Bermejo E, Rodríguez-Pinilla E, Scala I, Andria G, Botto L, et al. Frecuencia de la mutación 677C-T del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa en una muestra de 652 recién nacidos de toda España. 2004;122(10):361–4.
27. Zappacosta B, Romano L, Persichilli S, Cutrone L a., Graziano M, Vitrani a., et al. Genotype Prevalence and Allele Frequencies of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T and A1298C Polymorphisms in Italian Newborns. *Laboratory Medicine*. 2009 Nov 30 [cited 2013 May 9];40(12):732–6. Available from: <http://labmed.ascpjournals.org/cgi/doi/10.1309/LMBES080OMMANDOZ>
28. Tripathi R, Tewari S, Singh PK, Agarwal S. Association of homocysteine and methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T) gene polymorphism with coronary artery disease (CAD) in the population of North India. *Genetics and molecular biology*. 2010 Apr;33(2):224–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3036870&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
29. Guzmán N, Salazar LA. Asociación de variantes funcionales en genes del metabolismo de la homocisteína con riesgo de trombosis venosa profunda e hiperhomocisteinemia en individuos del Sur de Chile deep venous thrombosis risk and hyperhomocysteinemia in Southern. *Rev Chil Cardiol*. 2011;30(45):28–32.
30. Markus H, Kapozsta Z, Ditrich R, Wolfe C, Ali N, Powell J, et al. Increased Common Carotid Intima-Media Thickness in UK African Caribbeans and Its Relation to Chronic Inflammation and Vascular Candidate Gene Polymorphisms. *Stroke*. 2001 Nov 1 [cited 2013 May 9];32(11):2465–71. Available from: <http://stroke.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/hs1101.098152>
31. Iqbal MP, Fatima T, Parveen S, Yousuf F a, Shafiq M, Mehboobali N, et al. Lack of association of methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T mutation with coronary artery disease in a Pakistani population. *Journal of molecular and genetic medicine: an international journal of biomedical research [Internet]*. 2005 Jan;1(1):26–32. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2702065&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
32. Sinthuwiwat T, Poowasanpetch P, Wongngamrunroj A, Promso S, Auewarakul C, Mooney S, et al. High-resolution melting curve analysis for genotyping of common SNP in MTHFR gene using fixed-cell suspension. *Molecular and cellular probes*. Elsevier Ltd; 2008 [cited 2013 May 9];22(5-6):329–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18725286>



33. Boris M, Goldblatt A, Galanko J, Ph D, James SJ. Association of MTHFR Gene Variants with Autism. 2004;9(4):2–4.
34. Micheal S, Qamar R, Akhtar F, Khan MI, Khan WA, Ahmed A. MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms and homocysteine levels in primary open angle and primary closed angle glaucoma. *Molecular vision*. 2009 Jan;15(June):2268–78. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2776344&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
35. Marisol GR. Frecuencia del polimorfismo C677T de la 5,10 metiltetrahidrofolato reductasa, MTHFR, en una población nicaragüense de Madre de individuos con espina bífida. 2010. p. 47.
36. Tom S, Andrew R, Humana PG, Edición T. *Genetica Humana*. Tercera Ed. McGraw-Hill; 2011. p. 676.
37. Cummings MR. *Human Heredity Principles and Issues*. 9th ed. Belmont: Brooks/Cole; 2011. p. 467. Available from: [www.cengage.com/global](http://www.cengage.com/global)
38. Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ. *Genetica Médica*. Barcelona, España: Elsevier España, S.L; 2011. p. 350. Available from: [www.studentconsult.com](http://www.studentconsult.com)
39. Nussbaum R., McInnes R., Willard H. *Thompson & Thompson Genética en Medicina* Thompson & Thompson. 7a ed. Barcelona, España: Elsevier. Inc; 2008. p. 584.
40. Turnpenny PD, Ellard S. *Emery's Elements of Medical Genetics*. 13a ed. Barcelona, España: Elsevier.S.i; 2009. p. 435.
41. Philippe J, Macieira-Coelho A, Rhoads R. *Epigenetics and Chromatin*. MÜLLER WE., editor. Germany: Springer; 2005. p. 264.
42. Brookes a J. The essence of SNPs. *Gene*. 1999 Jul 8;234(2):177–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395891>
43. Guthery SL, Salisbury B a, Pungliya MS, Stephens JC, Bamshad M. The structure of common genetic variation in United States populations. *American journal of human genetics*. 2007 Dec [cited 2013 Mar 3];81(6):1221–31. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2276358&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
44. Ross PL, Lee K, Belgrader P. Discrimination of single-nucleotide polymorphisms in human DNA using peptide nucleic acid probes detected by



- MALDI-TOF mass spectrometry. Analytical chemistry [Internet]. 1997 Oct 15;69(20):4197–202. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9337595>
45. Koch HG, Nabel P, Junker R, Auberger K, Schobess R, Homberger a, et al. The 677T genotype of the common MTHFR thermolabile variant and fasting homocysteine in childhood venous thrombosis. *European journal of pediatrics*. 1999 Dec;158 Suppl S113–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10650848>
  46. Gaughan DJ, Barbaux S, Kluijtmans L a, Whitehead a S. The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene*. 2000 Oct 31;257(2):279–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11080594>
  47. Id G. MTHFR methylenetetrahydrofolate reductase ( NAD ( P ) H ) [ Homo. 2013;
  48. Approved H, Symbol G.\* 607093 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase; mthfr. (2000).
  49. El-Baz R, Settin A, Ismaeel A, Khaleel AA, Abbas T, Tolba W, et al. MTHFR C677T, A1298C and ACE VD polymorphisms as risk factors for diabetic nephropathy among type 2 diabetic patients. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system: JRAAS*. 2012 Dec [cited 2013 Aug 24];13(4):472–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22554825>
  50. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom H, Kok FJ, Schouten EG. MTHFR 677C → T Polymorphism and Risk of Coronary Heart Disease A Meta-análisis. *JAMA*. 2002;288(16):2023–32.
  51. Van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet*. 1995 Oct 21;346(8982):1070–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7564788>
  52. O’Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, Kirke PN, Johnson Z, Conley M, et al. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? *American journal of medical genetics*. 2002 Jan 15;107(2):151–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11807890>
  53. Frosst P, Zhang Z, Pai a, Rozen R. The methylenetetrahydrofolate reductase (Mthfr) gene maps to distal mouse chromosome 4. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* [Internet]. 1996 Nov;7(11):864–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8875901>



54. Pierce BA. Genetics A Conceptual Approach [Internet]. Fourth. Susan W, editor. United States of America: Kate Ahr Parker; 2012. p. 857. Available from: [www.whrfreeman.com](http://www.whrfreeman.com)
55. Beiguelman B. GENÉTICA DE POPULAÇÕES HUMANAS. Sociedade Brasileira de Genética, SBG; 2008. p. 239.
56. Thomas P, Fenech M. Methylenetetrahydrofolate reductase , common polymorphisms , and relation to disease . Vitam Horm. 2008;6729(08):6729.
57. Nelen WL, Blom HJ, Steegers E a, den Heijer M, Thomas CM, Eskes TK. Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. Obstetrics and gynecology [Internet]. 2000 Apr;95(4):519–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10725483>
58. Zetterberg H, Regland B, Palmér M, Ricksten A, Palmqvist L, Rymo L, et al. Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. European journal of human genetics : EJHG. 2002;(September 2001):113–8.
59. Nelen WL, Bulten J, Steegers E a, Blom HJ, Hanselaar a G, Eskes TK. Maternal homocysteine and chorionic vascularization in recurrent early pregnancy loss. Human reproduction (Oxford, England). 2000 Apr;15(4):954–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10739849>
60. Govindaiah V, Naushad SM, Prabhakara K, Krishna PC, Radha Rama Devi A. Association of parental hyperhomocysteinemia and C677T Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism with recurrent pregnancy loss. Clinical biochemistry. 2009 Mar [cited 2013 Aug 23];42(4-5):380–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19111530>
61. Unfried G, Griesmacher A, Weismüller W, Nagele F, Huber JC, Tempfer CB. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and idiopathic recurrent miscarriage. Obstetrics and gynecology. 2002 Apr;99(4):614–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12039122>
62. Stonek F, Hafner E, Philipp K, Hefler L a, Bentz E-K, Tempfer CB. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and pregnancy complications. Obstetrics and gynecology. 2007 Aug;110(2 Pt 1):363–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17666612>
63. Sohda S, Arinami T, Hamada H, Yamada N, Hamaguchi H, Kubo T. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and pre-eclampsia. Journal of medical genetics [Internet]. 1997 Jun;34(6):525–6. Available from:



<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1050983&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

64. Van Der Put NM, Eskes TKAB, Blom HJ. Is the common 677C T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. *Q J Med.* 1997;90:111–5.
65. Posey DL, Khoury MJ, Mulinare J, Adams MJ, Ou CY. Is mutated MTHFR a risk factor for neural tube defects? *Lancet* [Internet]. 1996 Mar 9;347(9002):686–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8596396>
66. Jm B, BI Z, Em G, Haddad R, Mf F, Vannucchi H, et al. Genetic polymorphisms modulate the folate metabolism of Brazilian individuals with Down syndrome . *2012;39(10):11033.*
67. Rai AK, Singh S, Mehta S, Kumar A, Pandey LK, Raman R. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms are risk factors for Down's syndrome in Indian mothers. *Journal of human genetics* [Internet]. 2006 Jan [cited 2013 Aug 25];51(4):278–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16489479>
68. Torrico F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodriguez P, Torrico M-C, Dramaix M, et al. Maternal Trypanosoma cruzi infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *The American journal of tropical medicine and hygiene* [Internet]. 2004 Feb;70(2):201–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14993634>
69. Gülec S, Aras O, Akar E, Tutar E, Omürlü K, Avci F, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and risk of premature myocardial infarction. *Clinical cardiology* [Internet]. 2001 Apr;24(4):281–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11303694>
70. Smulders YM, Stehouwer CD a. Folate metabolism and cardiovascular disease. *Seminars in vascular medicine* [Internet]. 2005 May;5(2):87–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16047262>
71. Arinami T, Yamada N, Yamakawa-Kobayashi K, Hamaguchi H, Toru M. Methylenetetrahydrofolate reductase variant and schizophrenia/depression. *American journal of medical genetics* [Internet]. 1997 Sep 19;74(5):526–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9342205>
72. Solana ME, Alba Soto CD, Fernández MC, Poncini C V, Postan M, González Cappa SM. Reduction of parasite levels in blood improves pregnancy outcome during experimental Trypanosoma cruzi infection. *Parasitology* [Internet]. 2009



May [cited 2013 Aug 6];136(6):627–39. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366478>

73. Bjelland I, Tell GS, Vollset SE, Refsum H, Uerland M. Folate, Vitamin B 12 , Homocysteine, and the MTHFR 677C-T Polymorphism in Anxiety and Depression The Hordaland Homocysteine Study. *Arch Gen Psychiatry*. 2003;60(June):618–26.
74. Wang B, Jin F, Kan R, Ji S, Zhang C, Lu Z, et al. Association of MTHFR gene polymorphism C677T with susceptibility to late-onset Alzheimer ' s disease . *J Mol Neuosci*. 2005;27(1):23–7.
75. Wang B, Koga K, Osuga Y, Cardenas I, Izumi G, Takamura M, et al. Toll-like receptor-3 ligation-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in human trophoblasts. *Endocrinology* [Internet]. 2011 Dec [cited 2013 Aug 6];152(12):4984–92. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21952237>
76. Pereira AC, Miyakawa A a, Lopes NHM, Soares PR, de Oliveira S a, Cesar L a M, et al. Dynamic regulation of MTHFR mRNA expression and C677T genotype modulate mortality in coronary artery disease patients after revascularization. *Thrombosis research* [Internet]. 2007 Jan;121(1):25–32. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17604826>
77. Turello R, Rentsch K, Di Paolo E, Popovic MB. Renal failure after high-dose methotrexate in a child homozygous for MTHFR C677T polymorphism. *Pediatric blood & cancer* [Internet]. 2008 Jan;50(1):154–6. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17387702>
78. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out produce for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988;16(3):1215.
79. Aguirre-Rodriguez AA, Martínez de Villarreal LE, Velazco-Campos M del R, Sampallo-Hernández E, Esmer-Sánchez M del C. Referencias Prevalencia del GHO JHQ 07 + ) 5 HQ XQD muestra de la población de Nuevo León , México Referencias. *Salud pública de México*. 2008;50(1):5–7.
80. Ruiz-Delgado G, Ruiz-Argüelles G. Estudios en México sobre el gen MTHFR. *Salud pública de México*. 2008;50(5 septiembre-octubre):353.



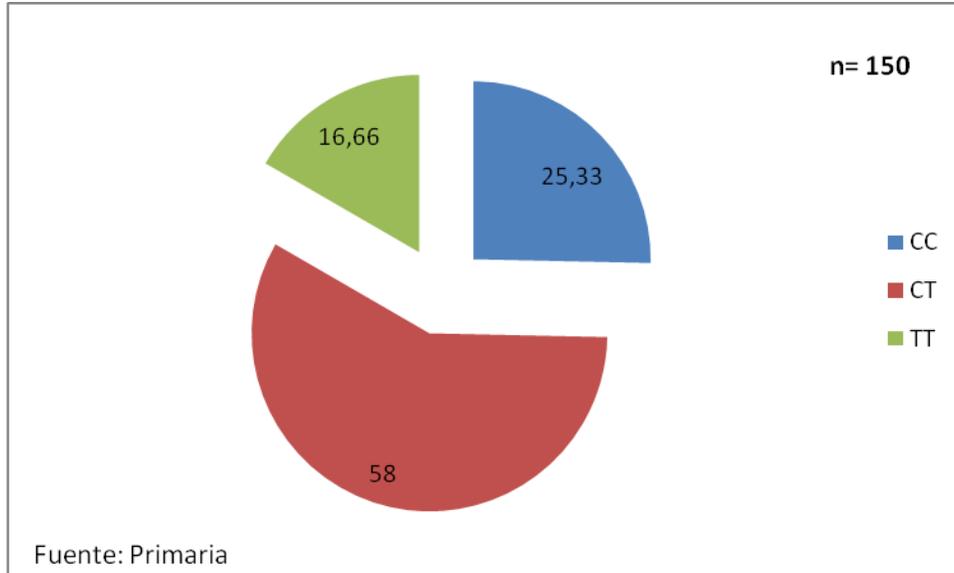
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA –León  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
MAESTRÍA DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS Y BIOLOGÍA CELULAR

# ANEXOS

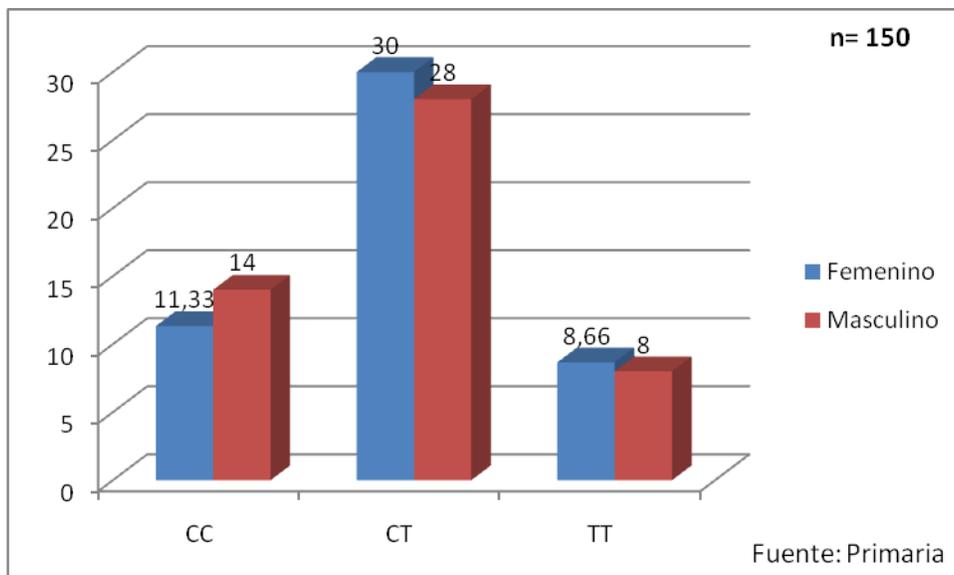


**ANEXO 1**

**Gráfico 1: Distribución del genotipo del polimorfismo del gen MTHFR**

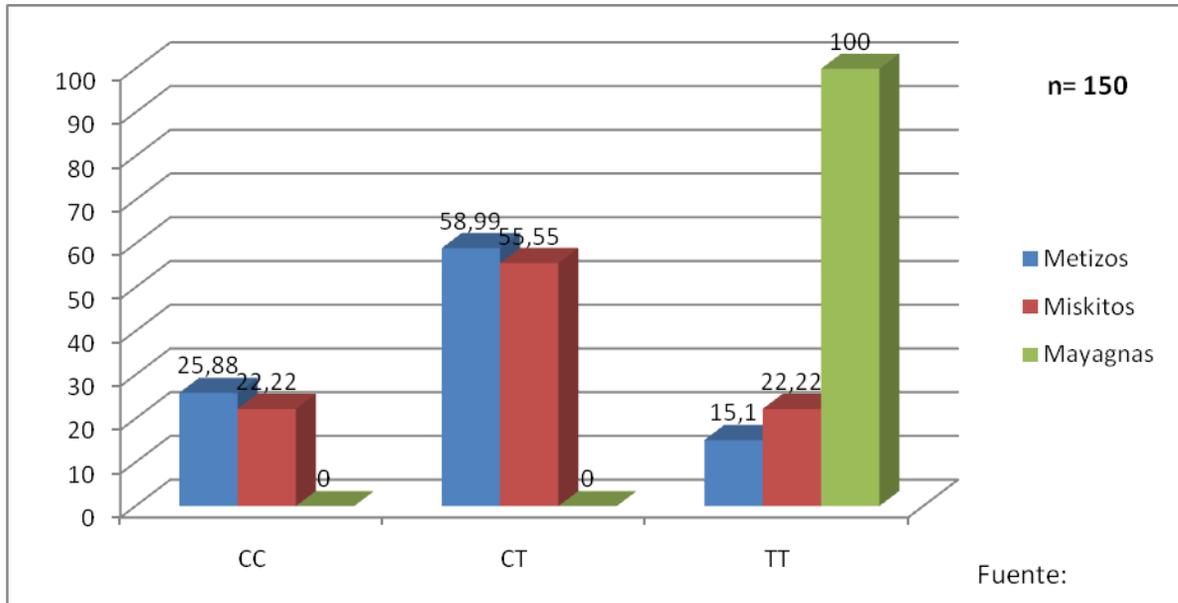


**Gráfico 2: Distribución según sexo de la prevalencia del polimorfismo del gen MTHFR**

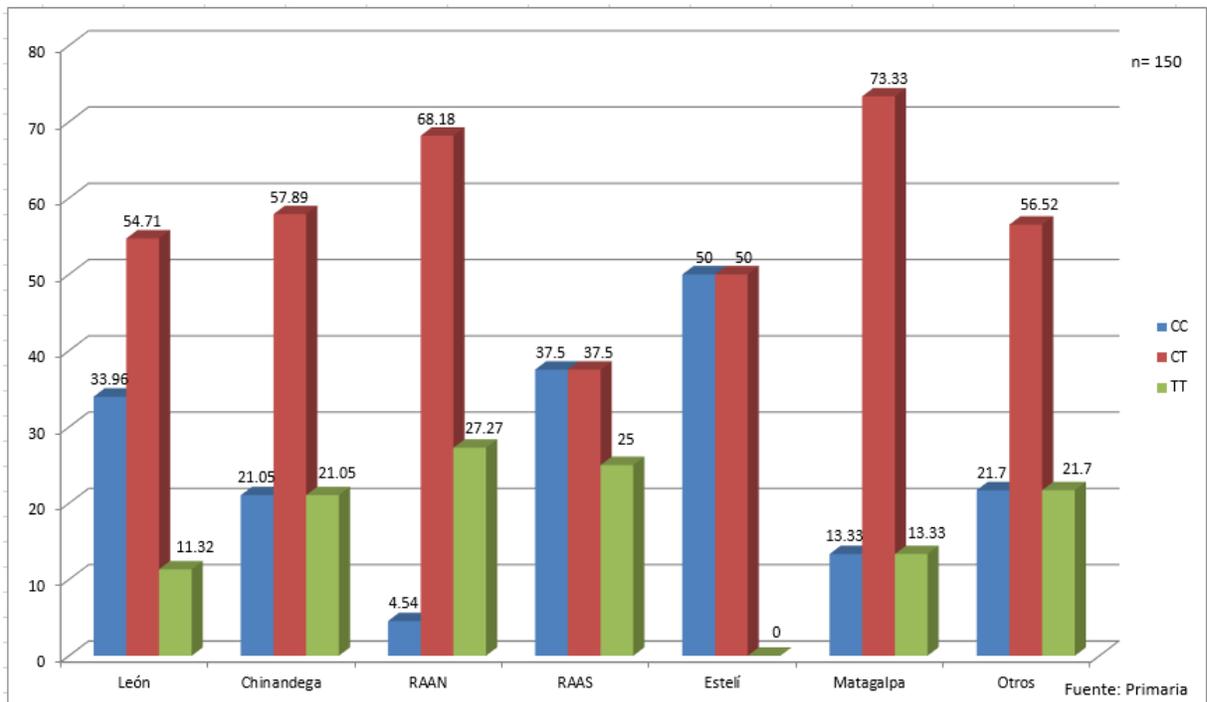




**Gráfico 3: Distribución según raza de la prevalencia del polimorfismo del gen MTHFR**



**Gráfico 4: Distribución de genotipos en los Departamentos de Nicaragua.**





## ANEXO 2

---

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

(Para ser sujeto de investigación)

Actividad: *polimorfismo C677T del gen de la MTHFR en los estudiantes de la facultad de ciencias Médicas de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua - León.*

**Investigador Principal:** MSc. María José Moreira-Espinoza Dra. Yondra Carolina Vanegas-Padilla. Dra. Ana Yoe Cheng Chang Chan

**Nombre del Paciente:** .....

**A- PROPOSITO DEL ESTUDIO:** estimada(o) Sr (a) participante o representante legal. El C677T es una variante polimórfica del gen de la MTHFR que se encuentra relacionado con múltiples patologías que afectan al ser humano desde la embriogénesis hasta el transcurso de su vida, heredándose de manera autosómica recesiva. Se debe a un cambio de un aminoácido de alanina a valina, provocando una versión termolábil de la enzima que produce menor actividad influyendo en los niveles séricos de la homocisteína. Esta enzima es clave en el metabolismo de folatos y homocisteína, catalizando el metabolismo del ácido fólico y nucleótidos necesarios para la síntesis y reparación del DNA. Debido a que el polimorfismo no afecta el fenotipo, este no puede ser responsable de enfermedades genéticas. Sin embargo puede contribuir a la susceptibilidad de dicha enfermedad, por lo cual es de gran utilidad su identificación. Por lo que se está realizando una investigación para determinar la prevalencia del *Polimorfismo C677T del gen de la MTHFR en los estudiantes de la facultad de ciencias Médicas de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua León.* Motivo por el cual se le van a hacer algunas preguntas y estudios con el fin de realizar una línea de base de esta alteración.



**B- ¿QUÉ SE HARÁ?** Si acepto participar en este estudio se me realizará lo siguiente:

- ❖ Se le harán algunas preguntas, la información es confidencial.
- ❖ Se le tomará una muestra de sangre total, material nuevo, lancetas nuevas y descartables.
- ❖ Se les realizará determinación de la presión sanguínea, glucosa, medición de la cintura, una vez que se concluyan todas las pruebas, donde se indicarán sus valores y una interpretación resumida de los mismos.

Este examen especial de ninguna manera va a representar un gasto económico para usted (es) y sólo se requerirá de la toma de una muestra de 5ml de sangre para esta determinación, la cual se obtendrán en el momento.

**C- RIESGOS:** Al participar en este estudio no se expondrá a ningún riesgo, ya que las muestras de sangre se obtendrán al igual que se toma una muestra para otro examen de laboratorio donde todo el material a usar (agujas, jeringas, tubos) son nuevos, estériles y desechables, por lo que no existe riesgo de infección o contaminación.

**D- BENEFICIOS:** Como resultado de mi participación en este estudio, el beneficio que obtendré conocer si presento la variante polimórfica C677T del gen de la MTHFR.

**E-** He hablado con MSc. María José Moreira-Espinoza, Dra. Yondra Carolina Vanegas-Padilla y Dra. Ana Yoe Cheng Chang Chan sobre este estudio y me ha contestado todas mis preguntas.

**F-** Recibiré una copia de esta fórmula firmada para mi uso personal.

**G-** Mi participación en este estudio es voluntaria. Tengo el derecho de negarme a participar o a discontinuar mi participación en cualquier momento, sin que esta decisión afecte la calidad de la atención médica (o de otra índole) que requiero.



**H-** Mi participación en este estudio es confidencial, los resultados podrían aparecer en una publicación científica o ser divulgados en una reunión científica pero de una manera anónima.

**I-** No perderé ningún derecho legal por firmar este documento.

**J-** Las muestras obtenidas para esta investigación podrían transferirse a otros investigadores bajo el Acuerdo de Transferencia de Material Biológico (MTA).

### **CONSENTIMIENTO**

He leído o se me ha leído, toda la información descrita en esta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por lo tanto, accedo a participar como sujeto de investigación en este estudio

---

Nombre, cédula y firma del sujeto

fecha

---

Nombre, cédula y firma del testigo

fecha

---

Nombre, cédula y firma del Investigador que solicita el consentimiento  
fecha

---

Aprobación del comité de Ética Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua León.



### ANEXO 3

#### Instrumento de Recolección de datos

*Polimorfismo C677T del gen de la MTHFR en los estudiantes de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua León*

##### I. Datos Generales:

Carnet: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_ N° de Ficha: \_\_\_\_\_

Lugar de residencia (Dirección): \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

Sexo: Fem: \_\_\_\_ Masc: \_\_\_\_ Raza: \_\_\_\_\_

Departamento de Origen: \_\_\_\_\_

Número de cédula: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Email: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

Estado civil: Soltero \_\_\_\_ Casado \_\_\_\_

Peso: \_\_\_\_\_ kgs Estatura: \_\_\_\_\_ mts.

Circunferencia abdominal: \_\_\_\_\_ cms

Año lectivo: II \_\_\_\_ III \_\_\_\_ IV \_\_\_\_ V \_\_\_\_ VI \_\_\_\_

Hace ejercicio constante: Si \_\_\_\_ No \_\_\_\_

1 día a la Semana \_\_\_\_ 3 día a la Semana \_\_\_\_ 5 día a la Semana \_\_\_\_

##### II. Determinación Molecular del Marcador genético

Alelo Silvestre CC \_\_\_\_ Heterocigoto CT \_\_\_\_ Homocigoto TT \_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma del Estudiante

\_\_\_\_\_  
Nombre, firma del Investigador



**ANEXO 4**



**Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua  
 Facultad de Ciencias Médicas  
 UNAN - León**

COMITÉ DE ETICA PARA INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS (CEIB)  
 "DR. URIEL GUEVARA GUERRERO"  
 FWA00004523 / IRB00003342

León, 28 de mayo de 2012

Miembros Honorarios

Dr. Uriel Guevara Guerrero (q.e.p.d.)  
 Dr. Jaime Granera Soto

Comité Ejecutivo

Dra. Nubia Pacheco Solís  
 Presidenta

Dr. Efrén Castellón C.  
 Vice - Presidente

Dr. Orlando Morales N.  
 Secretario

Miembros alternos

Dr. Jorge Alemán Pineda  
 Dra. Eilette Valladares C.  
 Lic. Irela Romero S.

ACTA No. 17

Lic. María José Moreira Espinoza  
 Dra. Yondra Carolina Vanegas Padilla  
 Investigadoras  
 Sus Manos

Estimadas Académicas:

Por este medio se les informa que el CEIB recibió el trabajo de Investigación titulado: "Estudio piloto del polimorfismo C6771 del gen de la MTHFR en los estudiantes de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León", para su evaluación, al respecto le comunicamos lo siguiente: *Se da por aprobado dicho trabajo, ya que consideramos que se ajusta a las buenas prácticas clínicas y a los principios de la Declaración de Helsinki.*

Como Comité de Ética, valoramos muy positivamente la importancia de este trabajo y esperamos que sus resultados sean útiles. Copia de esta carta debe estar presente en el Protocolo e informe final.

Sin otro particular, nos es grato suscribirnos.

*[Signature]*  
 Dra. NUBIA PACHECO SOLÍS  
 Presidenta del CEIB  
 Facultad de CC. MM.



*[Signature]*  
 Dr. ORLANDO MORALES N.  
 Secretario del CEIB  
 Facultad de CC. MM.

*[Signature]*  
 MSc. ORLANDO MAYORGA PÉREZ  
 Vice-Decano  
 Facultad de Ciencias Médicas

cc. Archivo  
 NAPS/rhl

2012: Año del Bicentenario y Refundación de la Universidad

Fundado en la Facultad de  
 Ciencias Médicas  
 UNAN - León  
 Nicaragua  
 1996  
 comiteceunaleon@gmail.com  
 Telf: 2311-4675

Expiration data  
 03/07/2014



**ANEXO 5**



**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**  
**Vicerrectoría de Investigación**  
**CIHATA**

Fax (506) 2223-1385 ☎ (506) 2222-1581. HSJD Ext. 2331



**CIHATA**

**Nombre :** \_\_\_\_\_

**No. Muestra:** L-12- ###

**No. Expediente:** #####

**Procedencia:** UNAN - León

**Fecha:** 21/06/2012

Estimado Doctor (a):

En el presente estudio genético-molecular, a este paciente se le practicó el siguiente análisis:

**- MTHFR C677T**

Este análisis se realizó mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (**PCR**) y la detección de la mutación mediante enzimas de restricción, siguiendo las técnicas descritas, (C677T MTHFR: Kluijtmans et al., Am. J. Human Genetics 1996; 58,35-41).

En esta muestra encontró el siguiente hallazgo:

Determinación	Hallazgo	Interpretación
MTHFR		

Agradeciendo su atención, se despide, atentamente:

**Dra. Lizbeth Salazar S (PhD)**  
 Especialista en Hematología   cód. 713

**MSc. Edel María Paredes**  
 Profesor titular  
 Departamento de Ciencias Morfológicas



## ANEXO 6



### III CONGRESO DE INVESTIGACION de la Red Centroamericana de Exbecarios del DAAD para la Investigación, CADAN:R.

## Estudio preliminar de la prevalencia del C677T Metiltetrahidrofolato reductasa en población estudiantil de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León

E. M. Paredes (1), Y. C. Vanegas (1), M. J. Moreira-Espinoza (1), L. Salazar-Sánchez (2)

- 1) Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León.
- 2) Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Costa Rica  
Email: ([sporseia@hotmail.com](mailto:sporseia@hotmail.com))

*Introducción:* El C677T es una variante polimórfica del gen de la enzima 5,10-metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR), el cual su actividad enzimática reducida se encuentra relacionado con múltiples patologías que afectan al ser humano desde la embriogénesis hasta el transcurso de su vida. En Nicaragua ha sido poco estudiado, encontrándose una frecuencia en mujeres madres de individuos con espina bífida, de 7%, por lo que el *Objetivo:* del estudio fue estimar la prevalencia de la variante polimórfica C677T del gen de la MTHFR en muestras de ADN de estudiantes de la facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León; para establecer una línea base en nuestro país, que permita continuar con estudios moleculares en poblaciones afectadas clínicamente. *Método:* se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en muestras de ADN de estudiantes, con previa aprobación del protocolo por parte del comité de Ética de la Facultad de Ciencias Médicas. Para el procesamiento de la muestra se utilizó el método reportado por Frosst et al. *Resultados:* se encontró prevalencia de 21.3% para los estudiantes con genotipo homocigota, un 23.4% para el silvestre, y una prevalencia de 55.3% de heterocigotos. Las frecuencias alélicas encontradas para el alelo T es de 0.4837, 0.4612 para el alelo C. Las frecuencias génicas encontradas fueron de para los homocigotos de 0.2127, 0.2310 para los WT y 0.0995 para los heterocigotos, por lo que se puede decir que la población en estudio se encuentra en Equilibrio de Hardy-Weinberg. Estos datos se puede observar que la variante polimórfica C677T del gen MTHFR tiene un comportamiento similar a los estudios realizados en poblaciones similares como es la población costarricense con un 25.80%. Por lo que se pretende ampliar la muestra para lograr obtener una significancia estadística de la población nicaraguense.