

Homocisteína, Ácido Fólico y Vitamina B12 y su relación con los polimorfismos de la MTHFR (C677T) y CBS (C1080T, C699T, 844Ins68pb) en pacientes colombianos con Hipertensión Arterial Esencial sin y con Síndrome Coronario Agudo

LEIDY SUÁREZ FERNÁNDEZ

TRABAJO DE GRADO
BACTERIOLOGÍA



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C. 2011

Homocisteína, Ácido Fólico y Vitamina B12 y su relación con los polimorfismos de la MTHFR (C677T) y CBS (C1080T, C699T, 844Ins68pb) en pacientes colombianos con Hipertensión Arterial Esencial con y sin Síndrome Coronario Agudo.

LEIDY SUÁREZ FERNÁNDEZ

Ingrid Schuller PhD.
Decana Académica
Facultad de Ciencias

Diana Patiño MSc
Directora
Carrera de Bacteriología

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C.
2011

Artículo 23, Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

*Dedico este trabajo mis padres mis
mentores y guías, a mi hermano mi
mejor amigo, a quienes les debo lo que
soy hoy día y a quienes quiero por ser mi
base, mi apoyo y mi fuerza para salir
adelante.*

Leidy Suárez Fernández

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios quien en cada momento ha sido luz y guía, y que además ha puesto en el camino todas aquellas personas y oportunidades para aprender y crecer.

A mis padres quienes me han apoyado en cada paso que he dado, que con su esfuerzo han hecho posible todo lo que ahora tengo, y han facilitado mis procesos académicos y personales.

A mi hermano que siempre creyó en mí y me llenó de fuerza para seguir adelante en los momentos que casi llego a desfallecer.

A la doctora Martha Bermúdez por la oportunidad que me dio de aprender y conocer cosas nuevas, por su apoyo, sus enseñanzas y su dedicación durante todo el proceso de aprendizaje que fue el desarrollo de este trabajo.

Al Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana, y a todos los que allí trabajan, por abrirme sus puertas, brindarme su apoyo y sobre todo enseñarme tantas cosas que aportaron al desarrollo de este trabajo.

A todas las personas que confiaron en mí para sacar adelante mis proyectos, y que con uno u otro gesto me mostraron su apoyo y sus mejores deseos.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	1
3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
4. MARCO TEÓRICO.....	3
4.1.SCA E HIPERTENSIÓN ARTERIAL	3
4.2.HOMOCISTEINA	4
4.3.ACIDO FÓLICO Y VITAMINA B12.....	5
4.4.POLIMORFISMOS.....	6
4.4.1. MTHFR 677C>T.....	6
4.4.2. CBS 699 C>T.....	6
4.4.3. CBS 1080 C>T.....	7
4.4.4. CBS 844ins68.....	7
5. OBJETIVOS.....	7
5.1.OBJETIVO GENERAL.....	7
5.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
6. METODOLOGÍA.....	8
6.1.TIPO DE ESTUDIO.....	8
6.2.POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	8
6.3.PROCEDIMIENTO.....	8
6.3.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	8
6.3.2. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO FÓLICO Y VITAMINA B12.....	8
6.3.3. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS	9
6.4.ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	9
7. RESULTADOS.....	10
8. DISCUSIÓN.....	14
9. CONCLUSIONES.....	16
10.RECOMENDACIONES.....	16

11.REFERENCIAS	17
12.ANEXOS.....	22
12.1. ANEXO 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	23
12.2. ANEXO 2: ENCUESTA.....	31
12.3. ANEXO 3: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE AND.....	35
12.4. ANEXO 4: PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN.....	36
12.5. ANEXO 5: PROTOCOLO ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.....	37
12.6. ANEXO 6: PROTOCOLO DE DIGESTIÓN.....	37
12.7. ANEXO 7: PROTOCOLO SDS-PAGE.....	37
12.8. ANEXO 8: PROTOCOLO COLORACIÓN CON NITRATO DE PLATA.....	38

Homocisteína, Ácido Fólico y Vitamina B12 y su relación con los polimorfismos de la MTHFR (C677T) y CBS (C1080T, C699T, 844Ins68pb) en pacientes colombianos con Hipertensión Arterial Esencial sin y con Síndrome Coronario Agudo

1. RESUMEN

La hiperhomocisteinemia es un desorden metabólico, en el cual se encuentran niveles elevados de homocisteína en sangre, en lo que se ha descrito, existe una asociación con el desarrollo de SCA e HTA, y cuyas causas están implícitas en su metabolismo, dentro de lo que se destacan los polimorfismos de la enzimas MTHFR y CBS, además del déficit de los cofactores enzimáticos como la vitamina B12 y el ácido fólico, por esta razón se determinó la presencia de los polimorfismos 677 C>T de la MTHFR, 699 C>T, 1080 C>T y 844ins68pb de la CBS, y su relación con las concentraciones plasmáticas de vitamina B12, ácido fólico y homocisteína. Para llevar a cabo esto, se cuantificó la homocisteína, el ácido fólico y la vitamina B12 a 504 pacientes con hipertensión arterial esencial con o sin SCA. Mediante la técnica de PCR se amplificaron los polimorfismos 677 C>T de la MTHFR, 699 C>T, 1080 C>T y 844ins68pb de la CBS y se determinó la presencia de estos mediante RFLP. Para determinar la relación de estos con los niveles plasmáticos de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12 se utilizó la prueba de OR. El mayor porcentaje de la población correspondió a mujeres (56,55%) y se encontró que los hombres presentaron niveles más aumentados de homocisteína y niveles más disminuidos de ácido fólico y vitamina B12 que en las mujeres. Se encontró relación inversa entre las concentraciones de hcy y vitamina B12, pero no se encontró relación con las concentraciones de ácido fólico. Se encontró relación entre los niveles elevados de hcy y el polimorfismo C677T y C1080T, las concentraciones disminuidas de vitamina B12 se relacionó significativamente con los polimorfismos C677T y C699T, y los niveles disminuidos de ácido fólico se relacionaron con la presencia del polimorfismo C1080T aunque no fue significativa. La inserción de 68pb no se relacionó con ninguno de los factores de riesgo de SCA evaluados.

2. INTRODUCCIÓN

Según la OMS la enfermedad cardiovascular, es el conjunto de aquellas enfermedades que comprometen tanto el corazón como los vasos sanguíneos (1), dentro de los cuales se incluye el Síndrome Coronario agudo (SCA), y cuyos factores de riesgo son la dieta, el sedentarismo y el tabaco, además de la HTA (2). La HTA es un desorden común de amplia distribución mundial, se define como los valores superiores a 140/90 mm Hg de la presión arterial (2,3) y al ser uno de los factores de riesgos modificable de enfermedad cardiovascular (3), es importante que sea identificada y controlada a tiempo. La HTA está clasificada dentro de dos grupos, la secundaria que se desarrolla posterior a otras patologías como la diabetes (3,4), y la primaria o esencial en donde las causas son idiopáticas, donde se presume que está involucrada la interacción entre la genética y el ambiente del individuo (2,5). Actualmente se ha asociado la hiperhomocisteinemia como un factor desencadenante de SCA y de HTA (4). La homocisteína es un aminoácido intermediario del metabolismo de la

metionina, vía en la que participa una serie de enzimas y cofactores (6). En Colombia, las enzimas más estudiadas han sido la Cistationin β sintasa (CBS) y la Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y los polimorfismos CBS 699 C>T, CBS 1080 C>T, 844in68pb y MTHFR 677C>T, involucrados con el deficiente funcionamiento de estas dos (7). Los cofactores enzimáticos más importantes dentro del metabolismo de este aminoácido son el ácido fólico y la vitamina B12, los cuales participan en la vía de la transulfuración de la Hcy y en la remetilación de esta a metionina (8,9) respectivamente. Al encontrarse la presencia de alguno de los polimorfismos, en un individuo, se esperaría que los niveles de los cofactores disminuidos y por lo tanto una alta posibilidad de desarrollo tanto de HTA como de SCA, si un no la ha presentado (8).

3. JUSTIFICACIÓN

La Enfermedad Cardiovascular (ECV) es uno de los problemas de mayor impacto en la salud pública, y es considerada una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo (3). Frecuentemente acuden al servicio de urgencias, personas que presentan dolor torácico, a los cuales se les realizan múltiples pruebas para determinar la severidad de la afección, pruebas que de igual forma sirven para determinar si están o no en riesgo de desarrollar SCA (10). El SCA es el grado severo de la enfermedad coronaria y se refiere al proceso isquémico que involucra al miocardio (11), el cual puede ser detectado mediante cambios en un electrocardiograma, sin embargo no siempre está este hallazgo presente, lo cual hace que el diagnóstico sea difícil y tenga que ser confirmado por el laboratorio (10,12). Según los indicadores básicos publicados por la OPS en el año 2009, la tasa de mortalidad por enfermedad isquémica al miocardio es 148,9/100.000 habitantes (13), tasa que podría llegar a disminuir previniendo el desarrollo de este en la población, para lo cual es necesario la identificación de marcadores predictores de riesgo. Dentro de los factores de riesgo para desarrollar ECV están los hábitos alimenticios y la hipertensión entre otros (14). La hipertensión se considera como un factor de riesgo moderado (*PublicHealthAssociation*) para el desarrollo de ECV y falla cardíaca (4) y se relaciona con el estilo de vida de los individuos, así como la diabetes y la obesidad (14) aumentando con la edad, y sin existir diferencias significativas entre hombres y mujeres (15), aunque diversos estudios demuestran lo contrario (16). Se considera que en el mundo alrededor de 1 billón de casos de personas sufren de hipertensión, de las cuales aproximadamente 7.1 millones de personas al año, mueren en el mundo a causa de esta (3). Según la Organización Panamericana de la Salud, la prevalencia en Colombia es del 12,6%, y se encuentra con mayor frecuencia en las mujeres que en los hombres en los grupos de mayor edad (10,16). Al igual que el SCA, esta se considera una enfermedad de alto costo (3), que de ser prevenida, los costos que anualmente le implican al sistema de salud colombiano pueden verse disminuidos. Recientemente se conoce como factor de riesgo de ECV, los niveles disminuidos de las vitaminas del grupo B (Ácido fólico, B12 y B6) (8) principales cofactores enzimáticos de la Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y la Cistationin β sintasa (CBS), enzimas involucradas de manera importante dentro del metabolismo de la Homocisteína (8, 9,19, 20). La hcy es un aminoácido que al encontrarse en altas concentraciones plasmáticas (hiperhomocisteinemia), es considerado uno de los mecanismos relacionados con el desarrollo de HTA y de ECV (4). La regulación de las concentraciones

de homocisteína está dada por dos vías principales que son la remetilación y transulfuración, las cuales pueden estar alteradas principalmente por defectos genéticos (17,18) y deficiencia nutricional (24). Las deficiencias nutricionales involucran vitaminas necesarias para el metabolismo de homocisteína, como la vitamina B12, y el ácido fólico (23). Y los defectos genéticos involucran alteraciones en los genes que codifican para las enzimas que participan en estos procesos (37, 7, 43). Por tal razón se pretende estudiar la relación entre las concentraciones plasmáticas de homocisteína, ácido fólico y la vitamina B12 con los polimorfismos de los genes codificantes de las enzimas involucradas.

4. REFERENTES CONCEPTUALES Y MARCO TEÓRICO

4.1 SCA e HIPERTENSIÓN ARTERIAL

El SCA es un conjunto de signos y síntomas, que se presentan de forma aguda como manifestación de isquemia miocárdica (2, 12). En este están incluidos la angina inestable y el infarto agudo al miocardio (2). Según la OMS anualmente fallecen 15 millones de personas a consecuencia de cardiopatías isquémicas, (44) que se deben a la evolución de los factores de riesgo, dentro de los cuales está incluida la HTA (2). La presión arterial o presión sanguínea se define como la fuerza que ejerce la sangre sobre las paredes de los vasos sanguíneos, su función es mantener estable el flujo sanguíneo hacia y desde todos los tejidos, y especialmente hacia los órganos vitales como el corazón y el cerebro (25,26). El criterio óptimo con respecto al riesgo cardiovascular es de 120/80, sistólica/diastólica aunque puede disminuir (Hipotensión) o aumentar (Hipertensión) (25).

La hipertensión arterial (HTA) está definida como la presión arterial mayor a 140/90 mm Hg, y es la causante de un gran porcentaje de muertes en todo el mundo (25). Existen varios tipos de HTA, dentro de los que se destaca la HTA secundaria poco común (10%), se desarrolla posterior a patologías cardiovasculares comunes y se presenta en edades menores (3); con mayor prevalencia (90%) se encuentra la HTA esencial o primaria, afecta alrededor de 1 billion de personas en el mundo (27), y aunque no se conoce exactamente la fisiopatología de esta, se sabe que está relacionada con alteraciones en los componentes (remodelamiento vascular, procesos de estrés oxidativo, entre otros) (28) que intervienen en la homeostasis del cuerpo, se encuentra más relacionada con la edad avanzada (27).

Existen distintos factores para el desarrollo de la HTA esencial, relacionadas con la industrialización de los países como la obesidad, aspectos de la dieta, el sedentarismo, los niveles de lípidos, y algunos biomarcadores inflamatorios (14), además de otros factores relacionados con la edad, el género, la raza y la herencia. Recientemente se conoce la asociación del desarrollo de HTA con niveles elevados de homocisteína (Hcy) (4), un aminoácido que se obtiene a partir de la demetilación de la metionina proveniente de la dieta (29, 30), metabólicamente la Hcy es importante para el reciclamiento de folato intracelular, el catabolismo de la colina, de betaina y la formación de cistina y cisteína (6). Se describe un nuevo factor de riesgos, los niveles plasmáticos disminuidos de las vitaminas del grupo B (ácido fólico, vitamina B12 y vitamina B6). Alterando así diversas vías metabólicas en las que intervienen (8).

4.2 HOMOCISTEINA

Al ingerir los alimentos, principalmente de origen animal, se ingieren con ellos metionina (20) esta va a ser metabolizada para convertirse en cisteína, teniendo como intermediarios varias formas de Hcy (18). El metabolismo de la Hcy se lleva a cabo mediante dos vías principales, en las cuales participan una serie de enzimas y cofactores enzimáticos (Figura 1). En la primera vía, la finalidad es remetilación de la Hcy para convertirla nuevamente en metionina. En esta vía intervienen enzimas como MS (metionina sintetasa), que utiliza Vitamina B12 como cofactor, haciendo que la Hcy se remetile y se convierta nuevamente en metionina, al transferirle un grupo metilo de la 5-MTHF (5-Metiltetrahidrofolato) a la Hcy. En la segunda vía se transulfura la Hcy por la acción del CBS (Cistationin β Sintasa) que conjuga la Hcy con serina para producir cistationina, la cual es escindida en cistina y α -Oxobutirato por acción de la γ -Cistationasa (18, 20, 21, 33). Este metabolismo puede verse afectado por diversos componentes, dentro de los que se incluye una alta ingesta de metionina, haciendo que la capacidad de metabolismo de este en las células se sobre pase. La disminución en el consumo de Vitaminas como la B12, B2 Y B6, que participan como cofactores de las enzimas involucradas en además de Ácido Fólico donador de grupos folato, impidiendo que haya una remetilación de la Hcy o anomalías en el transporte o el metabolismo de estas. Mutaciones o variaciones en los genes (Polimorfismos) que codifican para las enzimas involucradas en el metabolismo de esta (21), como la Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) que participa en la remetilación de la Hcy para convertirla nuevamente en metionina, y la Cistationin β sintasa (CBS) la cual participa en la eliminación de la Hcy, en forma de cistationina. Todas estas alteraciones pueden generar el fenómeno conocido como Hiperhomocisteinemia (<15mg/L), considerado como factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares, entre otras (22, 24). Diversos estudios han clasificado la hiperhomocisteinemia con un factor de riesgo independiente de enfermedad cardiovascular (6, 21, 23), enfermedad cerebrovascular (10, 17), trastornos del sistema nervioso central como alzheimer y demencia (29, 35, 42) y algunas fracturas asociadas a osteoporosis. Para el tratamiento de esta, se ha venido utilizando suplementos de ácido fólico y vitamina B12, pero en estudios realizados proporcionando a los pacientes los resultados han sido bastante diversos (32).

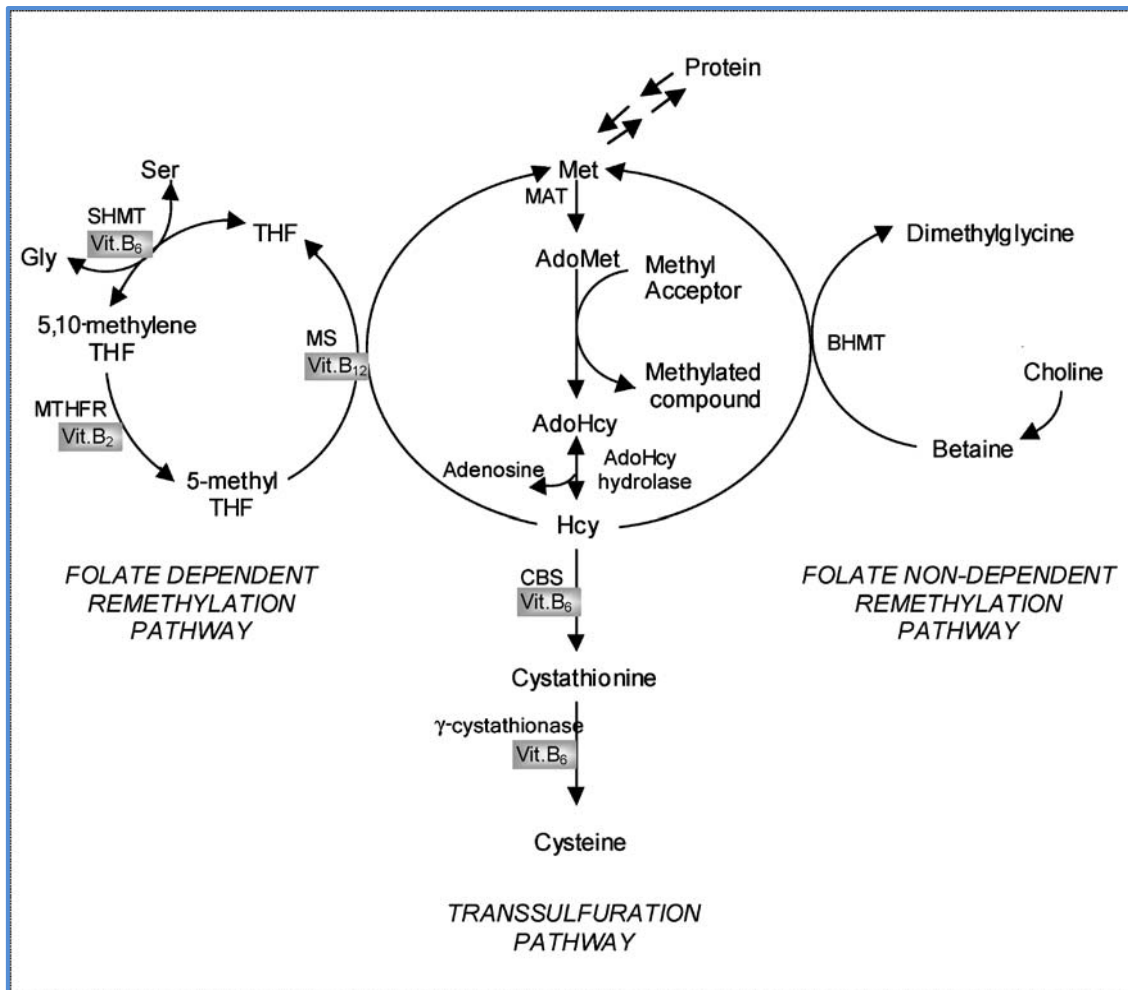


Figura 1. Metabolismo de la Hcy. Castro R *et al.*(21)

4.3 ACIDO FÓLICO Y VITAMINA B12

El ácido fólico y la vitamina B12 son vitaminas pertenecientes al grupo B (31), se ingieren en la dieta principalmente de origen vegetal y animal respectivamente (32), e intervienen en numerosas vías metabólicas.

La vía metabólica de los folatos, es la que permite la transferencia de grupos metilo (21) hacia distintos destinos, como la metilación del ADN (30) y la remetilación de la Hcy para convertirse en metionina (21, 22). La interrupción de esta vía metabólica y del metabolismo de la Hcy es de carácter multifactorial (genético, nutricional y ambiental) y está relacionada con algunas condiciones patológicas entre las que se incluye en personas mayores la enfermedad cardiovascular (8). Así que la deficiencia de folatos, genera alteraciones no solo en la expresión génica al haber una inadecuada metilación del ADN (30), sino que también alteraciones en la regulación de las concentraciones plasmáticas de Hcy (18, 35). Esta vitamina es capaz de disminuir los niveles plasmáticos de la Hcy, al mejorar su metabolismo y estimular las enzimas específicas involucradas (6).

Por otro lado la vitamina B12, es el cofactor de la enzima Metionina Sintasa (MS) (8), la cual permite la transferencia del grupo metilo, obtenido del metabolismo de los folatos, hacia la homocisteína para así conseguir su remetilación y evitar su toxicidad (23).

Al verse afectado el metabolismo de estas vitaminas, se genera hiperhomocisteinemia (29), que es en si la causante del desarrollo de enfermedades cardiovasculares, incluyendo la HTA (23).

4.4 POLIMORFISMOS

Los polimorfismos son variaciones genéticas puntuales, presentes en la secuencia genética de los individuos de una misma especie (36). En relación con niveles bajos de las vitaminas del grupo B y la hiperhomocisteinemia, se han descrito 4 principalmente: c. 677 C>T de la MTHFR. c. 699 C>T, c. 1080 C>T y 844ins68 de la CBS (7, 36-38).

4.4.1 MTHFR 677 C>T:

Este polimorfismo se ha encontrado como factor de riesgo para cáncer colorrectal al existir alteraciones en el metabolismo de la metionina, impidiendo la transferencia de grupos metilo hacia el ADN, es decir se altera la metilación de genes promotores de crecimiento y diferenciación celular, haciendo así que se generen tumores cancerígenos (24). Pero en lo que tiene mayor influencia este polimorfismo es en la hiperhomocisteinemia como riesgo de enfermedad cardiovascular (35).

La MTHFR es una enzima codificada por un gen que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 1 en el locus 36.3 (Cr 1p36.3) (7). La secuencia de este gen tiene 20341 pb, dentro de la que se encuentra una citosina en la posición 677 (39) de forma normal. Se ha descrito principalmente en relación con hiperhomocisteinemia el polimorfismo 677 C>T, el cual corresponde a una variante termolábil de la enzima (38), en donde se cambia una citosina por una timina en la posición 677 (42, 43). Si el polimorfismo está presente, al ser cortado el fragmento con enzimas de restricción, se generan dos fragmentos de 177 y 21 pb, y al no estarlo el producto del corte será un solo fragmento de 198 pb, al no haber un punto de corte para la enzima TaqI. Este polimorfismo se presenta dentro de la población sana con una frecuencia del 0,51 en personas con niveles normales de homocisteína, y en una frecuencia del 0,71 en personas con hiperhomocisteinemia (7).

4.4.2 CBS 699 C>T:

La cistationina β sintasa (CbS) es un tetrámero formado por subunidades de 63 Kd, cada una está unida a dos sustratos, el fosfato de piridoxal (PLP) cofactor que cataliza la síntesis de cistationina a partir de homocisteína y serina, y la adenosilmetionina (32). Esta es codificada por el gen que se encuentra en la región subtelomérica del brazo largo del cromosoma 21 en la banda (21q22) (8) y tiene 23161 pb, (40), dentro de la que se encuentra una citosina (C) en la posición 699, la cual en el polimorfismo es cambiada por una timina (T) (32). La presencia de este polimorfismo es detectada en el laboratorio, a partir de fragmentos de distinto peso (177 y 112 pb) al de la secuencia sin el polimorfismo (177,92 y 20 pb), al separar el producto de la digestión con la enzima RsaI en gel de poliacrilamida (34, 35). Este polimorfismo es encontrado dentro de la población colombiana sana en una frecuencia del 0,21 en las personas con niveles normales de Hcy y del 0,42 en las personas con hiperhomocisteinemia (35).

4.4.3 CBS 1080 C>T:

Otro polimorfismo relacionado con la actividad de la CBS, es el 1080 C>T, (40) dentro de la que se encuentra en la posición 1080 una timina en vez de una citosina como sería normalmente (7). Si el polimorfismo no está presente, al ser cortado el fragmento con enzimas de restricción, se generan tres fragmentos de 219, 178 y 68 pb, y al estar presente el polimorfismo, el producto del corte, el resultado serán solamente dos fragmentos de 246 y 219 pb, al perderse un sitio de reconocimiento de la enzima BstUI (7,). Este polimorfismo se encuentra dentro de la población colombiana sana con una frecuencia del 0,71 en personas con niveles normales de homocisteína, y en una frecuencia del 0,35 en personas con hiperhomocisteinemia (7).

4.4.4 CBS 844in68:

Este polimorfismo consiste en una inserción de 68 pb en el fragmento 844 del exón 8 (29,33), que se ha descrito como factor protector para el desarrollo de trombosis (7), aunque existen resultados contradictorios en estudios relacionados con la relación entre la presencia del polimorfismo y el desarrollo de enfermedades vasculares (36). Este polimorfismo por sí solo no se considera como factor de riesgo para hiperhomocisteinemia, sin embargo si se encuentra este polimorfismo acompañado de otro polimorfismo como el C677T de la MTHFR, se convierte en un factor de riesgo importante para la hiperhomocisteinemia (43).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar la presencia de los polimorfismos C677T de la MTHFR y C699T, C1080T, 844ins68pb de la CBS y su relación con los niveles plasmáticos de ácido fólico y vitamina B12 en pacientes colombianos con hipertensión arterial esencial con y sin síndrome coronario agudo.

5.2 Objetivos Específicos

- Describir la concentración plasmática de homocisteína, vitamina B12 y ácido fólico.
- Identificar la presencia o ausencia de los polimorfismos de la MTHFR y la CBS en la población colombiana con hipertensión arterial esencial con y sin síndrome coronario agudo.
- Determinar la relación entre las concentraciones plasmáticas de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12 con los polimorfismos de la MTHFR y la CBS.

6. METODOLOGÍA

6.1 Tipo de Estudio: Se llevó a cabo un estudio transversal analítico de casos y controles, con dos controles por cada caso relacionados por género y edad.

6.2 Población de estudio

Se realizó el estudio con 504 pacientes, con edades comprendidas entre los 30 y los 90 años de edad, con diagnóstico de hipertensión arterial, seleccionados a partir de listados de pacientes de los principales Hospitales de los municipios de Pacho, Cáqueza, Pamplona, Chía y Girardot, las ciudades de Cartagena, Cúcuta, Villavicencio, Popayán, Cali y Bogotá. El tamaño de la muestra fue calculado, mediante el programa Epidat 4.0, con la herramienta tamaño de muestra para estudios de casos y controles, teniendo en cuenta que la proporción de los controles expuestos es de 27% y la proporción de casos expuestos es de 40%, con un nivel de confianza del 95%, con un error tipo II del 80%, un OR esperado del 4,75, y la asociación de casos y controles de 1:2. Los pacientes que estuvieron de acuerdo firmaron el consentimiento informado (ANEXO 1), además de diligenciar una encuesta, para indagar sobre los factores de riesgo cardiovascular conocidos (ANEXO 2), de utilidad para otros estudios. Se analizaron las variables categóricas de la siguiente forma: individuos con diagnóstico de hipertensión arterial por antecedentes, clasificados por sexo femenino y masculino.

Se incluirán los pacientes que cumplan con los siguientes criterios:

- Edad mayor de 18 años
- Presión arterial $\geq 140/90$ mm Hg
- Estar de acuerdo y firmar el consentimiento informado

6.2.1 Definición de Casos y Controles

Se consideró como casos todo aquel paciente que tuviera diagnóstico clínico de SCA, que no haya desarrollado un evento coronario en mínimo dos meses anteriores a la toma de la muestra.

Los controles se definieron como todo paciente que presentara HTA esencial que no haya presentado nunca SCA.

6.3 Procedimiento

6.3.1 Obtención de la Muestra:

Posterior a la firma del consentimiento informado, se obtuvieron las muestras de sangre por punción venosa a los pacientes en condiciones de ayuno no menor a 10 horas ni mayor a 14 horas, en tubo seco para la medición de ácido fólico y vitamina B12, y en tubo con EDTA para el estudio genético.

6.3.2 Análisis bioquímico

La homocisteína, el ácido fólico y la vitamina B12 fueron medidos en plasma heparinizado, mediante un enzoinmunoanálisis en fase sólida, competitivo y quimiluminiscente, en el equipo INMULITE® 2000.

6.3.3 Análisis de polimorfismos

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de sangre total obtenida en tubos con EDTA (ácido etilen-diamino-tetraacético) mediante la técnica PROBE, según el protocolo estandarizado por el laboratorio del Instituto de Genética Humana (ANEXO 3). Posteriormente, se realizó la amplificación de los 4 exones a analizar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando un par de iniciadores para cada exón (FW y RW). Las condiciones de la PCR para el análisis del polimorfismo 677 de la MTHFR y de los polimorfismos 699, 1080 y Exón 8 de la CBS, están determinadas bajo un protocolo establecido por el laboratorio (ANEXO 4).

Después de la amplificación los productos de la PCR correspondiente a los polimorfismos, se observaron en geles de agarosa al 1% y se revelaron con bromuro de etidio (ANEXO 5). Para los todos los polimorfismos excepto la 844ins68 pb, se analizan los fragmentos polimórficos generados con enzimas de restricción (restrictionfragmentlengthpolymorphism, RFLP) (ANEXO 6) en geles de poliacrilamida (ANEXO 7) al 12% y se utilizaron las enzimas de restricción -Rsal, -BstUI, +TaqI. Posteriormente, se realizó la coloración de los geles con nitrato de plata para evidenciar las bandas obtenidas tras la digestión (ANEXO 8).

6.4 Análisis de datos

Los datos fueron recopilados en el programa Excel ®, Microsoft Office 2010, separándolos por sexo y en casos y controles.

Las variables cuantitativas de edad, y concentraciones plasmáticas de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12 fueron analizadas mediante estadística descriptiva utilizando medias y desviaciones estándar, con el fin de caracterizar la población estudiada. La diferencia entre géneros se realizó con una comparación de medias (t student) de cada una de las variables, con un valor estadísticamente significativo $p < 0,05$. Los polimorfismos fueron analizados, determinando la prevalencia de cada uno de estos en la población general. Como estrategia para determinar la relación entre las concentraciones plasmáticas de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12 con los polimorfismos se realizó un Odds Ratio. Las pruebas estadísticas fueron realizadas con los programas Epidat versión 4.0.

7. RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio un total de 504 pacientes hipertensos, 73 hombres y 95 mujeres con su respectivo controles 146 hombres 190 mujeres. La relación hombres: mujeres fue de 7:10 al encontrarse un 43,45% y 56,55% respectivamente (Figura 2).

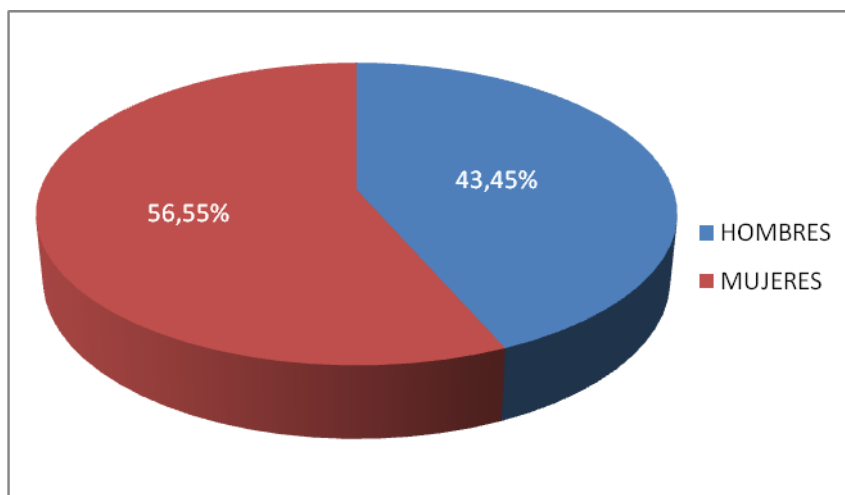


Figura 2. Distribución del Grupo 1. Relación Hombres: Mujeres 7:10

Se cuantificaron las concentraciones plasmáticas de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12. En la tabla 1 se muestran las características de la población en general y la diferencia entre hombres y mujeres, de acuerdo a las variables cuantitativas de edad, concentración de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12, en términos de media y desviación estándar.

Tabla 1. Descripción de variables cuantitativas de la población general entre hombres y mujeres

n	Hombres 73 146	Mujeres 95 190	p
Edad	61,01±10,70 61,56*±11,16*	64,08±10,93 63,48*±10,69*	0,234
Ácido Fólico	11,58±6,53 5,43*±3,9*	10,67±6,73 5,4*±2,37*	0,236
Vitamina B12	381,39±198,43 502,29*±237,59*	441,05±215,16 487,23*±226,75*	0,063
Homocisteína	20,56±69,35 10,25*±5,05*	11,25±5,16 8,3*±3,5*	0,021

* Valores correspondientes a la población control. n=Número de pacientes.

En la tabla 2 se muestran las características de la población, y la diferencia entre casos y controles, de acuerdo a las variables cuantitativas de edad, concentración de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12, con rangos determinados según la media más o menos la desviación estándar, y clasificados según los niveles de riesgo de SCA.

Tabla 2. Categorización de las variables cuantitativas según los niveles de riesgo cardiovascular

Característica	NIVEL DE RIESGO A 10 AÑOS			
	Total	Bajo <10%	Intermedio 10-20%	Alto >20%
Edad				
Hombres	61 ± 10,7	49,5 ± 8,4	61 ± 8,27	67,68 ± 9,29
Mujeres	61,37 ± 10,9*	50,25 ± 7,25*	62,48 ± 7,9*	68,04 ± 10,4*
	63,6 ± 10,5	61,9 ± 8,9	69,68 ± 12,27	70,67 ± 13,65
	63,5 ± 10,7*	60,89 ± 10,23*	70,16 ± 9*	71,6 ± 6,35*
Homocisteína				
Hombres	12,52 ± 5,7	10,6 ± 2,8	12,34 ± 3,63	12,65 ± 4,67
Mujeres	10,25 ± 5*	9,02 ± 4,17*	10,2 ± 3,4*	10,8 ± 7,3*
	11,25 ± 5,16	11,24 ± 5,56	11,34 ± 3,58	10,7 ± 3,19
	8,3 ± 3,5*	7,9 ± 3,6*	9,14 ± 3,22*	8,61 ± 2,46*
Ácido Fólico				
Hombres	11,6 ± 6,63	8,7 ± 4,8	11,91 ± 4,96	11,4 ± 3,98
Mujeres	5,4 ± 3,9*	5,32 ± 5,02*	5,37 ± 3,75*	5,5 ± 3,07*
	10,6 ± 6,77	10,7 ± 7	11,07 ± 6,1	7,59 ± 4,37
	5,42 ± 2,36*	5,49 ± 2,49*	5,17 ± 2*	5,42 ± 1,28*
Vitamina B12				
Hombres	381,39 ± 198,4	354,7 ± 278,2	412,35 ± 175,7	361,76 ± 177,5
Mujeres	501,6 ± 239*	445,89 ± 217,2*	479,13 ± 229,86*	569,8 ± 248,64*
	443 ± 212,9	429 ± 210,2	515,18 ± 241,09	420,3 ± 96,23
	487,23 ± 226,7*	477,97 ± 223,8*	517,7 ± 233,2*	414 ± 293,09*

* Valores correspondientes a la población control.

Se realizó una comparación de las variables cuantitativas entre hombres y mujeres del grupo de casos, mediante una comparación de medias en donde se encontró una diferencia significativa únicamente en la edad con un $p=0$ de los pacientes clasificados en un bajo riesgo de desarrollo de enfermedad cardiovascular; en cuanto a las otras variables no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre hombres y mujeres (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación entre hombres y mujeres de la población de casos.

CARACTERISTICA	TOTAL	NIVEL DE RIESGO A 10 AÑOS		
		BAJO <10%	INTERMEDIO 10-20%	ALTO >20%
EDAD				
Hombres	61 ± 10,7	49,5 ± 8,4	61 ± 8,27	67,68 ± 9,29
Mujeres	63,6 ± 10,5 p= 0,1174	61,9 ± 8,9 p= 0	69,68 ± 12,27 p= 0,06	70,67 ± 13,65 p= 0,6153
HOMOCISTEINA				
Hombres	12,52 ± 5,7	10,6 ± 2,8	12,34 ± 3,63	12,65 ± 4,67
Mujeres	11,25 ± 5,16 p= 0,1337	11,24 ± 5,56 p=0,66	11,34 ± 3,58 p= 0,3734	10,7 ± 3,19 p= 0,49
ACIDO FOLICO				
Hombres	11,6 ± 6,63	8,7 ± 4,8	11,91 ± 4,96	11,4 ± 3,98
Mujeres	10,6 ± 6,77 p= 0,3408	10,7 ± 7 p= 0,294	11,07 ± 6,1 p= 0,6136	7,59 ± 4,37 p= 0,1296
VITAMINA B12				
Hombres	381,39 ± 198,4	354,7 ± 278,2	412,35 ± 175,7	361,76 ± 177,5
Mujeres	443 ± 212,9 p= 0,0578	429 ± 210,2 p= 0,2407	515,18 ± 241,09 p= 0,1016	420,3 ± 96,23 p= 0,5825

Se identificaron los polimorfismos 677 C/T de la MTHFR, 699 C/T, 1080 C/T y 844ins68pb de la CBS, a los cuales se les determinó la prevalencia, siendo así el polimorfismo C677T heterocigoto fue el que más se encontró presente dentro de la población estudiada y el polimorfismo que menos se encontró fue 844ins68pb de forma homocigota (Tabla 4).

Tabla 4. Prevalencia de los polimorfismos

	n	W/W	W/M	M/M	Frecuencia de alelo M
C667T	168	27,38%	58,33%	14,29%	0,43
	336	*24,11%	*54,17%	*21,73%	*0,49
C699T	168	49,40%	43,45%	7,14%	0,29
	336	*60,42%	*34,52%	*5,06%	*0,22
C1080T	168	51,19%	43,45%	5,36%	0,27
	336	*48,81%	*43,45%	*7,74%	*0,29
844ins68pb	168	86,31%	12,5%	1,19%	0,074
	336	*92,86%	*6,85%	*0,3%	*0,04

n= Tamaño de la población estudiada; W= alelo normal; M= alelo mutado; * controles

Tabla 5. Relación entre los polimorfismos C677T de la MTHFR, C1080T, C699T, 844Ins68pb de la CBS con los niveles plasmáticos de ácido fólico, vitamina B12 y homocisteína en los Casos.

	OR	INTERVALO	p
HCY 677	3,840	1,5484-9,5242	0,0024
VB 677	5,66	1,7338-18,2048	0,0014

HCY: Homocisteína AF: Acido Fólico VB: Vitamina B12

Se encontró relación entre el polimorfismo C677T con niveles elevados de hcy (OR=3,840) y niveles disminuidos de vitamina B12 (OR= 5,66) pero no se encontró relación con las concentraciones plasmáticas de ácido fólico en los casos con SCA, en el grupo control no existió relación entre el polimorfismo con los niveles plasmáticos de hcy, ácido fólico ni vitamina B12. Se encontró relación entre el polimorfismo C699T en los controles (OR=5,88) con niveles elevados de hcy, pero en los casos la relación estuvo entre el polimorfismo y los niveles disminuidos de vitamina B12 (OR=4,3939), y en ninguna de las situaciones se encontró relación entre el polimorfismo y las concentraciones disminuidas de ácido fólico. Respecto al polimorfismo C1080T se encontró relación con niveles aumentados de hcy en los controles (OR= 4,1174), pero no en los pacientes, en los cuales si se encontró una relación entre el polimorfismo y las concentraciones disminuidas de ácido fólico aunque no fue significativa (OR= 4,84). La inserción de 68pb en 844 no tuvo relación con los niveles elevados de homocisteína, no se pudo determinar la relación de este con los niveles plasmáticos de homocisteína en los casos, ni de ácido fólico y vitamina B12 en ninguno de los 2 grupos al no encontrarse pacientes que presentaran el factor de riesgo (844ins68pb) y el evento (hiperhomocisteinemia, o niveles disminuidos de ácido fólico y vitamina B12). La relación entre entre los polimorfismos C677T de la MTHFR, C1080T, C699T, 844Ins68pb de la CBS con los niveles plasmáticos de ácido fólico, vitamina B12 y homocisteína están descritos mediante los OR en la Tabla 5.

8. DISCUSIÓN

En este estudio se encontró, que los determinantes nutricionales son de gran importancia en el desarrollo de SCA, ya que se encontraron más disminuidas las concentraciones de ácido fólico y vitamina B12 a medida que aumenta el riesgo cardiovascular. Igualmente la edad y las concentraciones de homocisteína son parte importante de los factores de riesgo, al encontrar una relación directamente proporcional entre estas y el desarrollo de eventos coronarios (Tabla 2).

En relación con la edad, entre mayor fue esta, se encontraron los niveles de homocisteína mas aumentados y los niveles de vitamina B12 y ácido fólico más disminuidos, lo que puede ser dado por el deterioro progresivo de las funciones fisiológicas del cuerpo con la edad, dentro de las cuales está la disminución de la absorción intestinal de nutrientes, en las cuales podemos incluir las vitaminas reguladoras del metabolismo de la homocisteína, que al absorberse menos, se van a encontrar niveles plasmáticos de estas disminuidos y niveles de hcy

aumentados (45). Esto también puede ser dado ya que con el aumento de la edad también cambian las exigencias nutricionales y hay una disminución en la ingesta de nutrientes (20).

En relación con el sexo los hombres tienen mayor riesgo de desarrollar SCA ya que se encontró que desarrollaron a edades más tempranas un evento cardiovascular, y que además presentan un aumento considerable de los niveles de homocisteína, y disminución de los niveles de las vitaminas con el aumento de la edad, en comparación con las mujeres. Moreiras *et al.* (20), en el estudio SENECA en donde se llevó a cabo un seguimiento por diez años a 1072 personas europeas de edad avanzada con nacidas entre 1913 y 1918, las que se les evaluó la homocisteína y su relación con otras vitaminas, se encontró que a partir de los 10 años de edad aproximadamente, cuando se empieza a dar el desarrollo sexual y producción de los estrógenos en las mujeres, se empezaron a encontrar variaciones significativas de los niveles de homocisteína siendo superiores en hombres que en mujeres. Estas diferencias pueden estar dadas por la función protectora de los estrógenos en las mujeres, ya que se ha visto que los niveles elevados de estrógenos están asociados a concentraciones disminuidas de hcy (47). Estos desencadenan una serie de reacciones que conllevan a vasodilatación al promover la liberación de óxido nítrico, y la regulación de la proliferación y migración celular vascular, retrasando la formación de placas ateromatosas (46), teniendo un papel antagonista con la hcy, ya que esta produce lo contrario a estos efectos (48, 49). Autores han sugerido que el efecto de los estrógenos sobre las concentraciones de hcy, se da por la transaminación de la metionina, que al ser así, se disminuirían las concentraciones de hcy (47).

En el estudio llevado a cabo Kale *et al.* (35) en 2010 con una población de 31 pacientes y 48 controles, con edades entre 18 y 40 años, se encontró que las concentraciones plasmáticas de homocisteína tienen una relación inversa con las concentraciones plasmáticas de vitamina B12, pero no con ácido fólico, encontrándose valores menores de vitamina B12 cuando los valores de homocisteína estuvieron aumentados. Este fenómeno, se encontró también en este estudio (tabla 3), al analizar las concentraciones de la vitamina B12, de ácido fólico y de homocisteína en la población en general. La concentración plasmática de homocisteína igualmente mostró una relación inversa con la vitamina B12 pero no con el ácido fólico.

Se ha descrito que una de las causas de hiperhomocisteinemia es la presencia del polimorfismo C677T de la MTHFR (24, 30, 41), lo que fue confirmado en este estudio al encontrar una relación estadísticamente significativa ($p=0,0024$) entre estos dos factores. Igualmente existen antecedentes de que la vitamina B12 está relacionada con la hiperhomocisteinemia en pacientes con enfermedad cardiovascular (7, 17, 24), además se encontró relación entre el polimorfismo y niveles disminuidos de vitamina B12 ($p=0,00014$) aunque no existen reportes de esta relación. La vitamina B12 es el cofactor de la enzima Metionina Sintasa, que está involucrada en la vía de remetilación de la hcy, que al estar disminuido no permitiría un óptimo funcionamiento de la enzima (28), y al encontrasen estos dos factores en conjunto tendría una significativa relación con niveles aún más elevados de homocisteína, por lo cual se sugiere realizar un estudio en el que se evalúe este concepto. Bermúdez *et al.* (7) describe como factor asociado a hiperhomocisteinemia los polimorfismos de la CBS (C699T, C1080T, 844ins68pb), aunque en los resultados obtenidos mencionan

que el polimorfismo C699T no mostró relación con los niveles de homocisteína en la población sana, al igual que en el presente estudio. En cuanto al polimorfismo C1080T Bermúdez *et al.* (7) encontraron que sí existe una relación significativa con niveles elevados de homocisteína en la población colombiana sana, lo que también ocurre en la población hipertensa que no presenta SCA y no en la que si lo presenta; en la población hipertensa con SCA se encontró relación entre el polimorfismo con niveles disminuidos de ácido fólico aunque no fue significativa ($p= 0,9882$), lo que haría que los niveles de homocisteína estuvieran más aumentados, al existir interferencia en la vía de la transulfuración por el polimorfismo de la CBS enzima encargada de conjugar la Hcy con serina para producir Cistationina (6, 7, 9), y en la vía de la remetilación de la hcy por la deficiencia del folato, el cual es el donador de grupos metilo para que esta reacción suceda (8, 24, 34). En este estudio no se encontró relación entre el polimorfismo 844ins68pb con niveles elevados de homocisteína en ninguno de los dos grupos, lo cual confirma lo descrito por Bermudez *et al.* (7) y Franchis *et al.*(43), al relacionar este polimorfismo con un papel protector de hiperhomocisteinemia.

9. CONCLUSIONES

- Se realizó una descripción de los parámetros bioquímicos, homocisteína, vitamina B12 y ácido fólico en los pacientes para determinar las diferencias significativas entre hombres y mujeres.
- Se identificó la presencia del polimorfismo C677T de la MTHFR con una prevalencia heterocigoto (C/T) del 55,56% y homocigoto (T/T) del 19,25%.
- Se identificó la presencia de los polimorfismos C699T, C1080T y 855ins68b, con una prevalencia del 5,75%, 6,94% y 0,6% respectivamente en su presentación homocigota.
- Los polimorfismos C677T de la MTHFR y C1080T de la CBS se relacionan con niveles elevados de hcy, y con los niveles disminuidos de vitamina B12, solo el segundo se relaciona con niveles disminuidos de ácido fólico.
- El polimorfismo 844ins68pb está relacionado con niveles normales de homocisteína en la población de estudio.
- Se encontró relación entre hiperhomocisteinemia con el desarrollo de SCA.

10. RECOMENDACIONES

- Estudiar la relación entre los polimorfismos con las concentraciones plasmáticas de vitamina B6.
- Cuantificar los niveles de estrógenos en la población, para evaluar la acción reguladora que estos ejercen sobre las concentraciones de homocisteína.

11. REFERENCIAS

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html>. Consultado el 3 de marzo de 2011
2. Perol I, San Martín MA, García A, Rodríguez FJ, Guinea J, Plaza L. Síndrome coronario agudo: nuevo enfoque fisiopatológico. *Cardiovascular Risk Factors*. 2003. 12(1): 35-42.
3. Acelajado MC, Calhoun DA. Resistant Hypertension, Secondary Hypertension, and Hypertensive Crises: Diagnostic Evaluation and Treatment. *Cardiology Clinics* 2010; 28, 639–654
4. Sahakya K, Klein BEK, Myers CE, Tsai MY, Klein R. Novel risk factors in long-term hypertension incidence in type 1 diabetes mellitus. *American Heart Journal* 2010; 159 (6), 1074-1080.
5. Aristizabal D, Pineda M, Urina M, Manzur F, Garcia C, Olivo C. Hipertensión Arterial Sistémica. 350-352 pp.
6. Malinowska A, Chmurzynska A. Polymorphism of genes encoding homocysteine metabolism–related enzymes and risk for cardiovascular disease. *Nutrition Research* 2009; **29**, 685–695.
7. Bermudez M, Briceño I, Gil F, Bernal J. Homocisteína y polimorfismos de la cistationina β sintasa y metiltetrahidrofolatoreductasa en población sana de Colombia. *Colombia Médica* 2006; **37** (1), 46-52.
8. Williams KT, Schalinske KL. New Insights into the Regulation of Methyl Group and Homocysteine Metabolism. *Journal of Nutrition* 2007; **137**, 311-314

9. Coppedè F. The complex relationship between folate/homocysteine metabolism and risk of down síndrome. *Mutation Research* 2009; **682**, 54–70
10. Bueno H, Bardají A, Fernández A, Marrugat J, Martí H, Heras M. Management of Non-ST-Segment-Elevation Acute Coronary Syndromes in Spain. The DESCARTES (Descripción del Estado de los Síndromes Coronarios Agudos en un Registro Temporal Español) *Revista Española de Cardiología*. 2005;58(3):244-52.
11. Ferreira I, Permanyer G, Jaume M, Heras M, Cuñat J, Civeira E, Arós F, Rodríguez J, Sánchez P, Bueno H. MASCARA (Manejo del Síndrome Coronario Agudo. Registro Actualizado) Study. General Findings. *Revista Español Cardiología*. 2008;61(8):803-16.
12. Barba J. Síndrome coronario agudo: Marcadores de lesión miocárdica. *Revista Mexicana Patología Clínica*. 2007; 54 (3): 116-135.
13. Organización Panamericana de la Salud, Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud. Indicadores Básicos 2009. Situación de Salud en Colombia.
14. Paynter NP, Cook NR, Everett BM, Sesso HD, Buring JE, Ridker PM. Prediction of Incident Hypertension Risk in Women with Currently Normal Blood Pressure. *The American Journal of Medicine* 2009; **122**, 464-471.
15. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Roccella EJ. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*. 2003, 289 (19): 2560-2572
16. Hansen TW, Li Y, Boggia J, Thijs L, Richart T, Staessen JA. Predictive Role of the Nighttime Blood Pressure. *Hypertension* 2011; 57, 3-10.
17. Sawula W, Majkutewicz ZB, Kadziński L, Banecka JJ, Węgrzyn G, Nyka W, Banecki B. Homocysteine level and metabolism in ischemic stroke in the population of Northern Poland. *Clinical Biochemistry* 2009; **42**, 442–447.
18. de Lau LM, van Meurs J, Uitterlinden AG, Smith D, Refsum H, Johnston C, Breteler M. Genetic variation in homocysteine metabolism, cognition, and white matter lesions. *Neurobiology of Aging* 2010; **31**, 2020-2022

19. Stevens AP, Dettmer K, Kirovski G, Samejima K, Hellerbrand C, Bosserhoff AK, Oefner PJ. Quantification of intermediates of the methionine and polyamine metabolism by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in cultured tumor cells and liver biopsies. *Journal of Chromatography* 2010; **1217**, 3282–3288.
20. Moreiras GV, Escudero JM, Alonso E. Homocisteína, vitaminas relacionadas y estilos de vida en personas de edad avanzada: estudio SÉNECA. *Nutrición Hospitalaria* 2007; **22**(3),363-370.
21. Castro R, Rivera I, Blom HJ, Jakobs C. Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinaemia and vascular disease: An overview. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2006; 29, 3-20.
22. Forges T, Barbarino P, Alberto JM, Rodriguez RM, Daval JL, Gueant JL. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Human Reproduction Update* 2007; **13** (3), 225–238.
23. Kag YJ. Copper and homocysteine in cardiovascular diseases. *Pharmacology & Therapeutics* 2010; **11**, 1-11.
24. Papoutsakis C, Manios Y, Magkos F, Papaconstantinou E, Schulpis KH, Zampelas A, Matalas AL, Yiannakouris N. Effect of the methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR 677C>T) polymorphism on plasma homocysteine concentrations in healthy children is influenced by consumption of folate-fortified foods. *Journal of Nutrition* 2010; 26, 969 – 974.
25. Kaplan NM, Victor RG. *Kaplan's Clinical Hypertension*. Décima edición. Editorial Lippincott Williams &Wilkins. Philadelphia. USA. 2009, 109- 112.
26. PORTH CM. *Fisiopatología: salud-enfermedad: un enfoque conceptual*. Séptima edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 2007, 25: 505-522p.
27. Kumar R, Nejatizadeh A, Arif E, Akhtar S, Gupta M, Tyagi S, Goyal AK, Jain SK, Qadar MA. Multi-locus interactions of vascular homeostasis genes in essential hypertension: A gender-based study. *ClinicaChimica* 2009; **Acta** **405**, 87–93
28. Bessa S, Ali EMM, Hamdy SM. The role of glutathione S- transferase M1 and T1 gene polymorphisms and oxidative stress-related parameters in

- Egyptian patients with essential hypertension. *European Journal of Internal Medicine* 2009; **20**, 625–630.
29. Zou CG, Zhao YS, Gao SY, De Li S, Cao XZ. Homocysteine promotes proliferation and activation of microglia. *Neurobiology of Aging* 2010; **31**, 2069–2079.
30. Tanaka T, Scheet P, Giusti B, Bandinelli S, Grazia M, Usala G, Lai s, Mulas A, Corsi AM, Vestrini A, Sofi F, Gori AM, Abbate R, Guralnik J, Singleton A, Abecasis GR, Schlessinger D, Uda M, Ferrucci L. Genome-wide Association Study of Vitamin B6, Vitamin B12, Folate, and Homocysteine Blood Concentrations. *The American Journal of Human Genetics* 2009; **84**, 477–482.
31. Wright A, King MJ, Wolfe CA, Powers HJ, Finglas PM. Comparison of (6S)-5-methyltetrahydrofolic acid v. folic acid as the reference folate in longer-term human dietary intervention studies assessing the relative bioavailability of natural food folates: comparative changes in folate status following a 16-week placebo-controlled study in healthy adults. *British Journal of Nutrition* 2010; **103**, 724–729.
32. Maron B, Loscalzo J. The Treatment of Hyperhomocysteinemia. *Annual Review of Medicine*. 2009; 60: 39–54.
33. Malinowska Anna, Chmurzynska Agata. Polymorphism of genes encoding homocysteine metabolism–related enzymes and risk for cardiovascular disease. *Nutrition Research*, 2009; 29(10): 685-695.
34. Akanji AO, Thalib L, Al. Isa AN. Folate, vitamin B12 and total homocysteine levels in Arab adolescent subjects: Reference ranges and potential determinants. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2010; **10**, 1-7.
35. Kale A, Naphade N, Sapkale S, Kamaraju M, Pillai A, Joshi S, Mahadik S. Reduced folic acid, vitamin B12 and docosahexaenoic acid and increased homocysteine and cortisol in never-medicated schizophrenia patients: Implications for altered one-carbon metabolism. *Psychiatry Research* 2010; **175**, 47–53.
36. Bruce A, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Peter W, Molecular biology of the cell (4a edición), Garland Science, New York, 2002.

37. Ayala C, García R, Cruz E, Prieto K, Bermudez M. Niveles de homocisteína y polimorfismos de los genes de la MTHFR y la CBS en pacientes colombianos con trombosis venosa superficial y profunda. *Biomédica* 2010; 30, 259-267.
38. Vargas EA, Sturm AC, Misita CP, Moll S. Homocysteine and MTHFR Mutations: Relation to Thrombosis and Coronary Artery Disease. *Circulation* 2005; 111, 289 – 293.
39. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000001?report=genbank&from=11845787&to=11866160&strand=true Consultado el 31 de Enero de 2011.
40. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000021.8?report=genbank&from=44473301&to=44496472&strand=true. Consultado el 31 de Enero de 2011.
41. Hustad S, Midttun O, Schneede J, Vollset SE, Grotmol T, Ueland PM. The Methylenetetrahydrofolate Reductase 677C→T Polymorphism as a Modulator of a B vitamin Network with Major Effects on Homocysteine Metabolism. *The American Journal of Human Genetics* 2007; 80, 846 – 855.
42. Mtiraoui N, Ezzidi I, Chaieb M, Marmouche H, Aouni Z, Chaieb A, Mahjoub T, Vaxillaire M, Almawi WY. MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms and hyperhomocysteinemia as risk factors of diabetic nephropathy in type 2 diabetes patients. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2007; 75, 99–106.
43. Franchis R, Fermo I, Mazzola G, Sebastio G, Di Minno G, Coppola A, Andria G, D'Angelo A. Contribution of the Cystathionine β-Synthase Gene (844ins68) Polymorphism to the Risk of Early-onset Venous and Arterial Occlusive Disease and of Fasting Hyperhomocysteinemia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2000; 84, 576-582.
44. http://new.paho.org/col/index.php?option=com_content&task=view&id=25&Itemid=135. Consultada el 9 de abril de 2011.
45. Meertens-R, Solano L. Vitamina B12, ácido fólico y función mental en adultos mayores. *Investigación Clínica* 46(1): 53 - 63, 2005
46. Simoncini T. Mecanismos de acción de los receptores de estrógenos en células vasculares: relevancia para la menopausia y el envejecimiento. *Revista del Climaterio* 2010; 13 (74): 41-47

11. ANEXOS

**ANEXO 1
CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**ANEXO 2
ENCUESTA**

**ANEXO 3
PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN**

**ANEXO 4
PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN**

**ANEXO 5
PROTOCOLO ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA**

**ANEXO 6
PROTOCOLO DE DIGESTIÓN**

**ANEXO 7
PROTOCOLO SDS-PAGE**

**ANEXO 8
PROTOCOLO COLORACIÓN CON NITRATO DE PLATA**

ANEXO 1 CONSENTIMIENTO INFORMADO



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA



Estudio: ASOCIACIÓN ENTRE HOMOCISTEÍNA Y OTROS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR CON LOS POLIMORFISMOS 699 C/T ,1080 C/T 844 INSERCIÓN 68 pb DE LA CBS Y 677 C/T DE LA MTHFR, EN PACIENTES CON SÍNDROME CORONARIO AGUDO .

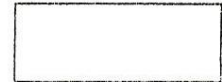
Usted (o su pariente) está invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por el Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana, con la participación de la unidad de cardiología del Hospital de San Ignacio. Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio: (a) Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. (b) El participar en este estudio puede no beneficiarlo a usted directamente, pero esta investigación nos permite clarificar muchos conceptos sobre la enfermedad y su mecanismo de herencia, de manera que los beneficios posteriores sean para usted, su familia u otros individuos afectados. (c) Usted puede retirarse del estudio cuando lo desee. La revocación de este consentimiento no tendrá perjuicio alguno sobre la relación médico-paciente. (d) Ninguna persona involucrada en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación. (e) Este estudio no tiene ningún interés económico por parte nuestra o de las instituciones colaboradoras. (f) CONFIDENCIALIDAD: Los registros con la información de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Genética Humana. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de investigación tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos. (g) La naturaleza de este estudio, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información importante está resumida a continuación y será explicada por el grupo investigador. (h) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas.

Cualquier información adicional usted puede obtenerla de los investigadores, o directamente con:

Jaime Bernal
Marta Bermúdez
Instituto de Genética Humana
Tel: (91)3208320 (Ext. 2791, 2796, 2798)



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA



EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL INDIVIDUO

OBJETIVO:

Determinar la asociación de homocisteína plasmática y otros factores de riesgo cardiovascular con presencia o ausencia de los polimorfismos 699C/T, 1080 C/T, 844 inserción 68 pb de la CBS y 677 C/T de la MTHFR en pacientes que han presentado síndrome coronario agudo, pertenecientes a una cohorte de hipertensos colombianos con estratificación del riesgo de enfermedad vascular estimado a 10 años.

PROCEDIMIENTO:

Se hará registro de datos sobre, edad, sexo, peso talla, circunferencia abdominal, de forma adicional se tomará una muestra de aproximadamente 14 ml de sangre de la vena, a la cual se le cuantificará los niveles colesterol total, colesterol LDL y colesterol HDL, triglicéridos, glucosa, homocisteína, BUN, creatinina, ácido fólico, vitamina B₆ vitamina B₁₂, se identificarán los polimorfismos 699C/T, 1080 C/T, 844 inserción 68 pb de la CBS y 677 C/T de la MTHFR. Si fuera necesario repetir los exámenes, usted sería notificado para tomar las muestras nuevamente. Estas muestras serán manejadas únicamente por las personas involucradas directamente en este proyecto, además serán almacenadas y procesadas en el Instituto de Genética Humana. Si usted decide retirarse del estudio, sus muestras dejarán de ser utilizadas de inmediato y serán devueltas si así lo desean.

RIESGOS E INCOMODIDADES

La participación en este estudio representa riesgo mínimo para su salud e integridad y las molestias y efectos adversos estarán representados exclusivamente por la toma de muestra referida en el procedimiento.

BENEFICIOS ADICIONALES:

Este estudio nos ayudará a entender las causas de las enfermedades genéticas. Se puede dar el caso donde usted y su familia no se beneficien directamente, pero tanto su familia como otros individuos afectados si pueden beneficiarse. En el caso donde se logre conocer la alteración genética, se le informará inmediatamente. Es importante aclarar que este estudio no tiene ningún interés económico por parte de nuestra o de las instituciones colaboradoras.

RESPONSABILIDAD DEL PACIENTE Y PRECAUCIONES

Al tomar parte de este estudio es importante que usted contemple las siguientes responsabilidades y precauciones:

MANEJO DE RESULTADOS:

Los resultados de los estudios genéticos solo le serán revelados cuando representen una ayuda diagnóstica para la entidad objeto de este estudio, estos resultados le serán entregados durante consulta clínica en presencia de un MEDICO GENETISTA. Los



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA



resultados de pruebas diagnósticas no genéticas empleadas en el estudio serán remitidos en sobre cerrado directamente al médico tratante que lo remitió.

OTRA INFORMACIÓN PERTINENTE:

Confidencialidad: cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos. Los registros médicos de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Genética Humana. Las historias médicas, resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son absolutamente confidenciales, de manera que solamente usted y el investigador tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento.

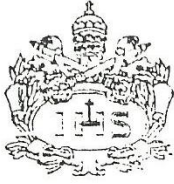


PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA

AUTORIZACIÓN:

La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la(s) entidad(es) anteriormente mencionada(s). Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

- Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio de investigación.**
- Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla en las situaciones señaladas a continuación:**
 - En estudios complementarios de diagnóstico para mi o algún miembro de mi familia:
Si No
 - En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación Si No
 - En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación Si No
 - En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato mis datos de identificación Si No



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA



AUTORIZACIÓN PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSIÓN
VOLUNTARIA
EN EL ESTUDIO:

Yo _____ identificado con documento de
identificación No. _____ de _____ acepto
voluntariamente que se me tome una muestra de _____, con el
fin de realizar análisis de _____.
Así mismo, declaró que se me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se le
dará al material de muestra.

Fecha: _____

Paciente, Acudiente, Representante legal

Testigo

Investigador



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA



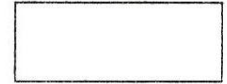
*CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRAS
BIOLÓGICAS CON EL OBJETO DE REALIZAR DIAGNOSTICO MOLECULAR*

Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio genético de diagnóstico molecular: (a) La realización de este estudio es totalmente voluntaria. (b) La naturaleza de este estudio, su propósito, sus limitaciones, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información pertinente al resultado de este, le será explicada por el equipo de atención clínica (c) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas. (d) ENTREGA DE RESULTADOS: Los resultados de; estudio le serán entregados (sin costo adicional) durante consulta clínica en presencia de un MEDICO GENETISTA. En caso que usted no acepte esta condición, el resultado será remitido en sobre cerrado directamente al médico tratante que lo remitió. (e) CONFIDENCIALIDAD: Los registros médicos de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Genética Humana. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de atención clínica tendrán acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Cualquier información adicional usted puede obtenerla de los investigadores, o directamente con:

Jaime Bernal
Marta Bermúdez
Instituto de Genética Humana
Tel: (91)3208320 (Ext. 2791, 2796, 2798)



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA



PROCEDIMIENTO:

Se realizará una entrevista clínica inicial y se procederá a tomar una muestra de aproximadamente _____ de _____ mediante _____

_ En caso de que sea necesario repetir los exámenes, usted será notificado para tomar las muestras nuevamente. Estas muestras serán manejadas únicamente por personas involucradas en el equipo de atención clínica.

BENEFICIOS ADICIONALES:

La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la(s) entidad(es) anteriormente mencionada(s). Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

- Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio de investigación.**
- Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla en las situaciones señaladas a continuación:**

-En estudios complementarios de diagnóstico para mi o algún miembro de mi familia: Si
 No

-En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación Si
 No

-En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación Si
 No

-En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato mis datos de identificación Si No



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA



AUTORIZACIÓN PARA LA TOMA DE MUESTRAS Y REALIZACIÓN
VOLUNTARIA DEL ESTUDIO DE DIAGNOSTICO MOLECULAR DE:

Yo, _____ identificado con documento de
identificación: No. _____ de _____, acepto
voluntariamente que se me tome una muestra de _____ con el fin
de realizar análisis de _____. Así
mismo, declaró que se me ha explicado la no presencia de riesgos mayores y el manejo que
se le dará al material de muestra.

Firma _____

Acudiente: _____

cc.

(Testigo)
cc



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA

ASOCIACIÓN ENTRE HOMOCISTEÍNA Y OTROS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR CON POLIMORFISMO 699 C/T, 1080 C/T, 844 INSERCIÓN 68pb DE LA CBS Y 677 C/T DE LA MTHFR, EN PACIENTES CON SINDROME CORONARIO AGUDO.

Nombre _____

Fecha _____

La información solicitada en este formato tiene caracates estrictametine confidencial y solo será usada con fines académicos. Por favor, lea cuidadosamente cada pregunta y señale con una X la respuesta que corresponda. Le agradecemos la participación y la sinceridad prestada al realizar la encuesta.

Natural de _____ Procedente de _____

1. GÉNERO Femenino Masculino

2. EDAD Años cumplidos

3. FECHA DE NACIMIENTO DD/MM/AA

4. ESCOLARIDAD:

Ninguna Primaria Secundaria

Universitario Técnico Posgrado

5. RÉGIMEN DE SEGURIDAD SOCIAL: SI NO

Subsidiado Vinculado Contributivo

Nombre de la entidad _____

6. OCUPACIÓN

Ama de Casa Estudiante Trabajador Independiente

Laboralmente vinculado Pensionado

7. ETNIA Blanca Mestiza
 Afrodescendiente Indígena

8. ESTATURA en metros.

9. PESO en kilogramos.

IMC _____

Perímetro Abdominal _____

10. ¿Usted es o ha sido fumador? SI NO

11. ¿Por cuánto tiempo fumó? MESES _____ AÑOS _____

12. ¿USTED FUMA EN LA ACTUALIDAD? SI NO

Si respondió NO en esta pregunta, pase a la pregunta 15.

13. ¿Hace cuánto tiempo fuma? _____ Meses _____ Años

14. Número de paquetes de cigarrillos que fumó en la última semana

Cantidad Cigarrillos Paquetes

15. ¿Tiene algún problema cardiovascular conocido?

SI NO NO SABE

16. ¿Cuál es ese problema? _____

17. ¿Ha estado hospitalizado por Síndrome Coronario Agudo?

SI NO

18. ¿Cuántas veces? _____

19. ¿Cuándo?

20. ¿Cuál era su tensión arterial cuando estuvo hospitalizado? _____

21. Sabe si su tensión arterial actualmente es: Alta
 Normal
 Baja
 No sabe

Si respondió NO SABE en esta pregunta, por favor pase a la pregunta 25.

22. Toma algún medicamento para controlar su tensión arterial. SI NO

23. ¿Cuál medicamento? _____

Nombre genérico

24. Tensión arteril antes de la toma de muestra DIASTOLICA_____ SISTOLICA_____

25. ¿Tiene el colesterol aumentado? SI NO NO SABE

26. ¿Tiene los triglicérido aumentados? SI NO NO SABE

27. ¿Tiene la glucosa aumentada? SI NO NO SABE

28. ¿Alguno de sus familiares ha tenido SI NO NO SABE
Problemas cardiovasculares?

29. Si respondió si en la pregunta 28 indique quien o quienes y la edad de cada uno:

30. ¿Usted sufre de diabetes?

31. ¿Alguien de su familia sufre de diabetes?

32. ¿Ud. sufre de alguna otra enfermedad?

33. ¿Cuáles? _____

34. ¿Toma algún medicamento diferente al de control de la tensión arterial?

SI NO

35. ¿Cuáles? _____

36. ¿Con qué regularidad usted hace ejercicio?

Diariamente Una vez por semana 2 0 3 veces por semana

Más de 3 veces por semana Nunca

37. ¿Ha seguido alguna dieta alimenticia en el último año?

SI NO

38. En esta dieta se evita el consumo de (marque con una X todas las casillas necesarias)

Frutas Vegetales Carnes
 Todos los anteriores Otro ¿Cuál? _____

39. ¿Con que frecuencia consume frutas y verduras?

Siempre Casi siempre Casi nunca Nunca

40. ¿Toma suplementos vitamínicos actualmente?

SI NO NO SABE

ANEXO 3 PROTOCOLO EXTRACCIÓN DE DNA - PROBE

PROTOCOLO EXTRACCIÓN DE DNA

1. En un tubo Falcon de 15 mL, medir 2 mL de Buffer de Lisis de Glóbulos Rojos, más 1ml de sangre.
2. Agitar 15 minutos a 3000 rpm.
3. Centrifugar a 3000 rpm por 8 minutos.
4. Descartar el sobrenadante y conservar el pellet.
5. Mezclar el pellet (vortex).
6. Adicionar 2 mL de Buffer de Lisis Celular y mezclar por chupeteo de 20 a 25 veces. Dejar a temperatura ambiente 1 hora. Se puede suspender el punto dejando a 4°C.
7. Adicionar 400 uL de Solución Precipitante de Proteínas.
8. Centrifugar a 4000 rpm por 20 minutos.
9. Adicionar 200 uL de Solución Precipitante de Proteínas.
10. Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos.
11. Adicionar 100 uL de Solución Precipitante de Proteínas.
12. Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos.

13. Verter el sobrenadante en Falcon de 15mL que contenga 6 veces el volumen de Isopropanol frío, según el volumen de sobrenadante. Dejar en reposo 5'.
14. Mezclar cuidadosamente por inversión para precipitar el DNA.
15. Envolver el DNA en una pipeta y pasarlo por etanol al 70% frío. Deja secar a temperatura ambiente por unos segundos y resuspender con H₂O dependiendo de la cantidad de DNA recuperado.
16. Conservar en congelación.

PASO ADICIONAL: (Cuando no hay precipitación)

1. Colocar la décima parte de acetato de sodio.
2. Centrifugar a 5000 rpm por 30 minutos
3. Descartar el sobrenadante y dejar boca abajo por 12 horas.
4. Resuspender con 100uL de H₂O destilada estéril, poner en el baño a 65°C por una hora.
5. Centrifugar a 5 minutos a 3500 rpm.

ANEXO 4 PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN

Polimorfismo	Fw	Rw	Condiciones PCR
C677T	5'GAAGGAGAAG GTGTCTGCGGG A3'	5'AGGACGGTGCG GTGAGTG3'	94°C por 3 minutos; luego 35 ciclos (94°C por 30 segundos, 62°C por 1 minuto y 72°C por 30 segundos) y finalmente 72°C por 7 minutos
C699T	5'CAGCAACCCC CTGGCTCAGT3'	5'CAGCCATGCCC TGTGTTTGCTATT 3'	92°C por 3 minutos para la denaturación del DNA; luego 35 ciclos (92°C por 1 minuto, 64°C por 1 minuto y 72°C por 30 segundos) y finalmente 72°C por 7 minutos
C1080T	5'CAGTGCCAC CCCAGCTCATT A3'	5'GGCCTCCTCCC CTCCCA3'	a 95°C por 20 segundos; luego 35 ciclos (95°C por 5 segundos, 66°C por 30 segundos y 68°C por 40 segundos) y finalmente 68°C por 10 minutos
844ins68 pb	5'CCGCAGG GTGGTCTGTCTG GACTG3'	5'AGCCC CACTCAGCATCCG TGTGAC3'	94°C por 2 minutos; luego 35 ciclos (94°C por 10 segundos, 60°C por 25 segundos, 72°C por 30 segundos) y

			finalmente a 72°C por 5 minutos
--	--	--	---------------------------------

Termociclador: BIO-RAD: modelo: Cyclser Termar Cyclser.

ANEXO 5

PROTOCOLO ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1%

1. En un tubo Falcon de 500 ml, medir 100 ml de TBE-1X
2. Se mezcla 1 gramo de agarosa al 100% con el TBE-1X y se pone al microondas por dos minutos.
3. Se adicionan 7 microlitros de Bromuro de etidio, homogenizando bien la mezcla.
4. Se vierte sobre la bandeja de electroforesis horizontal, se pone el peine de los pozos y se deja unos minutos hasta que gelifique completamente.
5. Se pone a correr el gel a 120 wv durante 30-60 minutos.
6. Se pone el gel sobre luz UV y se observan los resultados del amplificado.

ANEXO 6

PROTOCOLOS DE DIGESTIÓN

Polimorfismo	Enzima	Temp °C	Tiempo h	Fragmentos pb	
				C/C	T/T
699	Rsal	37	8-14	177-92-20	177-112
1080	BstUI	60	8-14	219-178-68-20	246-219
677	TaqI	65	8-14	198	177-21

ANEXO 7

PROTOCOLO SDS-PAGE

Para preparar 100 ml.

Se pesan 29 g de acrilamida y 1 g de Bis-Acrilamida, se le adicionan 100ml de agua destilad. Se almacena el stock en frasco ámbar a 4°C.

1. GEL DE POLIACRILAMIDA AL 8%

Para preparar 8 ml.

COMPONENTE	CANTIDAD
Poliacrilamida al 30%	2,2 ml
Buffer TBE 10X	0,8 ml
Agua	5,0 ml
Per sulfato de Amonio (PSA)	80 µL
TEMED	8,0 µL

Agitar hasta mezclar todos los componentes.

2. Colocar la solución dentro de los vidrios dispuestos para la corrida, poner el peine y esperar unos minutos la polimerización del gel.

3. Dispensar 10 µL el producto amplificado mezclado con 4 µL de Buffer de carga en cada uno de los pozos identificando la muestra a la que corresponde.

4. Reservar uno de los pozos para dispensar 7 μ L del marcador de peso molecular.
5. Correr a un voltaje mayor a 120 V, durante 75 minutos.
6. Sacar el (los) gel (es) y colorearlos con plata.

ANEXO 8

PROTOCOLO COLORACIÓN DE PLATA

1. Llenar un recipiente con suficiente etanol al 10% para cubrir el gel
2. Se deja el recipiente de 5 a 10 minutos en agitación para eliminar los residuos de buffer de carga e impurezas del buffer
3. Descartar el etanol y agregar ácido nítrico entre 3 y 5 minutos cubriendo el gel, el tiempo es importante ya que el ácido nítrico debe oxidar el ADN más no el gel para hacer posible la observación de la digestión. Esto debe hacerse en constante agitación.
4. Descartar el ácido nítrico y realizar 2 lavados con agua durante 30 segundos cada uno.
5. Agregar nitrato de plata en el recipiente con el gel, dejar en agitación durante mínimo 20 minutos, cubierto con papel aluminio, ya que el nitrato de plata es sensible a la luz y puede alterar el resultado.
6. Descartar el nitrato de plata y realizar 2 lavados con agua durante 30 segundos cada uno
7. Agregar carbonato de sodio y agitar hasta que el gel se ponga opaco, añadir poco a poco mayor cantidad de carbonato hasta que las bandas puedan observarse claramente en el gel.
8. Cuando las bandas se vean claras y pueda hacerse la lectura, se le pone ácido acético al 10 % para detener la reacción de revelado.
9. Dejar en ácido acético durante 5 a 10 minutos, una vez se haya detenido la reacción, pasar el gel a una bandeja con agua y glicerol para la conservación del gel.
10. Preparar un vidrio con papel celofán húmedo y agregar glicerol, esparciéndolo uniformemente, para evitar que el gel se deshidrate, y permitir así mejor su conservación.
11. Colocar el gel encima de una de las capas de celofán y cubrir con la otra.
12. Dejar secar durante al menos 24 horas para poder cortar el gel y guardarlo.