

Original

# Relación entre los polimorfismos de la metilen-tetrahidrofolato-reductasa y los niveles de homocisteína en mujeres con pérdida gestacional recurrente: perspectiva desde la nutrigenética

H. Cardona<sup>1,2,3</sup>, W. Cardona-Maya<sup>1,3</sup>, J. G. Gómez<sup>4</sup>, S. Castañeda<sup>1,3</sup>, J. M. Gómez<sup>4</sup>, G. Bedoya<sup>2,3</sup>, L. Álvarez<sup>3</sup>, J. D. Torres<sup>3</sup>, L. I. Tobón<sup>3</sup> y A. Cadavid<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Grupo Reproducción. <sup>2</sup>Grupo GenMol. <sup>3</sup>Grupo de Estudio Trombosis. <sup>4</sup>Departamento Ginecología. Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia.

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar si existe diferencia en la proporción de los polimorfismos de la metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) C677T y en los niveles de homocisteína, entre una población de mujeres con pérdida gestacional recurrente y un grupo control. Se incluyeron 93 pacientes con diagnóstico de tres o más pérdidas gestacionales y 206 mujeres sanas con dos o más hijos. Previa aceptación del consentimiento informado, a cada mujer se le tomó una muestra de sangre periférica tanto para la genotipificación de los polimorfismos de la MTHFR como para la medición de homocisteína en plasma. Las portadoras de la condición homocigota TT para el polimorfismo de la MTHFR 677T fueron 12,9% (12/93) en el grupo de pacientes y 14,6% (30/206) en el grupo control; un 46,2% (43/93) y 40% (83/206) en el grupo de pacientes y de controles respectivamente, fueron heterocigotos CT para el gen de la MTHFR. Los niveles promedio de homocisteína fueron 7,2  $\mu\text{mol/ml}$  para las pacientes y 7,7  $\mu\text{mol/ml}$  para los controles. No se encontró relación entre los polimorfismos del gen de la MTHFR y el aumento en los niveles de homocisteína, ni de éstos con la PGR. Desde la perspectiva de la nutrigenética, sugerimos que para estudiar la relación entre los polimorfismos de la MTHFR con determinada enfermedad, se tengan en cuenta los niveles de folatos, vitaminas B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub> que intervienen en el ciclo de los tetrahidrofolatos con el fin de intentar establecer una relación más directa entre el genotipo, el nivel del metabolito y las manifestaciones clínicas. En este mismo sentido recomendamos el consumo de ácido fólico en las mujeres que estén buscando embarazo dado la alta frecuencia de heterocigotos y homocigotos para la mutación C677T de la MTHFR en nuestra población.

(*Nutr Hosp.* 2008;23:277-282)

Palabra clave: MTHFR. Pérdida gestacional recurrente. Homocisteína. Nutrición.

**Correspondencia:** Ángela Cadavid J.  
Grupo Reproducción. Universidad de Antioquia.  
Carrera 53 # 61-30 - Medellín, Colombia  
E-mail: cadavida@une.net.co / reproduccion@medicina.udea.edu.co

Recibido: 14-III-2007.  
Aceptado: 6-IX-2007.

## RELATIONSHIP BETWEEN METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE POLYMORPHISM AND HOMOCYSTEINE LEVELS IN WOMEN WITH RECURRENT PREGNANCY LOSS: A NUTRIGENETIC PERSPECTIVE

Abstract

The objective of this study was to evaluate if there is any difference in the proportion of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphisms and the homocysteine levels in a group of women with recurrent pregnancy loss (RPL) and a control group. Ninety-three patients with diagnosis of three or more gestational losses and 206 healthy women with two or more children, were included. After acceptance of informed consent, samples of peripheral blood were taken to determine the genetic polymorphisms of MTHFR C677T and the plasmatic levels of homocysteine. The carriers of the homozygous mutation TT of MTHFR 677T polymorphism were 12.9% (12 of 93) in the group of patients and 14.6% (30 of 206) in the control group; 46.2% (43 of 93) and 40% (83 of 206) in the group of patients and controls respectively, were heterozygous CT for MTHFR gene. The levels of homocysteine were 7.2  $\mu\text{mol/ml}$  in the group of patients and 7.7  $\text{mmol/l}$  in controls. There was no relationship between MTHFR gene polymorphisms and the increase of homocysteine levels, nor of these one with RPL. From the nutrigenetics perspective we suggest that studies related to MTHFR polymorphisms and the risk of disease include the levels of folate and B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub> vitamins participating in the tetrahydrofolate cycle for trying to establish a direct relation among the genotype, the level of metabolite and the clinical manifestations. In this regard, we recommend the administration of folic acid in women in search of pregnancy due to the high frequency of heterozygous and homozygous for MTHFR C677T mutation in our population.

(*Nutr Hosp.* 2008;23:277-282)

Key words: MTHFR. Recurrent pregnancy loss. Homocysteine. Nutrition.

\* H. Cardona y W. Cardona-Maya, aportaron equitativamente en la realización de este trabajo.

## Introducción

La pérdida gestacional recurrente (PGR) se define como la pérdida consecutiva de tres o más productos de la gestación y afecta cerca del 0,4 al 0,8% de la población fértil<sup>1</sup>; este porcentaje se incrementa a un 5% cuando se incluyen parejas a partir de las dos pérdidas<sup>2</sup>. El origen de las pérdidas gestacionales es multifactorial y se han involucrado diferentes causas como alteraciones cromosómicas, malformaciones anatómicas, desnutrición materna, imbalance hormonal (estrógenos, progesterona y hormonas tiroideas) y anticuerpos antifosfolípidos<sup>3</sup>; sin embargo en más del 50% de las pacientes la causa sigue siendo de origen desconocido.

Nuestro grupo de investigación ha estado interesado en abordar el problema de la PGR desde una perspectiva interdisciplinaria por lo cual nos dimos a la tarea de incursionar en la nutrigenética, que es una rama de la genética que estudia la determinación de los polimorfismos genéticos y su relación con los nutrientes en la expresión de genes que afectan la salud, con el fin de entender cómo algunos polimorfismos genéticos que están implicados en la alteración del metabolismo del ácido fólico pueden ocasionar la PGR.

Fisiológicamente, la 5,10-metilen-tetrahidrofolato-reductasa (MTHFR) cataliza la conversión unidireccional de 5,10-MTHFR a 5-metil-tetrahidrofolato (5-metil THF). La actividad de la MTHFR requiere de cantidades adecuadas de NADPH y FADH<sub>2</sub> para mantener niveles apropiados de 5-metil THF en la célula. Si por alguna circunstancia la actividad de la MTHFR es baja, los niveles intracelulares de 5-metil THF disminuyen, y la conversión de homocisteína (Hcy) a metionina, se ve afectada. La falta de metionina resulta en una carencia de grupos metilo, que son necesarios para las reacciones de metilación como las que se dan en la síntesis de DNA, carnitina, creatina, epinefrina, purinas y nicotinamida. Así, cuando la formación de 5-metil THF es defectuosa, se afecta la capacidad del organismo para sintetizar productos metilados y remover la Hcy.

La Hcy es producida por la demetilación intracelular de la metionina y exportada al plasma, por donde circula principalmente en su forma oxidada, unida a las proteínas del plasma como un disulfuro mixto Hcy-proteína, con la albúmina<sup>4</sup>. La Hcy total representa la suma de todas las formas de Hcy (libre y unida a las proteínas) encontradas en el plasma o suero. Durante la transulfuración dependiente de la vitamina B<sub>6</sub>, la Hcy se cataboliza irreversiblemente en cisteína; sin embargo la mayor parte de la Hcy es remetilada formando nuevamente metionina, principalmente por acción de la metionina sintetasa, enzima que depende de la cobalamina y del folato. Cuando el proceso no fluye normalmente, la Hcy se acumula y se exporta hacia la circulación sanguínea<sup>4</sup> originando un aumento de la Hcy en suero, y niveles disminuidos de folato en los glóbulos rojos y en el suero. Esta disminución de folatos y el aumento de la Hcy, podrían alterar la meti-

lación del DNA (hipometilación), afectando la expresión de algunos genes lo que podría causar daños en la vascularización coriónica<sup>5</sup>, abrupcio de placenta, preeclampsia y defectos del tubo neural<sup>6</sup> que pueden llevar a la pérdida gestacional.

En la última década se han reportado diversas variaciones genéticas de la MTHFR, causantes de disminución en su actividad y en la subsecuente formación del 5-metil THF y todas ellas consisten en sustituciones en la secuencia del DNA que codifica para la enzima. Se denominan polimorfismos porque dichas variaciones se encuentran en más del 1% de la población. Uno de los polimorfismos genéticos más estudiados en este sentido es la variante termolábil y deficiente de la enzima que se produce por una sustitución de una citosina (normal) por una timina (mutada) en la posición 677 del gen de la MTHFR lo que origina un cambio en la secuencia de aminoácidos de una alanina por una valina. La condición de homocigosis 677T es responsable de una disminución de la actividad de la MTHFR y se ha asociado con un incremento en las concentraciones de Hcy plasmáticas.

En los reportes de la literatura hay controversia sobre la relación entre las mutaciones de la MTHFR o los niveles de Hcy, y la pérdida gestacional<sup>5,7-11</sup>. El objetivo de esta investigación fue evaluar si existe diferencia en la proporción de los polimorfismos de la MTHFR C677T y en los niveles de Hcy, entre una población de mujeres con PGR y un grupo control.

## Materiales y métodos

### *Población de estudio*

Noventa y tres pacientes con diagnóstico de tres o más pérdidas gestacionales de la consulta de aborto del Grupo Reproducción de la Universidad de Antioquia que además hubieran presentado alguna de las siguientes complicaciones: muerte fetal de segundo trimestre de causa desconocida, muerte embrionaria temprana, preeclampsia severa o recurrente o restricción del crecimiento intrauterino. El grupo control incluyó 206 mujeres sanas con dos o más hijos, no más de una pérdida y cuya historia obstétrica no tuviera las complicaciones que eran criterio de inclusión del grupo de pacientes.

A todas las mujeres se les tomó una muestra de 10 ml de sangre periférica en dos tubos vacutainer®, así: un tubo con EDTA para la extracción del DNA genómico a partir de los glóbulos blancos y posterior genotipificación de los polimorfismos para la MTHFR C677T y otro con EDTA en cadena de frío (4 °C desde la toma hasta su utilización) para la medición en plasma de la Hcy. Esta obtención de sangre se realizó previo consentimiento informado de las pacientes. La investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Corporación Biogénesis de la Universidad de Antioquia.

### Determinación de los niveles de Homocisteína

Se utilizó el estuche comercial IM<sup>®</sup>x SYSTEM Homocysteine (Abbott Diagnostics Division, Germany) el cual se basa en la tecnología de inmunoanálisis de fluorescencia polarizada. La Hcy unida (forma oxidada) se reduce a Hcy libre, la cual se convierte enzimáticamente en S-adenosil-L-homocisteína (SAH)<sup>12</sup>. En condiciones fisiológicas, la SAH hidrolasa convierte la SAH en Hcy; el exceso de adenosina en la solución de pretratamiento convierte la Hcy en SAH utilizando la SAH hidrolasa bovina. Los valores de referencia de la Hcy, fueron los determinados por el estuche comercial (5–15 µmol/ml para personas entre 20 a 60 años y de 5–20 µmol/ml para personas mayores de 60 años).

### Determinación del polimorfismo C677T en el gen que codifica para la MTHFR por PCR-RFLP

El DNA se extrajo de sangre total por el método de fenol-cloroformo usando protocolos estandarizados<sup>13</sup>.

La amplificación de la región que contiene la mutación se realizó por una PCR con 20 pmol de cada par de cebadores<sup>14</sup>:

Sentido 5' - TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGA - 3'  
Antisentido 5' - AGGACGGTGCAGAGAGAGTG - 3'

Se usó un volumen de reacción de 25 ml conteniendo tampón de PCR 1X (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 100 mM de KCl, 0.1 mM de EDTA y 1 mM DTT), 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 UI de Taq polimerasa, 2,5 mM de cada nucleótido en una mezcla de dNTP y 2 µl de la muestra de DNA genómico. La mezcla se amplificó en un termociclador PTC 200 MJ con los siguientes ciclos: desnaturalización inicial de 95 °C/4 minutos, seguido por 40 ciclos de 94 °C/60 segundos, 63 °C/60 segundos y 72 °C/60 segundos, seguido de un ciclo de extensión final a 72 °C/10 minutos. Se verificó el amplificado en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

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

### Análisis de resultados

Se determinó si había diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de los polimorfismos de la MTHFR entre ambos grupos con la prueba de ji cuadrado de Mantel y Haenszel y se calcularon las respectivas razones de disparidad, con sus intervalos de confianza del 95% (EPI 6 STAT CALC). Se realizó un análisis de t no pareada para comparar los niveles de Hcy entre los casos y los controles usando el programa estadístico Prism 3.02<sup>®</sup>.

### Resultados

La edad promedio en las 93 mujeres con historia de PGR fue de 34,1 años (DS ± 0,91) y 41,6 años (DS ± 0,67) en las 206 mujeres del grupo control. Doce de los casos (12,9%) y 30 de los controles (14,6%) fueron homocigóticas para la mutación 677T (frecuencia alélica de T 35 y 36%, respectivamente), tabla I.

El promedio de Hcy en los casos, fue de 7,2 ± 2,6 µmol/ml comparado con 7,7 ± 2,5 µmol/ml en los controles (p < 0,0001). Se buscó la asociación entre el genotipo para la MTHFR y los niveles de Hcy para observar si había diferencia estadísticamente significativa entre los individuos portadores del genotipo mutado en forma homocigótica 677T y aquellos que tenían el genotipo homocigótico normal 677C pero no se encontró diferencia (tabla II). Aunque se encontró una diferencia significativa en los niveles de Hcy entre casos y controles, esto es irrelevante debido a que sus promedios están dentro del rango de referencia esperado en la población general.

### Discusión

La frecuencia de los polimorfismos, tanto homocigoto como heterocigoto, de la variante termolábil de la enzima MTHFR no tiene un patrón definido de distribución por regiones o grupos étnicos<sup>15-17</sup>. Dos estudios previos realizados en Colombia sobre la frecuencia de los polimorfismos de la MTHFR han mostrado una frecuencia inusualmente alta del alelo T en comparación con lo reportado en otras partes del mundo<sup>18-19</sup>. El primer estudio fue en un grupo de 150 individuos de la población general en el que la frecuencia del alelo T fue de 48%, siendo 28% homocigotos y 46,6% heterocigotos<sup>18</sup>. El

**Tabla I**  
Frecuencias genotípicas

Variante	Genotipo	Casos n = 93 (%)	Controles n = 206 (%)	Valor de p	OR (IC 95%)*
C677T	CC	38 (40,86%)	93 (45,1%)	0,48	0,84 (0,5-1,42)
	CT	43 (46,24%)	83 (40,0%)		
	TT	12 (12,9%)	30 (14,6%)		

\* Límites de confianza de Cornfield (95%) para razón de disparidad (OR).

**Tabla II**  
Niveles de Hcy según genotipo de la mutación C677T del gen de la MTHFR

Variante	Genotipo	Promedio $\pm$ DS de Hcy Casos ( $\mu\text{mol/ml}$ )	Promedio $\pm$ DS de Hcy Controles ( $\mu\text{mol/ml}$ )	Promedio	Valor de p
C677T	CC	7,0 $\pm$ 1,8	7,7 $\pm$ 2,4	7,5	0,157
	CT	6,96 $\pm$ 2,9	7,52 $\pm$ 2,4	7,33	0,053
	TT	8,75 $\pm$ 2,7	8,16 $\pm$ 3	8,33	0,225
	Promedio	7,21 $\pm$ 2,6	7,7 $\pm$ 2,5	7,55	< 0,0001

otro estudio se realizó en nuestro grupo y se estudiaron 114 individuos sanos donantes de un banco de sangre y 100 pacientes con historia de trombosis venosa profunda; se encontró una frecuencia alélica de T de 48,5% y 43,8% en los pacientes y en los controles, respectivamente<sup>19</sup>. En el presente estudio, en mujeres con PGR y en un grupo control, se encontró una frecuencia alélica de T de 36 y 35% en cada uno de los grupos.

En Suramérica se han realizado tres estudios, incluido el nuestro, sobre la posible asociación del polimorfismo C677T de la MTHFR con la PGR. Couto y cols.<sup>20</sup> en Brasil, encontraron que la forma heterocigota era más frecuente en mujeres que tenían PGR en comparación con mujeres normales 53,4% (47/88) versus 29,5% (26/88)  $p < 0,001$ . En otro estudio realizado en Uruguay por Otero y cols.<sup>21</sup> se encontró una frecuencia de 16,2% (17/105) del genotipo homocigótico en las mujeres con PGR en comparación con 8,1% (12/148), en el grupo control ( $p < 0,05$ ). En contraste a lo reportado por estos estudios, nosotros no encontramos diferencia estadística en las frecuencias genotípicas de la mutación C677T entre los casos con PGR y el grupo control (tabla I). Estos resultados podrían explicarse por el origen poblacional y la composición étnica de la población de estos tres países los cuales recibieron diferentes olas migratorias durante la época de la conquista provenientes de Portugal y España, en Brasil y Colombia, respectivamente, y de España y posteriormente de Italia, en Uruguay; adicionalmente se puede deber a los grados de mezcla que han tenido estas poblaciones con la población nativa amerindia y con las poblaciones negras que fueron traídas durante la esclavitud. Estudios en otros lugares del mundo también han encontrado resultados contradictorios<sup>5,7-9,11,22</sup> por lo que se requiere realizar investigaciones más básicas con el fin de encontrar los mecanismos precisos involucrados en el aumento de los niveles de Hcy y su papel en la fisiopatología de la PGR.

La medición de la Hcy en un grupo de 30 mujeres y 18 hombres de la población colombiana mostró que las concentraciones generales de Hcy fueron de 8,5  $\mu\text{mol/l}$ ; al separar los individuos por sexo, los promedios para mujeres y hombres fueron de 7,6  $\mu\text{mol/l}$  y 10,1  $\mu\text{mol/l}$ , respectivamente<sup>23</sup>. En nuestro caso, encontramos diferencia estadísticamente significativa al comparar las mujeres del grupo control con las pacientes con PGR, pero este hallazgo es irrelevante

porque, en ambos grupos, los promedios se encontraban entre los valores de referencia considerados como normales (5-15  $\mu\text{mol/l}$ ).

El aumento en las concentraciones sanguíneas de Hcy o hiperhomocisteinemia, se ha encontrado asociado con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares y demencias<sup>24</sup>. El mecanismo por el cual esta hiperhomocisteinemia produciría alteración vascular y posiblemente PGR por infartos placentarios aun no se ha elucidado, pero podría postularse un daño de la función endotelial que promueve el crecimiento de células de músculo liso llevando a lesiones vasculares y facilitando la adherencia plaquetaria<sup>25-27</sup>. La suplementación con ácido fólico, vitamina B<sub>6</sub> y vitamina B<sub>12</sub> en individuos con hiperhomocisteinemia, tanto sanos como enfermos cardíacos, ha mostrado que normaliza o reduce las concentraciones de Hcy en sangre disminuyendo el factor de riesgo<sup>28,29</sup>.

Los estudios realizados para establecer diferencia en la frecuencia de los polimorfismos de la MTHFR entre individuos sanos e individuos con diferentes enfermedades que se cree son el resultado de una alteración en el ciclo de los tetrahidrofolatos, han arrojado resultados muy contradictorios principalmente por el nivel de consumo de las diferentes vitaminas que interactúan en dicho ciclo. En un estudio se encontró diferencia significativa entre pacientes con enfermedad cardiovascular y portadores del genotipo 677T en comparación con aquellos que tenían el genotipo 677C, pero este efecto sólo se observó si los individuos tenían un escaso consumo de ácido fólico; así, el bajo consumo de folatos, podría ser una explicación en la manifestación del efecto del polimorfismo de la MTHFR en el riesgo de enfermedad cardiovascular<sup>30</sup>. En otro estudio por el contrario, se encontró que aunque los individuos con el genotipo 677T sí tenían mayores niveles de Hcy, éste no estaba asociado con el riesgo de enfermedad cardiovascular<sup>31</sup>.

Con respecto a la posible influencia del consumo de diferentes vitaminas en los niveles de Hcy es importante considerar la legislación nutricional que manejan los diferentes países. Por ejemplo, en Estados Unidos y Canadá, la legislación de la Administración de Drogas y Alimentos recomendó, a partir del año 1998, una dieta diaria de 320  $\mu\text{g}$  de ácido fólico al día en adultos y de 400  $\mu\text{g}$  en mujeres en estado de preconcepción para reducir principalmente la incidencia de los daños del

tubo neural. Para que estos niveles sean consumidos por la población se realiza una fortificación de harinas, granos y cereales con folatos (140 µg de folato por 100 g de producto); de esta manera cereales fortificados, panes fabricados con harina de trigo fortificada y productos de grano, representan los mayores recursos de la vitamina B<sub>9</sub> (ácido fólico)<sup>24,32</sup>. En Chile por su parte el Ministerio de Salud como estrategia para disminuir la frecuencia de defectos del tubo neural, determinó que a partir del 1° de enero de 2000 se agregara 220 µg de ácido fólico por cada por 100 g de harina, con lo que esperan alcanzar un aporte de 360 µg diarios de ácido fólico sólo a través del consumo de pan fortificado<sup>33-34</sup>.

La hiperhomocisteinemia es generalmente corregida por el uso de ácido fólico y vitamina B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>, lo cual podría estar explicando los valores bajos de Hcy, tanto en el estudio de Córdoba y cols.<sup>23</sup> como en el presente trabajo. Las pacientes con PGR y en general las mujeres que están buscando un embarazo, acostumbran consumir ácido fólico en preparados comerciales, y aunque a las mujeres del grupo control no se les interrogó sobre el consumo de ácido fólico, es poco probable que lo estuvieran consumiendo en tabletas. La dieta en Colombia es rica en folatos aunque en algunas ocasiones se cocinan los vegetales con lo cual se pierde esta vitamina; adicionalmente en los supermercados se encuentra una variedad de productos fortificados con ácido fólico pero gran parte de la población no puede acceder a estos productos debido a que hacen parte de un mercado más diferenciado, poco asequible a los sectores con menos ingresos económicos.

Con los datos obtenidos en el presente trabajo, nosotros concluimos que en nuestra población de estudio el alelo T de la MTHFR no está asociado ni con el aumento de niveles de Hcy en plasma ni como factor desencadenante de PGR. Basados en la literatura y en la alta frecuencia de heterocigotos CT y homocigóticos TT para el gen de la MTHFR, y considerando que tanto los niveles de Hcy como la PGR son entidades multifactoriales, nos permitimos sugerir el consumo de ácido fólico en los niveles recomendados tres meses antes de la concepción y durante el primer trimestre del embarazo, para tratar de prevenir los efectos adversos que pudieran ser ocasionados por el estado de portadoras de esta mutación.

Nuestra recomendación final es que en los trabajos en los que se pretenda estudiar la asociación de los polimorfismos de la MTHFR con el riesgo de determinada enfermedad, se tenga en cuenta los niveles de otros componentes, además de la Hcy, que hacen parte del ciclo de los tetrahidrofolatos tales como el ácido fólico, la metionina, la vitamina B<sub>6</sub> y la vitamina B<sub>12</sub> ya que estos nutrientes están interactuando permanentemente con los genes que codifican para las diferentes enzimas que regulan este ciclo. Así, se podría establecer una relación más real entre el genotipo, el nivel del metabolito y su posible influencia en las manifestaciones clínicas de los individuos con un polimorfismo alterado. El desconocimiento de las interacciones que

emergen de un sistema tan complejo como éste, seguirá generando resultados diversos y contradictorios.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por COLCIENCIAS (proyecto 1115-04-11916) y por la Universidad de Antioquia.

## Referencias

1. Stirrat GM. Recurrent miscarriage. *Lancet* 1990; 336 (8716): 673-675.
2. Regan LM, Mollica JS, Rezaie AR, Esmon CT. The interaction between the endothelial cell protein C receptor and protein C is dictated by the gamma-carboxyglutamic acid domain of protein C. *J Biol Chem* 1997; 272(42):26279-26284.
3. Kutteh WH, Wester R, Kutteh CC. Multiples of the median: an alternative method for reporting antiphospholipid antibodies in women with recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 1994; 84(5):811-815.
4. Perry IJ, Refsum H, Morris RW, Ebrahim SB, Ueland PM, Shaper AG. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet* 1995; 346(8987):1395-1398.
5. Nelen WL, Bulten J, Steegers EA, Blom HJ, Hanselaar AG, Eskes TK. Maternal homocysteine and chorionic vascularization in recurrent early pregnancy loss. *Hum Reprod* 2000; 15(4):954-960.
6. Aubard Y, Genet D, Eyraud JL, Clavere P, Tubiana-Mathieu N, Philippe HJ. Impact of screening on breast cancer detection. Retrospective comparative study of two periods ten years apart. *Eur J Gynaecol Oncol* 2002; 23(1):37-41.
7. Holmes ZR, Regan L, Chilcott I, Cohen H. The C677T MTHFR gene mutation is not predictive of risk for recurrent fetal loss. *Br J Haematol* 1999; 105(1):98-101.
8. Foka ZJ, Lambropoulos AF, Saravelos H, Karas GB, Karavida A, Agorastos T y cols. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 2000; 15(2):458-462.
9. Unfried G, Griesmacher A, Weismuller W, Nagele F, Huber JC, Tempfer CB. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and idiopathic recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol* 2002; 99(4):614-619.
10. Wouters MG, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Thomas CM, Borm GF y cols. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril* 1993; 60(5):820-825.
11. Coumans AB, Huijgens PC, Jakobs C, Schats R, De Vries JJ, Van Pampus MG y cols. Haemostatic and metabolic abnormalities in women with unexplained recurrent abortion. *Hum Reprod* 1999; 14(1):211-214.
12. Zighetti ML, Chantarangkul V, Tripodi A, Mannucci PM, Cattaneo M. Determination of total homocysteine in plasma: comparison of the Abbott IMx immunoassay with high performance liquid chromatography. *Haematologica* 2002; 87(1):89-94.
13. Ausbel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Serdman JG, Smith JA, Struhl, K. Current Protocols in Molecular Biology. 1-3. John Wiley and Sons Inc, USA; 1996.
14. Mandel H, Brenner B, Berant M, Rosenberg N, Lanir N, Jakobs C y cols. Coexistence of hereditary homocystinuria and factor V Leiden —effect on thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334(12):763-768.
15. Pepe G, Camacho Vanegas O, Giusti B, Brunelli T, Marcucci R, Attanasio M y cols. Heterogeneity in world distribution of the thermolabile C677T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1998; 63(3):917-920.

16. Hegele RA, Tully C, Young TK, Connelly PW. V677 mutation of methylenetetrahydrofolate reductases and cardiovascular disease in Canadian Inuit. *Lancet* 1997; 349(9060):1221-1222.
17. Córdoba-Porras A, Sánchez-Quesada JL, González-Sastre F, Ordóñez-Llanos J, Blanco-Vaca F. Susceptibility of plasma low- and high-density lipoproteins to oxidation in patients with severe hyperhomocysteinemia. *J Mol Med* 1996; 74(12):771-776.
18. Camacho Vanegas O, Giusti B, Restrepo Fernández CM, Abbate R, Pepe G. Frequency of factor V (FV) Leiden and C677T methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations in Colombians. *Thromb Haemost* 1998; 79(4):883-884.
19. Torres J, Cardona H, Álvarez L, Cardona-Maya W, Castañeda SA, Quintero-Rivera F y cols. Inherited Thrombophilia in a Group of patients with Deep Vein Thrombosis. *American Journal of Hematology* 2006; 81:933-937.
20. Couto E, Barini R, Zaccaria R, Annicchino-Bizzacchi JM, Passini Junior R, Pereira BG y cols. Association of anticardiolipin antibody and C677T in methylenetetrahydrofolate reductase mutation in women with recurrent spontaneous abortions: a new path to thrombophilia? *Sao Paulo Med J* 2005; 123(1):15-20.
21. Otero A, Pou-Ferrari R, Pons E, Lens D, E. DL, Dellepiane M y cols. Trombofilia y pérdida recurrente de embarazo. *Rev Med Uruguay* 2004; 20:106-113.
22. Lee RM, Brown MA, Ward K, Nelson L, Branch DW, Silver RM. Homocysteine levels in women with antiphospholipid syndrome and normal fertile controls. *J Reprod Immunol* 2004; 63(1):23-30.
23. Córdoba A, Arbeláez L, Castañeda S. Concentración plasmática de homocisteína en ayunas en individuos sanos de la ciudad de Medellín. *Acta Med Colomb* 2002; 27:196-197.
24. Gropper S, Smith J, Groff J. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*; Thomson Wadsworth Publishing, USA; 2005.
25. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh CM, Haber E, Schlegel R y cols. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(14):6369-6373.
26. Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27(3):517-527.
27. Cortese C, Motti C. MTHFR gene polymorphism, homocysteine and cardiovascular disease. *Public Health Nutr* 2001; 4(2B):493-497.
28. Ubbink JB, Vermaak WJ, Van der Merwe A, Becker PJ, Delport R, Potgieter HC. Vitamin requirements for the treatment of hyperhomocysteinemia in humans. *J Nutr* 1994; 124(10):1927-1933.
29. Ubbink JB, Vermaak WJ, Van der Merwe A, Becker PJ. Vitamin B<sub>12</sub>, vitamin B<sub>6</sub>, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr* 1993; 57(1):47-53.
30. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG. MTHFR 677C → T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA* 2002; 288(16):2023-2031.
31. Scott JM. Homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(2):333-334.
32. IOM. Folate. En: *Dietary References Intakes for Thiamine, Riboflavin, Niacin, Vitamin B<sub>6</sub>, Folate, Vitamin B<sub>12</sub>, Pantothenic Acid, Biotin and Choline*. En: *Food and Nutrition Board*. Washington DC; 1998. pp. 196-305.
33. Cortés F, Mellado C, Hertrampf E, Alliende A, Castillo S. Frecuencia de los defectos de cierre del tubo neural en las maternidades públicas de Santiago durante el año 1999. *Rev Med Chile* 2001; 129:277-284.
34. Nitsche F, Alliende MA, Santos JL, Pérez F, Santa María L, Hertrampf E, Cortés F. Frecuencia del polimorfismo C677T de la 5, 10-metilentetrahydrofolato reductasa (MTHFR) en mujeres chilenas madres de afectados con espina bífida y en controles normales. *Rev Med Chile* 2003; 131(12):1399-1404.