



INVESTIGACIÓN ORIGINAL

ASOCIACIÓN ENTRE LA ALTERACIÓN DEL METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA-METIONINA Y FOLATO, Y EL RETARDO DE CRECIMIENTO INTRAUTERINO IDIOPÁTICO (RCIU). DATOS PRELIMINARES

The association between homocysteine-methionine and folate metabolism and pregnancy complicated by idiopathic intrauterine growth restriction - Preliminary data

Reggie García-Robles, MD, PhD (c)¹; Catalina Durán-Garzón¹; Paola Ayala-Ramírez, Bac, MSc²; Joan Dayanna Pardo-Sabogal, ND³; Rodolfo Martínez-Díaz, MD⁴; Martha Bermúdez de Rincón, Biol, PhD³; Jaime Bernal-Villegas, MD, PhD³

Recibido: abril 13/12 – Aceptado: diciembre 13/12

RESUMEN

Objetivo: el objetivo general de esta investigación es hacer una aproximación para evaluar la asociación entre alteración del metabolismo de la homocisteína-metionina y folato en embarazos complicados con restricción de crecimiento intrauterino (RCIU) idiopático, a través del estudio de los niveles de homocisteína pre y posparto, vitamina B12 y folato, así como las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos genéticos de enzimas que participan en la vía metabólica de la homocisteína-metionina

y folato en gestantes con embarazos complicados con RCIU idiopático y en condiciones fisiológicas en embarazo normal.

Materiales y métodos: estudio piloto observacional analítico de tipo casos y controles. Se estudiaron 8 gestantes con embarazos con restricción de crecimiento intrauterino idiopático y 21 gestantes control con embarazos sin complicaciones y recién nacido sano. Se analizaron las concentraciones de folato, vitamina B12 y homocisteína en el tercer trimestre de embarazo, así como los niveles de homocisteína posparto. Se determinaron los genotipos de las gestantes para los polimorfismos MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G, CBS 844ins68, CBS VNTR31pb, CBS C699T y CBS C1080T por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

Resultados: los polimorfismos MTHFR C677T y el genotipo 18/18 del polimorfismo CBS VNTR-31pb, de manera independiente y en coexistencia,

- 1 Candidato a Doctor en Ciencias Biológicas, Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. rgarcia@javeriana.edu.co
- 2 Estudiante de Biología, Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- 3 Docente e Investigador, Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- 4 Docente e Investigador, Instituto de Investigación en Nutrición, Genética y Metabolismo, Universidad El Bosque. Bogotá, Colombia.
- 5 Ginecoobstetra del grupo de Medicina Materno-Fetal, Departamento de Ginecología y Obstetricia, Hospital Universitario San Ignacio. Bogotá, Colombia.

se asociaron a niveles bajos de folato. Igualmente, el genotipo 18/18 del polimorfismo CBS VNTR-31pb, solo y cuando coexistía con el polimorfismo MTHFR C677T, se asoció con RCIU idiopático.

Conclusiones: el metabolismo de la homocisteína-metionina y folato es importante para el crecimiento y desarrollo del embrión-feto. El compromiso de estas rutas metabólicas se asocia a complicaciones del embarazo como RCIU idiopático. Los resultados preliminares de este estudio deben incentivar el estudio del metabolismo de la homocisteína-metionina y folato en complicaciones del embarazo como la RCIU, así como en condiciones fisiológicas en el embarazo normal en nuestra población.

Palabras clave: homocisteína, metionina, folato, restricción de crecimiento intrauterino.

ABSTRACT

Objective: This work was aimed at evaluating the association between homocysteine-methionine and folate metabolism alteration and pregnancies complicated by idiopathic intrauterine growth restriction (IUGR). This was done by studying pre- and post-partum homocysteine, vitamin B12 and folate levels, as well as allele and genotype frequency for genetic polymorphisms from enzymes participating in the homocysteine-methionine and folate metabolic route in pregnant women having pregnancies complicated by idiopathic IUGR and physiological conditions during normal pregnancy.

Materials and methods: This was an analytical observational (cases and controls) pilot study. Eight pregnant women suffering IUGR were studied, as well as 21 pregnant women as control whose pregnancy had no complications and healthy newborn. Folate, vitamin and B12 homocysteine concentrations as well as postpartum homocysteine levels were analyzed during the third trimester of pregnancy. The pregnant women's genotypes were determined formethylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T, MTHFR A1298C, methionine synthase reductase (MTRR) A66G, cystathionine beta-synthase (CBS) 844ins68, CBS 31pb VNTR,

CBS C699T and CBS C1080T polymorphisms by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP).

Results: MTHFR C677T polymorphisms and the CBS 31bp VNTR 18/18 genotype (independently and in coexistence) were associated with low folate levels. The CBS 31bp VNTR 18/18 genotype alone and when coexisting with MTHFR C677T was associated with idiopathic IUGR.

Conclusions: Homocysteine-methionine and folate metabolism is important for embryo-fetus growth and development. Compromise of these metabolic routes is associated with pregnancy complications such as idiopathic IUGR. This study's preliminary results should encourage studying homocysteine-methionine and folate metabolism in complications regarding pregnancy such as IUGR and in physiological conditions during normal pregnancy in our population.

Key words: Homocysteine, methionine, folate, intrauterine growth restriction.

INTRODUCCIÓN

La restricción de crecimiento intrauterino (RCIU) es el cuadro clínico en el cual el feto no alcanza su pleno potencial de crecimiento, y como desenlace final se encuentra una disminución en el peso corporal, estimado prenatalmente, menor al percentil 10 para la edad gestacional y sexo según las tablas de crecimiento (1, 2). Es considerada una patología multifactorial, con un importante componente genético, de la cual se desconocen muchos de los mecanismos fisiopatológicos involucrados, principalmente de aquella denominada idiopática, que incluye el 40-50% de los casos (1, 3-7). La prevalencia de RCIU varía ampliamente en los países en desarrollo, desde 10 hasta 55%, y según lo reportado por el estudio colaborativo de antropometría materna y desenlace del embarazo de la OMS es del 17% en Colombia (8). Tiene una importante carga en la morbilidad y mortalidad perinatal (9), además del impacto en la salud a mediano y a largo plazo (8-13).

La homocisteína es un aminoácido sulfurado no proteico, intermediario en el metabolismo de la metionina. La metionina es un aminoácido esencial, precursor y componente de péptidos y proteínas provenientes de la dieta. El metabolismo de la homocisteína-metionina tiene dos rutas: transulfuración y remetilación (14, 15). El metabolismo de la homocisteína-metionina y folato participa en procesos como síntesis de purinas y pirimidinas (síntesis de ácidos nucleicos), síntesis de proteínas y generación de S-adenosilmetionina (reacciones de metilación) (15-17). Las concentraciones sanguíneas de homocisteína son determinadas por factores genéticos como los polimorfismos o las variaciones en los genes de las enzimas implicadas en estas rutas metabólicas, y por factores nutricionales como los niveles de vitamina B12, folato y vitamina B6 (14).

Durante el embarazo, en condiciones normales, se incrementan los requerimientos de folato y disminuye la concentración de homocisteína total plasmática (tHcy) en comparación con mujeres no embarazadas (18, 19), lo que sugiere un papel importante de esta vía metabólica durante el embarazo (13, 20). Se ha reportado que las concentraciones basales de tHcy disminuyen gradualmente durante el inicio y la mitad del embarazo hasta alcanzar los valores inferiores al final del mismo, sin disminución posterior (13, 20). Mientras que los niveles de homocisteína posparto, además de ser mayores que los del embarazo, son similares a los del periodo preconcepcional (13, 19). Por otra parte, aunque es claro que los niveles de vitamina B12 y folato disminuyen durante la gestación, no se sabe cuáles son los factores involucrados y el papel de cada uno de ellos. Se ha postulado que la hemodilución, la influencia hormonal, el aumento de los requerimientos y el déficit nutricional podrían ser factores importantes (21). Durante el embarazo, la alteración del metabolismo de la homocisteína-metionina y folato ha sido asociada a trombosis venosa profunda, desprendimiento prematuro de placenta, preeclampsia, defecto del tubo neural, RCIU y muerte fetal (22, 23).

En la revisión de la literatura evidenciamos que el

metabolismo de la homocisteína-metionina y folato juega un papel importante en el desarrollo normal del embarazo, y en el crecimiento y desarrollo del embrión-feto, y es probable que la alteración de esta vía metabólica, que podría ser de origen genético, se asocie al desarrollo de RCIU. El objetivo general de esta investigación es hacer una aproximación para evaluar la asociación entre alteración del metabolismo de la homocisteína-metionina y folato con embarazos complicados con RCIU, a través del estudio de los niveles de homocisteína pre y posparto, vitamina B12 y folato, así como las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos genéticos de enzimas que participan en la vía metabólica de la homocisteína-metionina y folato en gestantes con embarazos complicados con restricción de crecimiento intrauterino y en embarazo normal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio observacional analítico de tipo casos y controles. Se incluyeron como casos gestantes con embarazos complicados con RCIU definido como peso fetal estimado menor al percentil 10 para la edad gestacional y sexo según las tablas de crecimiento. Se usaron curvas de peso al nacer de población colombiana para evaluar el peso según la edad gestacional y el sexo del recién nacido (24). Se excluyeron de los casos las gestantes con embarazos con RCIU de causa conocida, fetos-recién nacidos con malformaciones fetales mayores o impresión diagnóstica de patología genética, gestantes con condiciones protrombóticas y mortinatos, así como evidencia de alguna de estas patologías en el análisis histopatológico. El grupo control correspondió a gestantes con embarazo sin complicaciones y con recién nacido sano, sin evidencia de alteración de la placenta en el análisis histopatológico. Las gestantes evaluadas fueron reclutadas para el estudio en el periodo comprendido entre septiembre de 2009 y diciembre de 2010 a través del servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario San Ignacio (IV nivel de complejidad) de Bogotá que atiende pacientes del aseguramiento contributivo.

Tamaño muestral y muestreo: se reclutaron 8 casos y 21 controles, a través de muestreo por conveniencia.

Procedimiento: previa autorización para ingresar al estudio mediante la firma del consentimiento informado se diligenció formato para recolección de datos relevantes de la historia clínica, cuestionario de hábitos alimentarios y recordatorio 24 horas de la madre para evaluar algunas variables de interés; se realizó examen físico y valoración nutricional. El cuestionario de hábitos alimentarios y el recordatorio 24 horas son los usados en la valoración de rutina durante la consulta nutricional. Además, a las gestantes se les tomó una muestra de sangre en dos tubos (5 cc) con EDTA para el análisis de los polimorfismos genéticos y en un tubo con heparina (5 cc) para cuantificación de homocisteína (durante el tercer trimestre de embarazo y tres meses posparto), folato y vitamina B12 en plasma, en ayuno. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta su procesamiento. Los niveles plasmáticos de folato y vitamina B12 se determinaron mediante un inmunoensayo enzimático quimioluminiscente competitivo (25). La concentración de tHcy se determinó por inmunoensayo competitivo basado en inmunoanálisis de polarización de la fluorescencia (fluorescence polarization immunoassay, FPIA) (26). El ADN genómico se aisló a partir de sangre periférica mediante el método *Salting out* o “extrac-

ción salina” (27). Las condiciones de la amplificación para el análisis del polimorfismo C677T de la MTHFR y de los polimorfismos C699T, C1080T y 844ins68 de la CBS fueron descritas por Bermúdez *et al.* (28). Para los polimorfismos CBS C699T, CBS C1080T, MTHFR C677T, MTHFR A1298C (29) y MTRR A66G (30) se realizó amplificación del fragmento de interés por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y genotipificación por polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Para el análisis del polimorfismo 844ins68 del gen CBS se realizó amplificación de un fragmento del intrón 7 - exón 8, de 805 pares de bases para el “wild type”, y de 873 pares de bases cuando el polimorfismo está presente. Para el análisis del polimorfismo VNTR 31pb del gen CBS se realizó amplificación por PCR de fragmentos entre 660-908 pares de bases y se genotipificó de acuerdo con la longitud del fragmento por la presencia de los polimorfismos de 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21 repeticiones (31-34) (tabla 1). Esta metodología fue revisada y analizada con las herramientas electrónicas: Primer3 (35) y Rebase (36).

Variables medidas: edad materna, edad gestacional (tomada de la historia clínica y determinada por el método de Ballard), talla materna, peso pregestacional, índice de masa corporal (IMC) pregestacional, incremento de peso en el embarazo, periodo inter-

Tabla 1.
Condiciones para la genotipificación de los polimorfismos genéticos

Polimorfismo	Primer con sentido	Primer antisentido	Enzima de restricción
CBS C699T	5' CAGCAACCCCCTGGCTCACT3'	5' CAGCCATGCCCTGTGTTTGCTATT3'	RsaI
CBS C1080T	5' CAGTGCCACCCCAGCTCATT3'	5' GGCTCCTCCCCTCCAGTTCT3'	BstUI
MTHFR C677T	5' TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA3'	5' AGGACGGTGCGGTGAGAG3'	Taq I
MTHFR A1298C	5' ATGTGGGGGAGGAGCTGAC3'	5' GTCTCCCACTTACCCTTCTCCC3'	MboII
MTRR A66G	5' AGCAGGGACATGCAAAGGCCATCGCAGAAGACAT3'	5' CTCTAACCTTATCGGATACTAATA3'	NspI
CBS 844ins68	5' CCGCAGGGTGGTCTGTCTGGACTG3'	5' AGCCCCACTGAGCATCCGTGTGAC3'	No Aplica
CBS VNTR31pb	5' TGCAGCCGTCAGACCAAG3'	5' TTAAGTCCCCAAAACCGG3'	No Aplica

genésico, primigravidez, antecedente de RCIU, condiciones socioeconómicas desfavorables (gestantes pertenecientes a estratos 1-3), consumo habitual de frutas y verduras, ejercicio regular periconcepcional, ingesta de multivitamínicos, ingesta de ácido fólico, de sulfato ferroso, y de calcio, peso, sexo y talla del recién nacido, niveles de homocisteína en el embarazo ($\mu\text{mol/L}$), niveles de homocisteína posparto ($\mu\text{mol/L}$), cambio en los niveles de homocisteína posparto respecto a los gestacionales (presentado como el porcentaje de disminución de la concentración en el embarazo con respecto a la concentración de homocisteína plasmática posparto), hiperhomocisteinemia (definida con valores $> 9,16 \mu\text{mol/L}$ ($\bar{X}:(5,47)+2\text{DE}:(1,84)$) de acuerdo con nuestros resultados, y $> 10,5 \mu\text{mol/L}$ de acuerdo con López-Quesada *et al.* (37), concentración de folato plasmático (ng/mL), déficit moderado de folato (3,0-6,0 ng/mL) según González-Gross *et al.* (38), déficit de vitamina B12 ($\leq 200 \text{pg/mL}$) de acuerdo con Stabler *et al.* (39). También se determinaron los alelos y los genotipos para los polimorfismos CBS VNTR 31pb, CBS 844ins68, CBS C1080T, CBS C699T, MTRR A66G, MTHFR C677T y MTHFR A1298C.

Análisis: las variables cuantitativas fueron descritas como mediana y rango. Las variables categóricas se presentaron con frecuencias absolutas y relativas. Se realizó análisis con prueba exacta binomial para la comparación de las frecuencias, cuando el evento tuvo frecuencia de cero se atribuyó la presencia de un evento entre todos los sucesos evaluados (como menor probabilidad posible) para poder hacer análisis con prueba binomial exacta. Se utilizó la prueba de Mann Whitney para la comparación de las medianas. Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa Stata versión 9.1. Las frecuencias alélicas y genotípicas se calcularon por conteo manual. Se realizó la evaluación del equilibrio Hardy-Weinberg en el grupo control con el programa Genepop versión 4.0.

Aspectos éticos: se contó con el aval del comité de ética de la Facultad de Medicina de la Pontificia

Universidad Javeriana. El ingreso de cada paciente al estudio se hizo previo consentimiento informado.

RESULTADOS

Las características basales y los antecedentes nutricionales fueron similares entre los casos y los controles. A pesar de que los casos tenían una mediana 7 kg menor que los controles, esta diferencia no se consideró clínicamente significativa debido a que el grupo control tenía una talla ligeramente mayor y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el índice de masa corporal (IMC) (tabla 2). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el antecedente de embarazo con RCIU y en el peso del recién nacido (tabla 3).

Ninguna de las gestantes evaluadas –ni casos ni controles– tuvo una ingesta regular y adecuada de ácido fólico, sulfato ferroso o multivitamínicos. Solo una gestante del grupo control tomo ácido fólico preconcepcional. El 62,50% de los casos, y el 71,43% de los controles fueron clasificadas como gestantes con dieta adecuada de metionina ($p = 0,6964$); por otra parte, el 50% de los casos y el 38,10% de los controles recibieron una dieta adecuada en folato ($p = 0,4899$). Respecto a la vitamina B12, 50% de los casos y 52,38% de los controles tuvieron una dieta adecuada ($p = 1,0000$).

No se encontró diferencia entre los grupos de pacientes con RCIU y el grupo control en los niveles de homocisteína durante el embarazo ni posparto, folato o vitamina B12; tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en la disminución de la concentración de tHcy en el embarazo. Se evaluaron los niveles de tHcy posparto en 14 de los 21 controles (66,66%) (tabla 4). En cuanto a la evaluación de hiperhomocisteinemia en el embarazo, no se encontró ninguna gestante con esta condición bajo los dos criterios utilizados. Por otro lado, 23,80% de las gestantes control tuvieron déficit mixto de folato y vitamina B12, y 47,61% presentaron algún tipo de déficit de estas vitaminas, solo en el 28,57% de las gestantes control se encontraron niveles normales de estas

Tabla 2.
Variables maternas en los grupos de estudio

Variable	Casos n = 8	Controles n = 21	Valor de P
Edad materna (años)	26,50 (20-34)	28,00 (20-38)	0,3649
Talla materna (cm)	154,50 (148-168)	156,00 (150-168)	0,2858
Peso pregestacional (kg)	49,00 (39-78)	56,00 (49-74)	0,1366
IMC pregestacional	21,35 (17,80-28,65)	23,01 (18,82-27,85)	0,2025
Incremento de peso en el embarazo (kg)	10,50 (6,00-17,50)	13,00 (8,00-20,00)	0,4235
Periodo intergenésico (meses)	72,00 (5,00-84,00)	60,00 (12,00-144,00)	0,9373
Primigravidez	3 (37,50)	3 (14,29)	0,0934
Antecedente de RCIU	4 (80,00)	0 (0,00)	<0,0001
Condiciones socioeconómicas desfavorables*	6 (75,00)	19 (95,00)	0,0572
Consumo habitual de frutas y verduras	5 (62,50)	10 (47,62)	0,4905
Ejercicio regular periconcepcional	1 (12,50)	1 (4,76)	0,3230
Ingesta de multivitamínicos	3 (60,00)	6 (28,57)	0,6964
Ingesta de ácido fólico	7 (87,50)	14 (66,67)	0,2829
Ingesta de sulfato ferroso	6 (75,00)	11 (52,38)	0,2935
Ingesta de calcio	3 (60,00)	7 (33,33)	0,7268

Las variables son presentadas con mediana (rango) y con frecuencia absoluta (%).
IMC: índice de masa corporal

Tabla 3.
Variables del recién nacido en los grupos de estudio

Variable	Casos n = 8	Controles n = 21	Valor de P
Edad gestacional (semanas)	37,50 (31,00-40,00)	38,00 (37,00-42,00)	0,1052
Peso al nacer (g)	2230 (895-2775)	2855 (2470-3460)	0,0003
Talla al nacer (cm)	47,50 (33-51)	48,00 (45-52)	0,2642
Masculino	2 (25,00)	7 (33,33)	1,0000
Femenino	6 (75,00)	14 (66,67)	

Las variables están presentadas con mediana (rango) y con frecuencia absoluta (%).

vitaminas en el tercer trimestre del embarazo. Los niveles de la vitamina B12 no pudieron ser analizados cuantitativamente debido a que el resultado reportado en un caso y seis controles fue < 150 pg/mL, límite de lectura de la prueba utilizada.

La valoración del equilibrio de Hardy-Weinberg en los controles evidenció que las frecuencias genotípicas de los polimorfismos se encontraban en equilibrio ($p > 0,05$). Se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,0024$) en las

concentraciones de folato plasmático entre las gestantes portadoras del alelo T (genotipos TT y CT) del polimorfismo MTHFR C677T y las no portadoras (CC), 5,54 ng/mL (rango: 4,26-14,30) y 8,98 ng/mL (rango: 6,66-19,9), respectivamente. Asimismo, se halló asociación entre el estado portador del alelo T ($p = 0,0002$) y los genotipos TT y CT ($p < 0,0001$) con el déficit de folato. Vale la pena resaltar que ninguna de las gestantes control con genotipo CC tuvo déficit de folato. Para el polimorfismo CBS

Tabla 4.
Niveles de homocisteína, folato y vitamina B12 en los grupos de estudio

Variable	Casos n = 8	Controles n = 21	Valor de p
Niveles homocisteína en el embarazo ($\mu\text{mol/L}$)§	5,48 (2,35-8,98)	5,20 (2,36-8,48)	0,7403
Niveles de homocisteína posparto ($\mu\text{mol/L}$)§	6,63 (4,85-8,30)	6,67 (4,83-10,10)	0,8317
Diferencia entre homocisteína en embarazo y posparto	35,92 (3,28-51,55)	19,27 (3,04-69,90)	0,5954
Concentración de folato plasmático (ng/mL)*	8,81 (4,62-18,80)	6,58 (4,26-19,90)	0,1959
Déficit moderado de folato (3,0-6,0 ng/mL)**	1 (12,50)	9 (42,86)	0,1495
Déficit de vitamina B12 (≤ 200 pg/mL)**	3 (37,50)	11 (52,38)	0,4905

* Los datos están presentados como mediana (rango).

** Se presenta frecuencia absoluta (frecuencia relativa).

VNTR31pb se observó que las gestantes con genotipo 18/18 tenían niveles más bajos de folato (mediana: 5,84 ng/mL; rango: 4,26-14,30) con respecto a las no portadoras de este genotipo (mediana: 7,58 ng/mL; rango: 4,50-19,90), sin diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,1688$). Sin embargo, la presencia del alelo 18 ($p = 0,0050$) y del genotipo 18/18 ($p = 0,0242$) se encontró asociada a déficit de folato. También se observó que el estado portador del genotipo 18/18 del polimorfismo CBS VNTR31pb y portador de genotipo TT o CT del polimorfismo MTHFR C677T estuvo asociado con niveles bajos de folato plasmático (mediana: 5,47 ng/mL; rango: 4,26-14,3) comparado con las gestantes no portadoras de estos genotipos (mediana: 7,50 ng/mL; rango: 4,50-19,90), con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,0346$). La presencia de estos genotipos también se asoció a déficit moderado de folato ($p = 0,0004$), 70% déficit de folato en gestantes con genotipos 18/18 y CT o TT, y 22,22% de gestantes con déficit de folato en las gestantes no portadoras de esta combinación de genotipos. No se encontraron otras asociaciones entre los niveles de tHcy, folato y vitamina B12 para los demás polimorfismos evaluados en el grupo control, ni se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de tHcy, folato y vitamina B12, así como de los estados de déficit vitamínicos, entre los grupos caso y control.

Con respecto a los polimorfismos genéticos se evidenció asociación del genotipo 18/18 del

polimorfismo CBS VNTR31pb con RCIU ($p = 0,0277$). La presencia simultánea del genotipo 18/18 del polimorfismo CBS VNTR31pb y de los genotipos TT o CT del polimorfismo MTHFR C677T también se asoció a RCIU ($p = 0,0315$). Los demás polimorfismos genéticos evaluados no se asociaron con RCIU (tabla 5).

DISCUSIÓN

No se encontró asociación entre los niveles de homocisteína pre y posparto, vitamina B12 y folato preparto, y tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en la disminución de la concentración de tHcy en el embarazo. Encontramos que la concentración de tHcy materna en el tercer trimestre de embarazos sin complicaciones es menor que la concentración tres meses posparto, lo cual corresponde a lo reportado en la literatura (13, 14, 18, 19, 40). Sin embargo, las concentraciones durante el embarazo fueron 19,27% menores que los niveles posparto, valor inferior a lo reportado en la literatura (29-60%) (19, 41, 42). Al comparar los niveles de tHcy (5,20 $\mu\text{mol/L}$) obtenidos durante el tercer trimestre de embarazos normales con los reportados por otros estudios, encontramos que son semejantes a lo descrito por Patrick *et al.* (43) en Estados Unidos (5,5 $\mu\text{mol/L}$) y Murphy *et al.* (41) en España (5,16 $\mu\text{mol/L}$), y menores a los encontrados por Sánchez *et al.* (44) en Perú y López-Quesada *et al.* (37) en

Tabla 5.
Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos genéticos en los grupos de estudio

Polimorfismo		Casos n = 8	Controles n = 21	Valor de p
CBS VNTR 31pb	Alelo 18	16 (100,00)	34 (80,95)	0,0546
	Genotipo 18/18	8 (100,00)	13 (61,90)	0,0277
CBS 844ins68	Alelo ins	0 (0,00)	2 (9,52)	1,0000
	Genotipo Wt/ins	0 (0,00)	2 (4,76)	1,0000
CBS C1080T	Alelo T	4 (28,57)	11 (28,95)	1,0000
	Genotipo TT	1 (14,29)	3 (15,79)	1,0000
	Genotipo TT o CT	3 (42,86)	8 (42,11)	1,0000
CBS C699T	Alelo T	2 (12,50)	12 (28,57)	0,2655
	Genotipo CT	2 (25,00)	12 (57,14)	0,0813
MTRR A66G	Alelo G	9 (56,25)	16 (38,10)	0,1960
	Genotipo GG	3 (37,50)	5 (23,81)	0,4054
	Genotipo GG o AG	6 (75,00)	11 (52,38)	0,2935
MTHFR C677T	Alelo T	10 (62,50)	18 (42,86)	0,1324
	Genotipo TT	3 (37,50)	5 (23,81)	0,4054
	Genotipo TT o CT	7 (87,50)	13 (61,90)	0,1667
MTHFR A1298C	Alelo C	2 (12,50)	9 (21,43)	0,5479
	Genotipo CC	0 (0,00)	1 (4,76)	1,0000
	Genotipo CC o AC	2 (25,00)	8 (38,10)	0,7185

Se presentan las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos como frecuencia absoluta (%). No se encontraron individuos con genotipo TT para el polimorfismo CBS C699T ni en las gestantes control ni en gestantes con embarazo con RCIU.

España, 6,7 $\mu\text{mol/L}$ y 6,3 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Llama la atención que los niveles de tHcy no sean mayores debido a la frecuencia de niveles bajos de folato y vitamina B12, aunque es posible que el déficit de estas vitaminas sea de origen nutricional y esté acompañado de baja ingesta de alimentos ricos en metionina. La baja ingesta de metionina podría influir negativamente en la concentración de tHcy. Una dieta asociada a concentraciones altas de tHcy es probablemente baja en otros nutrientes además del folato, y los resultados pueden reflejar un déficit nutricional más general. Además, aunque la concentración elevada de tHcy es un marcador sensible del estado de folato, otros nutrientes y otros factores no nutricionales están también asociados (45). Los niveles de folato plasmático en los controles mostraron que el 42,86% de las madres cursaban con déficit moderado en el tercer trimestre de embarazo.

En relación con este hallazgo debemos considerar un consumo insuficiente de alimentos ricos en esta vitamina que permita suplir la demanda del feto (38), así como conductas que podrían disminuir el contenido de esta vitamina en los alimentos, como cocinar los vegetales (46). Vale la pena resaltar que en la literatura existe evidencia que sugiere que la suplementación con ácido fólico puede reducir la prevalencia de anemia megaloblástica, defectos del tubo neural, labio paladar hendido, preeclampsia, abruptio de placenta, RCIU y muerte fetal (17, 47, 48), por lo cual se reglamentó la fortificación de alimentos con ácido fólico en varios países y se recomendó la suplementación con ácido fólico en otros (49-51). Al respecto, se observó que las gestantes no realizaban la suplementación de acuerdo con las recomendaciones de los expertos, situación reportada como una dificultad en los países que no tienen

políticas de fortificación de alimentos (47). Además, en el grupo control se encontraron niveles muy bajos de vitamina B12 (≤ 150 pg/mL) en 28,57% de las madres, con una frecuencia de déficit de 52,38%. Al respecto, se ha sugerido que muchas gestantes podrían tener dietas bajas en consumo de proteínas de origen animal, fuente dietética de vitamina B12, debido a sus precios elevados en el mercado (21, 52, 53). Las infecciones parasitarias o bacterianas también podrían desempeñar un papel en el déficit de vitamina B12. Igualmente, las gestantes con déficit de vitamina B12 tuvieron con frecuencia concentraciones bajas de folato, lo que parece indicar un déficit originado en la dieta. Sin embargo, concentraciones bajas de folato también podrían ser secundarias al déficit de vitamina B12, ya que ante el déficit de esta vitamina el 5-metiltetrahidrofolato es atrapado y no puede reincorporarse a la ruta metabólica del folato (21). El déficit de vitamina B12 ha empezado a ser reconocido como un problema de salud pública a nivel mundial, y el de origen nutricional ha sido reportado como un problema grave en India, México, Sur-Centro América y algunos países de África con implicaciones en la salud de la madre y el feto (21, 39, 52-54). Por estas razones se ha sugerido que se debería realizar fortificación de alimentos con vitamina B12, con el fin de suplir el déficit en ciertos grupos demográficos como jóvenes, mujeres en edad fértil, gestantes y ancianos (55-56).

En cuanto al hallazgo positivo de asociación de antecedente de RCIU, encontramos que estos resultados están acordes con lo reportado en la literatura. Ghezzi *et al.* reportaron incremento de 6,7 veces más riesgo de tener un embarazo complicado con RCIU cuando existía el antecedente de esta restricción en un embarazo previo, lo que soporta el concepto de importantes factores genéticos heredables que participan en la fisiopatología de esta entidad (57).

Por otro lado, el hallazgo de asociación de la presencia del polimorfismo MTHFR C677T con niveles menores y déficit de folato ya ha sido reportado en la literatura (45, 57, 58). También se encontró asociación de presencia del alelo 18 y

genotipo 18/18 con déficit de folato. En la literatura no se encuentra descripción de esta asociación; no obstante, es probable que el compromiso de la vía de la transulfuración tenga un impacto en la vía de la remetilación. Adicionalmente, la combinación de genotipos 18/18 del polimorfismo CBS VNTR-31pb y TT o CT del polimorfismo MTHFR C677T se asoció a niveles menores de folato y déficit moderado de folato plasmático. De esta relación tampoco se encontró reporte en la literatura, aunque sí había sido reportada la interacción de ambos polimorfismos con efecto aditivo sobre los niveles de tHcy (32).

Respecto a los polimorfismos genéticos se evidenció asociación del genotipo 18/18 del polimorfismo CBS VNTR31pb, así como de la presencia simultánea de los genotipos 18/18 del polimorfismo CBS VNTR 31pb y genotipo TT o CT del polimorfismo MTHFR C677T con RCIU. No se encontró reporte de estos hallazgos en la literatura. No obstante, el genotipo 18/18 se ha asociado a compromiso del metabolismo de la homocisteína-metionina y aumento de los niveles de tHcy (16). En cuanto al polimorfismo MTHFR C677T, este es responsable de la variante termolábil de la MTHFR, que produce una actividad reducida de la enzima y, como consecuencia, aumento en los niveles de tHcy (28). Además, la evidencia indica que este polimorfismo no solo se relaciona con niveles elevados de tHcy y disminuidos de folato, sino con un incremento en el riesgo de aborto recurrente, infertilidad femenina, RCIU y defectos del tubo neural (45, 58, 59). Cabe resaltar que también se ha reportado que el polimorfismo y niveles bajos de folato tienen un efecto aditivo, y a su vez el efecto del polimorfismo puede ser modulado por niveles adecuados de folato (60).

CONCLUSIONES

Estos resultados preliminares sugieren que el metabolismo de la homocisteína-metionina y folato sufre modificaciones durante el embarazo, que existe una frecuencia relevante de déficit de folato y de vitamina B12 en las gestantes colombianas, así como la participación de polimorfismos genéticos en los niveles de

folato y en la ocurrencia de RCIU idiopático. Finalmente, nos incentivan para continuar el estudio del metabolismo de la homocisteína-metionina y folato en el embarazo normal, así como en complicaciones del embarazo como la RCIU en Colombia.

Agradecimientos: a todo el personal del Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario San Ignacio por su valiosa colaboración en la toma de las muestras.

REFERENCIAS

- Muñoz L, Hernández R. Retardo de crecimiento intrauterino (RCIU) y sus alteraciones bioquímicas. *NOVA* 2005;3:88-94.
- Vélez MP, Barros FC, Echavarría LG, Hormaza MP. Prevalencia de bajo peso al nacer y factores maternos asociados: Unidad de Atención y Protección Materno Infantil de la Clínica Universitaria Bolivariana, Medellín, Colombia. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 2006;57:264-70.
- Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003;69:1-7.
- Prieto R, Matamala F, Rojas M. Morphometric and Morphological Characteristics of the Placenta at Term in Small Gestational Age Newborns (SGA) in the City of Temuco-Chile. *Int J Morphol* 2008;26:615-21.
- Cuartas A. Retardo del crecimiento intrauterino. *Iatreia* 1995;8:18-25.
- Maulik D, Frances J, Ragolia L. Fetal growth restriction: pathogenic mechanisms. *Clin Obstet Gynecol* 2006;49:219-27.
- Maulik D. Fetal growth restriction: the etiology. *Clin Obstet Gynecol* 2006;49:228-35.
- Kramer MS. The Epidemiology of Adverse Pregnancy Outcomes: An Overview. *J Nutr* 2003;133:1592S-6s.
- Alexander GR, Kogan M, Bader D, Carlo W, Allen M, Mor J. US birth weight/gestational age-specific neonatal mortality: 1995-1997 rates for whites, Hispanics, and blacks. *Pediatrics* 2003;111:e61-6.10.
- Philip AG. The evolution of neonatology. *Pediatr Res* 2005;58:799-815.
- Kramer MS, Séguin L, Lydon J, Goulet L. Socio-economic disparities in pregnancy outcome: why do the poor fare so poorly? *Paediatr Perinat Epidemiol* 2000;14:194-210.
- Scifres CM, Nelson DM. Intrauterine growth restriction, human placental development and trophoblast cell death. *J Physiol* 2009;587:3453-8.
- Cikot RJ, Steegers-Theunissen RP, Thomas CM, de Boo TM, Merkus HM, Steegers EA. Longitudinal vitamin and homocysteine levels in normal pregnancy. *Br J Nutr* 2001;85:49-58.
- De la Calle M, Usandizaga R, Sancha M, Magdalena F, Cabrillo E. Homocisteína, ácido fólico y vitaminas del grupo B en ginecología y obstetricia. *Actualidad Obstet Ginecol* 2001;13:237-48.
- Menéndez A, Britto JE. Metabolismo de la homocisteína y su relación con la aterosclerosis. *Rev Cubana Invest Biomed* 1999;18:155-68.
- Sharma P, Senthilkumar R, Brahmachari V, Sundaramoorthy E, Mahajan A, Sharma A, et al. Mining literature for a comprehensive pathway analysis: a case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. *Lipids Health Dis* 2006;5:1.
- Forges T, Monnier P, Alberto JM, Guéant RM, Daval JL, Gueant JL. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update* 2007;13:225-38.
- Öztürk Ö, Karaer S, Dilara U, Efesoğlu A. Serum Homocysteine, Folate, and Vitamin B12 Levels in Pregnant and Non-Pregnant Women. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2006;26:121-5.
- Andersson A, Hultberg B, Brattstrom L, Isaksson A. Decreased serum homocysteine in pregnancy. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992;30:377-9.
- Milman N, Byg KE, Hvas AM, Bergholt T, Eriksen L. Erythrocyte folate, plasma folate and plasma homocysteine during normal pregnancy and postpartum: a longitudinal study comprising 404 Danish women. *Eur J Haematol* 2006;76:200-5.

21. Guerra EM, Morita OE, Peres S, Pagliusi RA, Sampaio LF, D'Almeida V, et al. Low ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine is associated with vitamin deficiency in Brazilian pregnant women and newborns. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1312-21.
22. Hague WM. Homocysteine and pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003;17:459-69.
23. Walker MC, Smith GN, Perkins SL, Keely EJ, Garner PR. Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:660-4.
24. Montoya NE, Correa JC. Curvas de peso al nacer. *Rev Salud Pública* 2007;9:1-10.
25. Babson AL, Olson DR, Palmieri T, Ross AF, Becker DM, Mulqueen PJ. The IMMULITE assay tube: a new approach to heterogeneous ligand assay. *Clin Chem* 1991;37:1521-2.
26. Shipchandler MT, Moore EG. Rapid, fully automated measurement of plasma homocyst(e)ine with the Abbott IMx analyzer. *Clin Chem* 1995;41:991-4.
27. Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982.
28. Bermúdez M, Briceño I, Gil F, Bernal J. Homocisteína y polimorfismos de cistationina β sintasa y metileno-tetrahidrofolato reductasa en población sana de Colombia. *Colomb Med* 2006;37:46-52.
29. van der Put NMJ, Blom HJ. Reply to Donnelly. *Am J Hum Genet* 2000;66:744-5.
30. Ananth CV, Elsasser DA, Kinzler WL, Peltier MR, Getahun D, Leclerc D, et al. Polymorphisms in methionine synthase reductase and betaine-homocysteine S-methyltransferase genes: Risk of placental abruption. *Mol Genet Metab* 2007;91:104-10.
31. Lievers KJ, Kluijtmans LA, Heil SG, Boers GH, Verhoef P, van Oppenraay-Emmerzaal D, et al. A 31 bp VNTR in the cystathionine beta-synthase (CBS) gene is associated with reduced CBS activity and elevated post-load homocysteine levels. *Eur J Hum Genet* 2001;9:583-9.
32. Afman LA, Lievers KJ, Kluijtmans LA, Trijbels FJ, Blom HJ. Gene-gene interaction between the cystathionine beta-synthase 31 base pair variable number of tandem repeats and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C > T polymorphism on homocysteine levels and risk for neural tube defects. *Mol Genet Metab* 2003;78:211-5.
33. Gan YY, Chen CF. Novel alleles of 31-bp VNTR polymorphism in the human cystathionine β -synthase (CBS) gene were detected in healthy Asians. *J Genet* 2010;89:449-55.
34. Lievers KJA, Kluijtmans LAJ, Blom HJ, Wilson PW, Selhub J, Ordovas JM. Association of a 31bp VNTR in the CBS gene with postload homocysteine concentrations in the Framingham Offspring Study. *Eur J Hum Genet* 2006;14:1125-9.
35. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000;132:365-86.
36. Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D. REBASE—a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 2010;38:D234-D6.
37. López E, Vilaseca MA, Laila JM. Plasma total homocysteine in uncomplicated pregnancy and in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;108:45-9.
38. González Gross M, Sola R, Castillo M. Folato: una vitamina en constante evolución. *Med Clin* 2002;119:627-35.
39. Stabler SP, Allen RH. Vitamin B12 deficiency as a worldwide problem. *Annu Rev Nutr* 2004;24:299-326.
40. Aubard Y, Darodes N, Cantaloube M. Hyperhomocysteinemia and pregnancy—review of our present understanding and therapeutic implications. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;93:157-65.
41. Murphy MM, Scott JM, McPartlin JM, Fernandez-Ballart JD. The pregnancy-related decrease in fasting plasma homocysteine is not explained by folic acid supplementation, hemodilution, or a decrease in albumin in a longitudinal study. *Am J Clin Nutr* 2002;76:614-9.
42. Bonnette RE, Caudill MA, Boddie AM, Hutson AD, Kauwell GP, Bailey LB. Plasma homocyst(e)ine concentrations in pregnant and nonpregnant women

- with controlled folate intake 2. *Obstet Gynecol* 1998;92:167-70.
43. Patrick TE, Powers RW, Daftary AR, Ness RB, Roberts JM. Homocysteine and folic acid are inversely related in black women with preeclampsia. *Hypertension* 2004;43:1279-82.
 44. Sanchez SE, Zhang C, Rene Malinow M, Ware-Jauregui S, Larrabure G, Williams MA. Plasma folate, vitamin B12, and homocyst (e) ine concentrations in preeclamptic and normotensive Peruvian women. *Am J Epidemiol* 2001;153:474-80.
 45. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessing HK, et al. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 2000;71:962-8.
 46. Cardona H, Cardona-Maya W, Gómez JG, Castañeda S, Gómez JM, Bedoya G, et al. Relationship between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and homocysteine levels in women with recurrent pregnancy loss: a nutrigenetic perspective. *Nutr Hosp* 2008;23:277-82.
 47. Tamura T, Picciano MF. Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr* 2006;83:993-1016.
 48. Chávez DV, Velazco MR, Sanin LH, Levario M, Aguirre AA, Martínez LE. Relation Between Levl of Folic acid, Vitamin B12 and Maternal Homocysteine with Neural Tube Defects and Cleft Lip. *Int J Morphol* 2008;26:905-14.
 49. López JS, Castilla EE, Orioli IM. Folic acid flour fortification: Impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries. *Am J Med Genet A* 2010;152A:2444-58.
 50. US Food and Drug Administration. Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. *Fed Regist* 1996;61:8781-97.
 51. Hertrampf E, Cortés F. Folic acid fortification of wheat flour: Chile. *Nutr Rev* 2004;62:S44-S8.
 52. Schulpis K, Spiropoulos A, Gavrii S, Karikas G, Grigori C, Vlachos G, et al. Maternal–neonatal folate and vitamin B12 serum concentrations in Greeks and in Albanian immigrants. *J Hum Nutr Diet* 2004;17:443-8.
 53. Garcia-Casal M, Osorio C, Landaeta M, Leets I, Matus P, Fazzino F, et al. High prevalence of folic acid and vitamin B12 deficiencies in infants, children, adolescents and pregnant women in Venezuela. *Eur J Clin Nutr* 2005;59:1064-70.
 54. Forrellat M, Góms I, Gautier du Défaix H. Vitamina B12: metabolismo y aspectos clínicos de su deficiencia. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1999;15:159-74.
 55. Green R. Is it time for vitamin B-12 fortification? What are the questions? *Am J Clin Nutr* 2009;89:712S-6S.
 56. Carmel R. Mandatory fortification of the food supply with cobalamin: an idea whose time has not yet come. *J Inherit Metab Dis* 2011;34:67-73.
 57. Ghezzi F, Tibiletti MG, Raio L, Di Naro E, Lischetti B, Taborelli M, et al. Idiopathic fetal intrauterine growth restriction: a possible inheritance pattern. *Prenat Diagn* 2003;23:259-64.
 58. Ruoti M, Louí LA, Fabrè E. Papel de homocisteína en el metabolismo celular y su relación con el embarazo. *Progresos en diagnóstico y tratamiento prenatal* 2003;15:32-4.
 59. D’Uva M, Di Micco P, Strina I, Alviggi C, Iannuzzo M, Ranieri A, et al. Hyperhomocysteinemia in women with unexplained sterility or recurrent early pregnancy loss from Southern Italy: a preliminary report. *Thromb J* 2007;5:10.
 60. Engel SM, Olshan AF, Siega-Riz AM, Savitz DA, Chanock SJ. Polymorphisms in folate metabolizing genes and risk for spontaneous preterm and small-for-gestational age birth. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:1231.e1-e11.

Conflicto de intereses: ninguno declarado.