

Frecuencia del polimorfismo C677T de la 5, 10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en mujeres chilenas madres de afectados con espina bífida y en controles normales

Felipe Nitsche V^{1a}, M Angélica Alliende R^{1b},
J Luis Santos M^{1c}, Francisco Pérez B^{1c},
Lorena Santa María V^{1d}, Eva Hertrampf D², Fanny Cortés M¹.

Frequency of C677T polymorphism of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in Chilean mothers of spina bifida cases and controls

Background: Several population studies have shown that patients with neural tube defects (NTD), have a higher frequency of a genetic mutation related with thermolability of the enzyme 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). There are regional and ethnic variations in the genotypic or allelic frequency of this mutation and its possible relationship with NTD and others congenital anomalies. **Aim:** To estimate the frequency of the C677T polymorphism of MTHFR in control women and mothers of spina bifida cases. **Patients and Methods:** We analyzed 58 blood samples from mothers who had a child diagnosed with spina bifida. A group of 184 healthy mothers matched by age and with no NTD offspring served as controls. We determined the C677T polymorphism on the MTHFR gene by means of PCR and the analysis of the digestion pattern of *HinfI* restriction enzyme. **Results:** The genotypic frequencies showed concordance with Hardy-Weinberg equilibrium, in controls ($p=0.35$), and in mothers of the cases ($p=0.95$). The odds ratio to the TT genotype compared with the CC genotype (reference category) was estimated as 1.54 (IC 95%: 0,66-3,61), while the odds ratio for the TC genotype compared with CC genotype was 1.06 (IC 95%: 0,48-2,33). **Conclusion:** No differences in the C677T polymorphism of the MTHFR were observed between mothers who had a child diagnosed with spina bifida and control mothers (Rev Méd Chile 2003; 131: 1399-404).

(Key Words: Genetics, medical; Methylenetetrahydrofolate Reductase; Spinal dysraphism)

Recibido el 22 de mayo, 2003. Aceptado en versión corregida el 18 de agosto, 2003. Financiamiento parcial, con fondos aportados por MARCH OF DIMES/CDC al proyecto: Evaluación del impacto de la fortificación de la harina con ácido fólico en Chile.

¹Programa de Genética y Enfermedades Metabólicas, INTA, Universidad de Chile. ²Programa de Micronutrientes, INTA, Universidad de Chile. ³Biotecnólogo. Universidad Vicente Pérez Rosales. ⁴Magister en Ciencias Biológicas c/m Genética, Universidad de Chile. ⁵Doctor en Ciencias. ⁶Bioquímico. Candidato a Doctor, Universidad de Chile.

Correspondencia a: M Angélica Alliende R. Laboratorio de Citogenética Molecular, INTA, Universidad de Chile. Macul 5540, casilla 138-11. Santiago de Chile.
E mail: malliend@inta.cl

Los defectos de cierre del tubo neural (DTN) que son defectos de la cubierta músculo-esquelética que protege al sistema nervioso central y que incluyen anencefalia, encefalocele y espina bífida, pueden ocurrir en forma aislada o formando parte de un síndrome de múltiples malformaciones congénitas. Aquellos que ocurren en forma aislada son considerados las malformaciones únicas más frecuentes después de las cardiopatías congénitas, con una frecuencia al nacer de 1-3 por 1.000. Son defectos poligénicos multifactoriales con múltiples genes involucrados interactuando con el medio ambiente. Entre los genes participantes, aquellos relacionados con el metabolismo del ácido fólico han mostrado un rol importante en la susceptibilidad al defecto¹.

Múltiples estudios de intervención y de observación realizados durante los últimos 25 años han permitido determinar que el ácido fólico, consumido periconcepcionalmente, ejerce un claro rol protector sobre los defectos de cierre del tubo neural (DTN)²⁻⁶. Además, estudios realizados en algunas poblaciones han mostrado que los pacientes con DTN, presentan con mayor frecuencia la mutación denominada C677T, que se relaciona con la termolabilidad de la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)^{7,8}. Sin embargo, en poblaciones como la italiana, en que la frecuencia de la mutación es muy alta, la incidencia de DTN es relativamente baja¹; en población germana no se ha encontrado evidencias de una asociación entre DTN y mutaciones en la MTHFR⁹.

El gen de la MTHFR contiene 2,2 kilobases, está localizado en el cromosoma 1(1p36.3) y codifica para una proteína de 77 K Da, que constituye una enzima clave en el metabolismo del folato y la homocisteína. El alelo C677T (termolábil), asociado con un aumento de la susceptibilidad para DTN, se caracteriza por una mutación puntual en la posición 677 del exón 4 del gen, que consiste en una transición de una citosina (C) por timina (T). Esta mutación determina la sustitución del aminoácido alanina por valina en el dominio catalítico de la enzima^{9,10}. El genotipo 677TT de la MTHFR, está asociado con una deficiencia parcial de esta enzima que se traduce en la disminución de 50% de la actividad enzimática¹¹. En condiciones de baja ingesta de folatos, el genotipo 677TT se asocia a una mode-

rada hiperhomocisteinemia¹²; disminución de la concentración de folatos en el plasma, disminución de la metilación del DNA genómico y riesgo aumentado de tener hijos con DTN¹³; se ha asociado también a síndrome de Down^{14,15}, enfermedad cardiovascular^{10,16}, algunos tipos de cáncer¹⁷ y, por consiguiente, a una menor respuesta a la suplementación con folatos¹⁸.

Diversas publicaciones han mostrado variaciones étnicas y regionales para las frecuencias alélicas y genotípicas de esta mutación. Según estos estudios el alelo 677T presenta frecuencias altas en población italiana (43,8%), en los hispanos de California (41,7%) y mexicanos (58,6%); cuyas poblaciones muestran homocigocidad para el alelo T de 18; 20,7 y 34,8% respectivamente¹³. Por otra parte, numerosos estudios han comunicado importantes variaciones étnicas y geográficas en las frecuencias del alelo T/genotipo TT como por ejemplo las descritas para población española (0,40/0,158)¹⁹; japonesa (0,35/0,115) y para población africana (0,06/0,00)²⁰.

En Chile, el Ministerio de Salud basado en todos los antecedentes disponibles, y como estrategia para disminuir la frecuencia de DTN determinó que a partir del 1º de enero de 2000 se agregara ácido fólico a la harina con un nivel de fortificación de 220 ug de ácido fólico por 100 g de harina, con lo que se espera alcanzar un aporte de 360 ug diarios de ácido fólico sólo a través del consumo de pan fortificado²¹.

Datos del ECLAMC (Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas) muestran una incidencia global de DTN en el período 1982-1996, para Chile de 1,70 por 1.000 y para el resto de los países del ECLAMC de 1,55 por 1.000. Un estudio reciente realizado en 9 maternidades públicas de Santiago, sobre un total de 60.082 recién nacidos, mostró una incidencia global de 1,56 por 1.000 recién nacidos; con incidencia de 0,75 por 1.000 para espina bífida; 0,62 por 1.000 para anencefalia y 0,18 por 1.000 para encefalocele²².

El presente estudio, primero de este tipo realizado en Chile, tiene como objetivo estimar la frecuencia de la mutación 677C → T en un grupo de madres con hijos con DTN (espina bífida) y compararla con la frecuencia observada en madres controles sanas, sin antecedentes de hijos con DTN.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se estudió una muestra constituida por 58 mujeres madres de pacientes con espina bífida (casos) y 184 mujeres controles sanas. Los casos corresponden a madres aparentemente sanas, de pacientes con espina bífida, que son atendidos en el Instituto de Rehabilitación Infantil de Santiago (TELETON), quienes firmaron un consentimiento informado para participar en este estudio, el cual fue aprobado por el Comité de Ética del INTA. Los controles son madres aparentemente sanas, sin antecedentes de DTN en su familia, cuyas edades fluctúan entre 15 y 45 años provenientes de una muestra intencionada de mujeres beneficiarias del programa de salud materno-infantil del Ministerio de Salud. Tanto casos como controles pertenecen al estrato socioeconómico bajo²³.

Amplificación por PCR y análisis de la mutación. Se extrajo ADN genómico de la muestra según protocolo establecido²⁴. La reacción de amplificación se realizó según lo descrito anteriormente⁹. Brevemente, se amplificó por PCR un fragmento de 198 pb del exón 4 del gen MTHFR; la reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 35 µl, con buffer PCR 1x, MgCl₂ 1,0 mM, 1 unidad de ADN polimerasa Taq (*Gibco Life Technologies*, Bethesda, MD), desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, TTP) 200 µM y partidores específicos 0,8 µM⁹. El producto de PCR fue luego digerido con la enzima *HinfI* (NEB) en las condiciones descritas por el proveedor.

El producto amplificado y digerido de las muestras fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo iluminación UV desde donde se obtuvo un registro fotográfico.

Estadística. La comparación de casos y controles respecto a las frecuencias alélicas y genotípicas se realizó a través de tests de Chi-cuadrado. Se evaluó la concordancia de las frecuencias genotípicas con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico STATA 7.0.

RESULTADOS

La ocurrencia de la mutación 677C → T en el exón 4 del gen MTHFR genera un sitio de restricción para la enzima *HinfI*; del fragmento original de 198 pb, correspondiente al alelo C, se originan dos productos de PCR de 175 y 25 pb respectivamente (Figura 1 carril 3).

En las muestras estudiadas la frecuencia del alelo T en madres de casos con espina bífida fue de 0,46 mientras que la frecuencia de este mismo alelo en controles fue de 0,40. Las frecuencias genotípicas calculadas de ambos grupos se muestran en la Tabla 1; observándose concordancia con el equilibrio de Hardy-Weinberg tanto en madres de casos (p=0,95) como en controles (p=0,35).

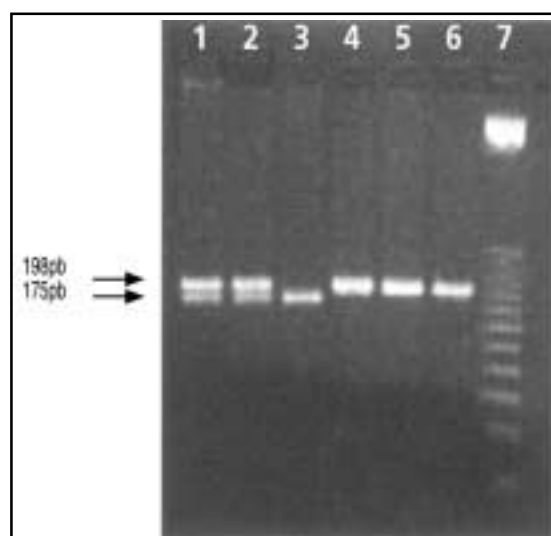


FIGURA 1. Análisis del polimorfismo C677T de la MTHFR. Carriles 1 y 2 muestran bandas de 198 pb y 175 pb que implica la existencia de un cambio de C por T al estado heterocigoto (CT), producto de la creación de un sitio de restricción para *HinfI*. En el carril 3 se observa una banda de 175 pb (la otra banda de 23 pb no se observa en el gel) que implica la existencia de un sitio de restricción en ambos alelos (TT). En los carriles 4, 5 y 6 se aprecia una sola banda de 198 pb, lo que implica ausencia del sitio de restricción (CC). Carril 7: marcador de peso molecular de 25 bp.

Tabla 1. Frecuencias genotípicas y alélicas para C677T en mujeres controles normales y en madres de pacientes con DTN

	Frecuencia Genotípica			Frecuencia Alélica	
	CC (%)	CT (%)	TT (%)	Alelo T	Alelo C
Controles (N=184)	70 (38,0)	82 (44,6)	32 (17,4)	0,40	0,60
Casos (N=58)	17 (29,3)	29 (50,0)	12 (21,0)	0,457	0,543

Al comparar ambos grupos con respecto a las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo 677C → T no se encontraron diferencias significativas (p=0,25 y 0,48). El odds ratio para el genotipo TT versus el genotipo CC se estimó como 1,54 (IC 95%: 0,66-3,61) mientras que el odds ratio del genotipo TC versus CC fue de 1,06 (IC 95%: 0,48-2,33).

DISCUSIÓN

El polimorfismo 677CT localizado en el exón 4 del gen de la enzima MTHFR es responsable de una variante termolábil de la enzima y se asocia a una actividad reducida de esta enzima. Los individuos homocigotos 677TT presentan homocisteína plasmática elevada y se les ha asociado a un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, DTN y otras malformaciones congénitas^{16,25}. Con el fin de investigar esta asociación, se han realizado un número elevado de estudios caso-control en diferentes poblaciones, revelando todas ellas una gran heterogeneidad en la prevalencia del polimorfismo 677CT con importantes variaciones étnicas y geográficas^{13,26}. Las frecuencias para el alelo T y genotipo TT varían entre 0,11/0,00 en americanos de origen africano y 0,59/0,35 en población mexicana^{17,27}. Además, en familias inmigrantes la incidencia de los DTN tiende a ajustarse al nivel de la nueva población a la cual se integran. Todos estos antecedentes apuntan fuertemente a sugerir que el riesgo de nacimientos de niños con DTN estaría asociado tanto a mutaciones en el gen de la MTHFR, como al estado nutricional de folatos de la madre.

En este estudio, que constituye el primero de este tipo en población chilena, se determinó que en el grupo de madres controles, sin antecedentes de hijos con DTN, el alelo 677T se presenta con

una frecuencia relativamente alta; igual a la observada en población española (40%) y similar a los hispanos de California (41,7%). Más aún, la frecuencia del alelo 677T entre madres de hijos con DTN, detectada en este estudio, es mayor (46%). Así mismo, se observa mayor frecuencia de la mutación al estado homocigoto (genotipo TT) entre las madres de hijos con DTN (21%) que en las mujeres controles normales (17,4%).

Dado que las diferencias encontradas sugieren una tendencia sin alcanzar significancia estadística, no podemos señalar que para esta población estudiada la presencia de este alelo constituya un factor de riesgo aumentado de DTN; esta situación ha sido previamente descrita en un estudio similar realizado en población alemana⁹. Las mínimas diferencias encontradas podrían ser corroboradas a través del estudio de un número mayor de casos; sin embargo, cálculos de tamaño de muestra realizados previamente y basados en revisiones de metaanálisis¹³ indicaron que sería necesario un tamaño de muestra muy superior al presentado en nuestro trabajo para lograr un adecuado poder estadístico. Por esta razón, el presente trabajo se planteó como un estudio exploratorio sobre la caracterización del polimorfismo C677T en la población chilena y su posible asociación con espina bífida a través del análisis de la homocigocidad materna del alelo TT. Lo que continúa es ampliar el número de casos incluyendo todo el espectro de los DTN, encefalocele y anencefalia, y no sólo espina bífida.

Existe además, un estudio realizado en una muestra representativa de la población española (n=1.770 sujetos) entre los 0 a los 85 años que señala un aumento sustancial de la frecuencia alélica del polimorfismo 677C → T en individuos menores de 25 años comparados con individuos mayores de 75 años de la misma población; esta

aparente selección genética sería producto del incremento en la ingesta de ácido fólico en etapas tempranas de la gestación²⁸. La condición de defectos poligénicos multifactoriales de los DTN implica posiblemente la existencia de un umbral de expresión tal que niveles elevados de folato materno podrían rescatar genotipos TT los cuales en ausencia de suplementación materna serían letales.

Estas observaciones sumadas a la alta frecuencia del polimorfismo de la enzima MTHFR identificado en población chilena acentúan la importancia de este tipo de estudios en nuestra población, a fin de identificar individuos con riesgo aumentado de otras patologías frecuentes como enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer que han mostrado relación con el estado nutricional de folatos y probablemente focalizar en ellos otros programas de prevención.

REFERENCIAS

1. BOTTO L, MOORE C, KHOURY J, ERICKSON D. Medical Progress: Neural Tube Defects. *N Engl J Med* 1999; 341: 1509-19.
2. SMITHELLS RW, SHEPPARD S, SCHORAH CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 1976; 51: 944.
3. CZEIZEL AE, DUDAS I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992; 327: 1832-5.
4. MEDICAL RESEARCH COUNCIL VITAMIN STUDY RESEARCH. Prevention of Neural Tube Defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991; 338: 131-7.
5. BERRY RJ, LI Z, ERICKSON JD, LI S, MOORE CA, WANG H ET AL. Prevention of neural tube defects with folic acid in China. China USA Collaborative Project for Neural Tube Defect prevention. *N Engl J Med* 1999; 341: 1485-90.
6. LOCKSMITH GJ, DUFF P. Preventing neural tube defects: The importance of periconceptional folic acid supplements. *Obstetr & Gynecol* 1998; 91: 1027-34.
7. VAN DER PUT NMJ, STEEGERS-THEUNISSEN RPM, FROSST P, TRJBELS FJM, ESKEs TKAB, VAN DER HEUVEL LP ET AL. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995; 346: 1070-1.
8. FRISO S, CHOI SW, GIRELLI D, MASON JB, DOLNIKOWSKI GG. A common mutation in the 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 5606-11.
9. STEGMANN K, ZIEGLER A, KOHLSCHMIDT N. Linkage disequilibrium of MTHFR genotypes 677C/T-1298A/C in the German population and association studies in probands with neural tube defects (NTD). *Am J Med Genet* 1999; 87: 23-9.
10. FROSST P, BLOM HJ, MILOS R, GOYETTE P, SHEPPARD CA, MATTHEWS RG ET AL. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-3.
11. KLUJTMANS LAJ, WENDEL U, STEVENS EMB, VAN DEN HEUVEL LPWJ, TRJBELS FJM, BLOM HJ. Identification of four novel mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase. *Eur J Hum Genet* 1998; 6: 257-65.
12. BLOM HJ. Mutated 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase and moderate hyperhomocysteinaemia. *Eur J Pediatr* 1998; 157: 131-4.
13. BOTTO L, YANG Q. 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: A Huge Review. *Am J of Epidemiol* 2000; 151: 862-77.
14. HOBBS CA, SHERMAN SL, PING Y, HOPKINS SE, TORFS CP, HINE RJ ET AL. Polymorphism in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 623-30.
15. O'LEARY BV, PARLE-McDERMONTT A, MOLLOY MA, KIRKE NP, JOHNSON Z, CONLEY M ET AL. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? *Am J Med Genet* 2002; 107: 151-5.
16. LIEBRES KJ, BOERS GH, VERHOEF P, DEN HEIJER M, KLUJTMANS LS, VAN DER PUT NM ET AL. A second common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine, and cardiovascular disease risk. *J Mol Med* 2001; 79: 522-8.

17. KEKU T, MILLIKAN R, WORLEY K, WINKEL S, EATON A, BISCOCHO L ET AL. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in African, Americans and whites. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2002; 11: 1611-21.
18. FOHR PI, PRINZ-LANGENOHL R, BRÖNSTRUP A, BOHLMANN A, NAU H, BERTHOLD KH ET AL. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase genotype determines the plasma homocysteine- lowering effect of supplementation with 5-methyltetrahydrofolate or folic acid in healthy young women. *Am J Clin Nutr* 2002; 75: 275-82.
19. GUILLEM M, CORELLA D, GONZÁLEZ JI, MULET F, SAIZ C. Prevalence of the MTHFR C677T mutation in the Mediterranean Spanish population. Association with cardiovascular risk factors. *Eur J Epidemiol* 2001; 17: 255-61.
20. ROSENBERG N, MURATA M, IKEDA Y. The Frequent 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphisms is associated with a common haplotype in whites, Japanese, and Africans. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 758-62.
21. CORTÉS F, MELLADO C, HERTRAMPF E, ALLIENDE MA, CASTILLO S. Frecuencia de los defectos de cierre del tubo neural en las maternidades públicas de Santiago durante el año 1999. Línea base para medir el impacto de la fortificación de la harina con ácido fólico. *Rev Méd Chile* 2001; 129: 279-86.
22. NAZER J, CIFUENTES L, MEZA M. Incidencia de las malformaciones congénitas en 10 maternidades chilenas participantes en el ECLAMC. Comparación de tres períodos (1971-1977, 1982-1988, 1989-1994). *Rev Méd Chile* 1997; 125: 993-1001.
23. VALENZUELA C. *Marco de Referencia Sociogenético para los Estudios de Salud Pública en Chile*. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
24. MEDRANO J, AASEN E, SHARROW L. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 1990; 8: 43.
25. DE BREE A, VERSCHUREN M, BJORKE-MONSEN AL, VAN DER PUT N, HEIL S, TRIBJELS F ET AL. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C → T mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 687-93.
26. TORABIAN S, EDWARD C, CAUDILL M. Heterogeneity in the prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in women of different ethnic groups. *J Am Diet Assoc* 2003; 103: 200-7.
27. MUTCHINICK OM, LÓPEZ MA, LUNA L, WAXMAN J, BABINSKY VE. High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Mol Genet Metab* 1999; 68: 461-7.
28. REYES-ENGEL A, MUÑOZ E, GAITAN MJ, FABRE E, GALLO M, DIEGUEZ JL ET AL. Implications of human fertility of the 677CT and 1298 AC polymorphisms of the MTHFR gene: consequences of a possible genetic selection. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 952-7.

Agradecimientos

A los profesionales del Instituto de Rehabilitación Infantil (TELETÓN) por su colaboración en la recolección de muestras y a las madres de los pacientes con DTN.