

Variaciones en los alelos 677 C>T y 1298 A>C en el gen que codifica para la enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y su efecto en la concentración de homocisteína en mestizos mexicanos

Israel Parra-Ortega¹
Margarita Martínez-Arias¹
Karina López-Valladares¹
José Luis Sánchez-Huerta¹
Leticia Barrera-Dávila¹
Vicencio Juárez-Barreto²
Briceida López-Martínez¹

¹ Laboratorio Clínico.

² Servicio de Medicina Transfusional.
Hospital Infantil de México Federico Gómez.

RESUMEN

Antecedentes: algunos estudios han descrito la coexistencia en forma heterocigota de las mutaciones C677T y A1298C en el gen que codifica para la enzima MTHFR, que juega un papel importante en la patogenia de algunas enfermedades, como la predisposición a trombosis.

Objetivo: identificar la frecuencia de las mutaciones C677T y A1298C en un grupo de mestizos mexicanos.

Material y método: estudio transversal descriptivo, en el que se incluyeron 207 voluntarios aparentemente sanos (disponibles sanguíneos) en los que se investigaron, mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, las mutaciones C677T y A1298C en el gen que codifica para la enzima MTHFR para obtener la frecuencia de las variaciones alélicas y comparar las concentraciones de homocisteína sérica.

Resultados: de los 207 sujetos sanos estudiados, se identificaron sólo 28 (13.5%) con genotipo normal y 179 (86.5%) con genotipo mutado; las combinaciones identificadas fueron: 14 (7%) con 677 normal/1298 heterocigotos, 74 (36%) con 677 heterocigotos/1298 normal, 67 (32%) con 677 homocigoto mutado/1298 normal, 23 (11%) con 677 heterocigoto/1298 heterocigoto, uno (0.5%) con 677 homocigoto mutado/1298 heterocigotos. Las diferencias entre las medias de homocisteína para todos los grupos de mutaciones fue estadísticamente significativa, $p < 0.05$.

Conclusiones: la frecuencia de la coexistencia en estado heterocigoto compuesto de los polimorfismos C677T y A1298C en la enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa en mestizos mexicanos no es infrecuente porque ocurrió en 11% de los sujetos estudiados. La experiencia obtenida en este grupo de estudio confirma la asociación de las variaciones alélicas en MTHFR y el aumento de homocisteína.

Palabras clave: alelos 677 C>T, 1298 A>C, gen que codifica para la enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa, homocisteína.

Recibido: 3 de diciembre 2014

Aceptado: 29 de enero 2015

Correspondencia: Dra. Briceida López Martínez
Subdirección de Servicios Auxiliares de
Diagnóstico
Hospital Infantil de México Federico Gómez
Dr. Márquez 162
06727 México, DF
brisalopezmtz@gmail.com

Este artículo debe citarse como

Parra-Ortega I, Martínez-Arias M, López-Valladares K, Sánchez-Huerta JL y col. Variaciones en los alelos 677 C>T y 1298 A>C en el gen que codifica para la enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y su efecto en la concentración de homocisteína en mestizos mexicanos. Rev Hematol Mex 2015;16:115-120.

Variations in alleles 677C>T and 1298A>C in gene encoding 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and its impact on the value of homocysteine in Mexican mestizos

ABSTRACT

Background: Some studies describe the coexistence in heterozygous form of C677T and A1298C mutations in the gene encoding the MTHFR enzyme, that plays an important role in pathogenesis of some diseases such as predisposition to thrombosis.

Objective: To investigate the frequency of mutations in a group of Mexican mestizos.

Material and method: A descriptive cross-sectional study including 207 apparently healthy volunteers (blood disponentes), in which, by polymerase chain reaction in real time, it was researched C677T and A1298C mutations in the gene encoding the enzyme MTHFR for frequency included allelic variations and comparing the serum homocysteine.

Results: Of the 207 healthy individuals studied, we identified only 28 (13.5%) with a normal genotype and 179 (86.5%) with a mutated genotype; combinations identified were: 14 (7%) with 677 normal/1298 heterozygotes, 74 (36%) heterozygous 677/1298 normal, 67 (32%) mutated homozygous 677/1298 normal, 23 (11%) heterozygous 677/1298 heterozygous, one (0.5%) mutated homozygous 677/1298 heterozygotes. The differences between the means of homocysteine for all groups of mutations were considered significant, $p < 0.05$.

Conclusions: The frequency of coexistence compound heterozygote state of polymorphisms C677T and A1298C 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase in Mexican mestizos is not uncommon, as it was presented in 11% of those studied. The experience gained in this group of patients confirms the association of allelic variations in MTHFR and increased homocysteine.

Key words: alleles 677C>T and 1298A>C, gene encoding 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine.

ANTECEDENTES

La hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente de aterosclerosis y aterotrombosis.¹ La homocisteína se forma a partir del

metabolismo de la metionina² por medio de reacciones de transmetilación.³ Las principales enzimas implicadas en este sistema metabólico son la cistationina β sintetasa, la metionina sintetasa y la metilentetrahydrofolato reductasa

(MTHFR),³⁻⁸ las vitaminas B₆ y B₁₂ participan en forma de coenzimas y el ácido fólico como sustrato.⁹ Se han reportado variaciones genéticas que afectan a las enzimas descritas,⁶⁻⁸ ya sea en su funcionalidad, cantidad o en ambas, lo que resulta en el aumento de la concentración de homocisteína en el plasma y los tejidos. El polimorfismo más frecuente es el 677 C>T en el gen que codifica para la enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR),¹⁰ que disminuye la actividad enzimática. La existencia del polimorfismo A1298C en la misma enzima disminuye la actividad de la enzima y, por tanto, aumenta la concentración de homocisteína.¹¹⁻¹³

En la población caucásica se ha descrito la incidencia de polimorfismos C677T en MTHFR en aproximadamente 40% para los estados heterocigotos y de 10% para los homocigotos.¹⁴ En México existen diversas publicaciones del polimorfismo C677T de MTHFR; en 1999, Mutchinick y colaboradores³ realizaron un estudio de la frecuencia de ese polimorfismo y en 2001, Ruiz-Argüelles y su grupo publicaron la primera evidencia de la alta prevalencia del polimorfismo C677T de MTHFR en pacientes mexicanos con estados hipercoagulables.⁶ La coexistencia de los polimorfismos C677T/A1298C en el gen que codifica para MTHFR se ha descrito en algunos estudios^{14,15} y su papel en la patogenia de algunas enfermedades no se ha identificado con certeza. Posterior al hallazgo de la coexistencia de los polimorfismos C677T/A1298C en el gen que codifica para MTHFR como único marcador asociado con el evento trombótico en nueve pacientes pediátricos,¹⁶ planteamos el objetivo de identificar la frecuencia de la coexistencia de los polimorfismos C677T y A1298C en el gen que codifica para la enzima MTHFR en un grupo de mestizos mexicanos sanos y su relación con la concentración de homocisteína.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio transversal descriptivo en el que se incluyeron 207 voluntarios aparentemente sanos, 46 del sexo femenino, con edad media de 33 años, límites de 18 y 59 años, a los que se les realizó el protocolo de evaluación para ser donantes sanguíneos, siguiendo los protocolos de selección y clasificación del servicio de Medicina Transfusional del Hospital Infantil de México Federico Gómez. A todos los voluntarios, previa autorización, se les tomó una muestra de 3 a 5 mL de sangre periférica anticoagulada con EDTA, para la extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN). La extracción se realizó con base en la metodología que utiliza perlas magnéticas y el equipo MagNA Pure Compact Roche Diagnostic^{MR}, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT). Con el uso de sondas FRET (transferencia de energía fluorescente mediante resonancia) investigamos las mutaciones C677T y A1298C en el gen que codifica para la enzima MTHFR con los diseños comerciales: LightMix[®] for the detection of human MTHFR C677T, número de catálogo 40-0095-16 y LightMix[®] for the detection of human MTHFR A1298C, número de catálogo 40-0269-16 de TibMolBiol[®]. Para la medición de homocisteína se utilizó un inmunoensayo automatizado para la determinación cuantitativa de L-homocisteína total en plasma humano citratado por turbidimetría de partículas de látex en los sistemas de analítico ACL TOP 500 de IL Diagnostic[®].

Los datos de la concentración de plasma de homocisteína se analizaron utilizando el programa IBM SPSS Statistics ver. 22.0.0.0 para Mac OSX. Se realizó un análisis estadístico descriptivo para todas las variables, se realizó prueba de normalidad a las variables con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, prueba de t de Student para calcular el nivel de probabilidad entre grupos y se compararon las diferencias entre las

medias con ANOVA multivariado para todos los grupos de mutaciones; se consideró significativo un valor de p menor a 0.05.

RESULTADOS

De los 207 voluntarios aparentemente sanos estudiados, se identificaron sólo 28 (13.5%) con un genotipo normal (677CC/1298AA) y 179 (86.5%) con un genotipo mutado; las combinaciones identificadas fueron: 14 (7%) con 677 normal/1298 heterocigotos (677CC/1298AC), 74 (36%) 677 heterocigoto/1298 normal (677CT/1298AA), 67 (32%) 677 homocigoto mutado/1298 normal (677TT/1298AA), 23 (11%) 677 heterocigoto/1298 heterocigoto (677CT/1298AC), uno (0.5%) 677 homocigoto mutado/1298 heterocigoto (677TT/1298AC). Figura 1 y Cuadros 1 y 2

Las diferencias de la concentración de homocisteína entre los diferentes grupos resultó significativa ($p=0.022$). Las diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones entre grupos ocurrieron en las comparaciones

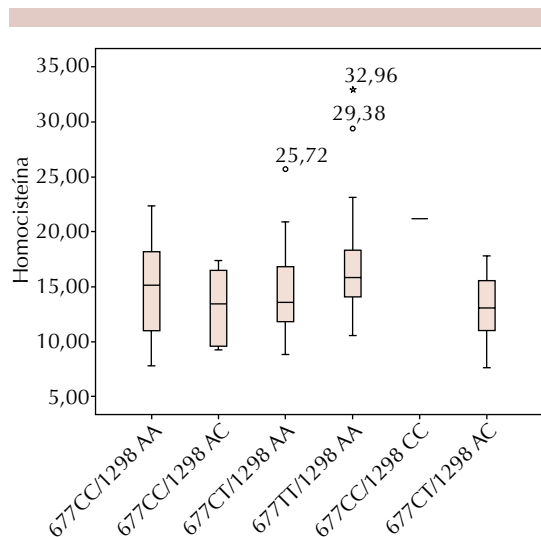


Figura 1. Concentración de homocisteína en los diferentes grupos de genotipos encontrados de 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).

Cuadro 1. Variaciones identificadas en los alelos 677 C>T y 1298 A>C en el gen que codifica para la enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

Genotipo en 677 de MTHFR	Genotipo en 1298 de MTHFR	Núm. (%) n=207
Normal	Normal	28 (13.5)
Normal	Heterocigoto	14 (7)
Heterocigoto	Normal	74 (36)
Homocigoto mutado	Normal	67 (32)
Heterocigoto	Heterocigoto	23 (11)
Homocigoto mutado	Heterocigoto	1 (0.5)

de los genotipos: 677CT/1298 AA y 677TT/1298 AA ($p=0.019$), 677TT/1298 AA y 677CT/1298 AC ($p=0.019$), 677TT/1298 AA y 677CT/1298 AC ($p=0.004$), 677CT/1298 AC y 677TT/1298 AA ($p=0.004$). Cuadro 3

CONCLUSIONES

La frecuencia identificada en este grupo de pacientes sugiere que la coexistencia en estado heterocigoto compuesto de los polimorfismos C677T y A1298C en la enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa en mestizos mexicanos no es infrecuente, porque ocurrió en 11% de los sujetos estudiados. En un estudio previo describimos un grupo de pacientes pediátricos que tuvieron un evento trombótico, en el que sólo se identificó la coexistencia de estas mutaciones como marcador genético de trombofilia; sin embargo, su existencia en pacientes con estados de trombofilia no excluye la investigación de más factores genéticos y adquiridos asociados.⁵⁻¹⁰

Los resultados obtenidos al comparar la concentración de homocisteína y el genotipo en los alelos 677 C>T y 1298 A>C en gen que codifica para la enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en mestizos mexicanos muestran un valor significativo ($p>0.05$).

Las características poblacionales que tiene la región centro de nuestro país y la alta frecuencia

Cuadro 2. Concentración de homocisteína en los diferentes grupos de genotipos encontrados de 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa

Genotipo MTHFR	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
677CC/1298 AA	14.92	4.27	1.23	12.20	17.63	7.82	22.31
677CC/1298 AC	13.25	3.38	1.38	9.69	16.80	9.29	17.40
677CT/1298 AA	14.44	3.93	0.69	13.02	15.86	8.83	25.72
677TT/1298 AA	16.82	4.49	0.71	15.38	18.25	10.56	32.96
677TT/1298 CC	21.20	-	-	-	-	21.20	21.20
677CT/1298 AC	13.22	3.30	0.91	11.23	15.22	7.63	17.79

Cuadro 3. Comparación de p en la diferencia de los grupos de genotipos de 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

Genotipo MTHFR	677CC/1298 AC	677CT/1298 AA	677TT/1298 AA	677CT/1298 AC
677CC/1298 AA	0.385	0.740	0.198	0.283
677CC/1298 AC	-	0.465	0.051	0.988
677CT/1298 AA	0.740	-	0.019	.300
677TT/1298 AA	0.198	0.019	-	0.004
677CT/1298 AC	0.988	.300	0.004	-

Se consideró estadísticamente significativo un valor de p menor de 0.05.

de las variaciones alélicas en MTHFR hace imperativo el análisis de los mecanismos bioquímicos en las diversas enfermedades en las que esas variaciones tienen una implicación directa en los pacientes mexicanos.¹⁷⁻²¹ Se han descrito 29 alteraciones genéticas en MTHFR y su relación con el aumento de homocisteína no se ha definido claramente en los diferentes grupos étnicos.²²⁻²⁵ En diferentes padecimientos se ha investigado la participación de las variaciones alélicas en MTHFR y el aumento de homocisteína con resultados que no revelan una asociación franca.²⁶⁻²⁹ Además, la distribución geográfica de los genotipos identificados en algunos estudios³⁰⁻³² expone la necesidad de considerar más aún el análisis y la generación de información respecto de las variaciones alélicas en MTHFR. La experiencia obtenida en este grupo de pacientes confirma la asociación de las variaciones alélicas en MTHFR y el aumento de homocisteína.

REFERENCIAS

1. De Veber G, Andrew M, Adams C, et al. Cerebral sinovenous thrombosis in children. *N Engl J Med* 2001;345:417-423.
2. Schmidt B, Andrew M. Neonatal thrombosis: report of a prospective Canadian and international registry. *Pediatrics* 1995;96:939-943.
3. Mutchinick OM, López MA, Luna L, Waxman J, et al. High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Mol Gen Metab* 1999;461-467.
4. Ruiz-Argüelles GJ. Trombofilia. En: Ruiz-Argüelles GJ, editor: *Fundamentos de Hematología*. 3ª ed. Ciudad de México: Editorial Médica Panamericana, 2003;424-436.
5. Ruiz-Argüelles GJ, González-Estrada S, Garcés-Eisele J, Ruiz-Argüelles A. Primary thrombophilia in Mexico: A prospective study. *Am J Hematol* 1999;60:1-5.
6. Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Reyes-Núñez V, Ramírez-Cisneros F. Primary thrombophilia in Mexico II: Factor V G1691A (Leiden), prothrombin G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in thrombophilic Mexican mestizos. *Am J Hematol* 2001;66:28-31.

7. Ruiz-Argüelles GJ, López-Martínez B, Cruz-Cruz D, Reyes-Aulis MB. Primary thrombophilia in Mexico III. A prospective study of the sticky platelet syndrome. *Clin Appl Thromb Hemost* 2002;8:273-277.
8. Ruiz-Argüelles GJ, Poblete-Naredo I, Reyes-Núñez V, Garcés-Eisele J, et al. Primary thrombophilia in Mexico IV: Leiden, Cambridge, Hong Kong, Liverpool and HR2 haplotype polymorphisms in the factor V gene of a group of thrombophilic Mexican mestizos. *Rev Invest Clin Mex* 2004;56:600-604.
9. Ruiz-Argüelles GJ, López-Martínez B, Valdés-Tapia P, Gómez-Rangel JD, et al. Primary thrombophilia in Mexico V: A comprehensive prospective study indicates that most cases are multifactorial. *Am J Hematol* 2005;78:21-26.
10. Ruiz-Argüelles GJ, González-Carrillo ML, Estrada-Gómez R, Valdés-Tapia P, et al. Trombofilia primaria en México. Parte VI: Falta de asociación estadística entre las condiciones trombofílicas heredadas. *Gac Méd Méx* 2007;4:317-322.
11. Sibani S, Christensen B, O'Ferrell E, et al. Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. *Hum Mutat* 2000;15:280-287.
12. Van der Put NJM, Gabreels F, Stevens EMB, Smeitink JAM, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects? *Am J Hum Genet* 1998;62:1044-1051.
13. Malinow MR, Nieto FJ, Kruger WD, et al. The effects of folic acid supplementation on plasma total homocysteine are modulated by multivitamin use and methylenetetrahydrofolate reductase genotypes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1157-62.
14. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in MTHFR associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64:169-172.
15. Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y et al. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations *J Nutr* 1999;129: 1656-1661.
16. Parra-Ortega I, López-Martínez B, González-Ávila I, Rodríguez-Castillejos C y col. Coexistencia de las mutaciones C677T y A1298C en la enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa en pacientes pediátricos con trombosis. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2009;66:229-233.
17. Parra Ortega I, Estrada Gómez R, Guzmán García MO. La mutación 677 C> T en la 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa y el aumento de homocisteína en pacientes mexicanos. *Med Int Méx* 2007;23:15-18.
18. Reyes-Engel A, Muñoz E, Gaitan MJ, et al. Implications on human fertility of the 677C→T and 1298A→C polymorphisms of the MTHFR gene: consequences of a possible genetic selection. *Mol Hum Reprod* 2002;8:952-957.
19. Ozyurek E, Balta G, Degerliyurt A, Parlak H, et al. Significance of factor V, prothrombin, MTHFR, and PAI-1 genotypes in childhood cerebral thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2007;13:154-160.
20. Djordjevic V, Stankovic M, Brankovic-Sreckovic V, Rakicevic L, Radojkovic D. Genetic risk factors for arterial ischemic stroke in children: A possible *MTHFR* and *eNOS* gene-gene interplay? *J Child Neurol* 2009;24:823-827.
21. Sucker C, Kurschat C, Farokhzad F, Hetzel GR, et al. The TT genotype of the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor in thrombotic microangiopathies: results from a pilot study. *Clin Appl Thromb Hemost* 2009;15:283-288.
22. Sibani S, Leclerc D, Weisberg IS, et al. Characterization of mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency reveals an FAD-responsive mutation. *Hum Mutat* 2003;21:509-520.
23. Melo SS, Persuhn DC, Meirelles MS, et al. G1793A polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate gene: effect of folic acid on homocysteine levels. *Mol Nutr Food Res* 2006;50:769-774.
24. Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost* 1997;78:523-526.
25. Boccia S, Hung R, Ricciardi G, et al. Meta- and pooled analyses of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and gastric cancer risk: A huge-GSEC review. *Am J Epidemiol* 2008;167:505-516.
26. Zidan HE, Rezk NA, Mohammed D. MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms and their relation to homocysteine level in Egyptian children with congenital heart diseases. *Gene* 2013;529:119-124.
27. Franco Brochado MJ, Domenici FA, Candolo Martinelli AD, Zucoloto S, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and serum homocysteine levels in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Nutr Metab* 2013;63:193-199.
28. Messedi M, Frigui M, Chaabouni KH, Turki M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and variations of homocysteine concentrations in patients with Behcet's disease. *Gene* 2013;527:306-310.
29. Van der Valk RJ, Kiefte-de Jong JC, Sonnenschein-van der Voort AM, et al. Neonatal folate, homocysteine, vitamin B₁₂ levels and methylenetetrahydrofolate reductase variants in childhood asthma and eczema. *Allergy* 2013;6:788-795.
30. Yang B, Liu Y, Li Y, et al. Geographical distribution of MTHFR C677T, A1298C and MTRR A66G gene polymorphisms in China: findings from 15357 adults of Han nationality. *PLoS One* 2013;8:e57917.
31. Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, et al. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J Med Genet* 2003;40:619-625.
32. Guéant-Rodriguez RM, Guéant JL, Debarb R, et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 2006;83:701-707.