

Polimorfismo C677T del gen de la Metiltetrahidrofolato Reductasa como factor de riesgo en mujeres con aborto recurrente.

Alisandra Morales-Machín¹, Lisbeth Borjas-Fajardo¹, José Miguel Quintero¹, William Zabala¹, Francisco Álvarez¹, Wilmer Delgado¹, María Luisa Hernández², Ernesto Solís-Añez¹, Yanira Sánchez¹ y Zoraida Butrón¹.

¹Unidad de Genética Médica y ²Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: Polimorfismo MTHFR C677T, aborto espontáneo recurrente idiopático.

Resumen. La patogénesis de los abortos espontáneos recurrentes es multifactorial; probablemente se debe a la interacción de varios factores ambientales y genéticos. El polimorfismo C677T del gen de la metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR), ha sido implicado como factor de riesgo para aborto espontáneo recurrente (AR). El objetivo de este trabajo fue investigar la asociación del polimorfismo C677T de la MTHFR como factor de riesgo en AR idiopático. Se analizaron 80 muestras de ADN, correspondientes a 30 mujeres con AR y a 50 mujeres controles. A través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó un fragmento de 198 pares de base (pb), el cual se sometió a digestión con la enzima de restricción *Hinf*I, que reconoce el sitio de restricción creado por la transición C>T en la posición 677. La frecuencia alélica de la MTHFR en el grupo de estudio y control fue 35% y 33% respectivamente; para el alelo T y 65% y 67% respectivamente, para el alelo C. No se encontró diferencia significativa entre el alelo T ni el C al ser comparados en ambos grupos. No se demostró un factor predisponente entre el polimorfismo C677T de la MTHFR y el AR en la muestra estudiada.

C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene as risk factor in women with recurrent abortion.

Invest Clin 2009; 50(3): 327 - 333

Key words: MTHFR, C677T polymorphism, recurrent unexplained spontaneous abortion.

Abstract. The pathogenesis of recurrent spontaneous abortion is multifactorial, presumably involving the interaction of several genetic and environmental factors. The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism has been implicated as risk factor for recurrent spontaneous abortion (RA). The main objective of this research was to investigate the association between the C677T polymorphism of the MTHFR gene as a genetic risk factor for idiopathic RA. Molecular analysis was performed in 80 DNA samples from 30 patients with RA and among 50 healthy control subjects. Using the Polymerase Chain Reaction (PCR), a 198 bp (bases pairs) fragment, was digested with the restriction enzyme *HinfI*, which can recognize the C > T substitution responsible for the polymorphism. 677T MTHFR allele frequencies for group with RA and the control group were 35% and 33%, respectively and 677C MTHFR allele frequencies were 65% and 67%, respectively. There was no significant difference in allele frequency between these two groups. The data presented in this study fail to support the relationship between MTHFR C677T polymorphism and risk in women with RA.

Recibido: 25-06-2008. Aceptado: 02-02-2009.

INTRODUCCIÓN

Se define como aborto recurrente (AR), el cuadro clínico caracterizado por 2 ó más abortos espontáneos consecutivos o más de 3 no consecutivos, con una incidencia que oscila entre el 0,5 al 5%. A pesar de los métodos diagnósticos de que se dispone, en muchos casos (15 al 80%) queda por esclarecer su posible etiología, denominándolos de causa desconocida (1).

En los últimos años, diferentes autores han postulado que estos abortos y otras pérdidas gestacionales de causa desconocida podrían ser debidos a hiperhomocisteinemia (hHcy) (2-4). El mecanismo exacto por el cual la hHcy puede contribuir al AR es desconocida, pero es posible incluir teorías de posibles efectos estructurales y neurológicos

en el feto y un incrementado potencial trombogénico en mujeres afectadas, conduciendo a trombosis placentaria (5). Existen estudios que involucran a las variantes polimórficas del gen de la enzima 5, 10 metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) como factor de riesgo para varias enfermedades, tales como enfermedad cardiovascular (6, 7). En mujeres embarazadas esto es un factor de riesgo para desprendimiento prematuro de placenta, eclampsia, pre-eclampsia (8, 9), defecto de cierre del tubo neural (DCTN) (10, 11) y pérdida gestacional espontánea (12). En relación al AR los datos informados son controversiales; se han publicado artículos con hallazgos positivos (13-19) y otros con hallazgos negativos para esta asociación (20-27). Varios artículos han planteado el beneficio del ácido fólico en el manejo del

AR (15, 28-31). Existen indicios de que una combinación terapéutica de ácido fólico, prednisona, aspirina y progesterona en el AR se asocia con una mayor tasa de gestaciones viables (32).

El gen de la MTHFR está localizado en la región 1p36.3, tiene 11 exones, codifica la enzima MTHFR (33-35), que es clave en el metabolismo del 1er. Carbono, cataliza la reducción de 5, 10 metilentetrahidrofolato a 5 metiltetrahidrofolato, que es la forma de folato predominantemente circulante y precursor de una cadena de reacciones de metilación de sustancias de interés biológico en la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN). La producción de 5 metiltetrahidrofolato requiere de abastecimiento adecuado de folato y la función apropiada de la MTHFR; por lo tanto, si hay enzimas funcionando inapropiadamente o los cofactores no se presentan en cantidades adecuadas cabría la posibilidad de originar hHey (36). En 1995 fue aislada una variación polimórfica en la posición 677 del nucleótido que involucra el cambio de una base citosina (C) a timina (T), dando como resultado una sustitución de valina (GTC) por alanina (GCC) que genera un sitio de restricción *HinfI* y, en consecuencia, una enzima termolábil. Las personas con esta variante tienen una reducción del 50% en la actividad enzimática, elevada homocisteína sérica y folato sérico por debajo de lo normal (5, 6). El objetivo de este trabajo fue investigar la asociación del polimorfismo C677T de la MTHFR como factor de riesgo en aborto recurrente idiopático.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se evaluaron 80 mujeres, de las cuales 30 fueron referidas a la consulta de Genética en la Unidad de Genética Médica de LUZ (UGM-LUZ), con antecedente de dos o más abortos espontáneos consecutivos de etiología desconocida y de la misma pareja y 50

mujeres no relacionadas como grupo control, con edad y condición socioeconómica similar, residentes en la misma área geográfica, con dos o más nacidos vivos y sin antecedentes de abortos espontáneos, pérdidas gestacionales, mortinatos, DCTN, trombosis ni enfermedades cardiovasculares.

Se obtuvo ADN de 80 muestras, a partir de 5 mL de sangre periférica anticoagulada con EDTA 500 mM según técnica CTAB/DTAB (37).

Para la realización de este trabajo, se contó con el consentimiento informado de las pacientes estudiadas y la aprobación del Comité de Bioética de la UGM-LUZ.

Análisis molecular

La identificación de la transición C>T en el nucleótido 677 del gen de la MTHFR se realizó utilizando el método descrito por Frosst y col (6). La secuencia de los iniciadores utilizados fue la siguiente: 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' y 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3' (38). Estos iniciadores están diseñados para generar un producto amplificado de 198 pares de bases (pb), el cual se sometió a digestión con la enzima de restricción *HinfI*, la cual reconoce el sitio de restricción creado por la transición C>T en la posición 677. El alelo con la variante polimórfica T se corta (+) en dos fragmentos, uno de 175 y otro de 23 pb y el alelo normal (C) no se corta (-). El producto digerido se caracterizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, y se visualizó utilizando la tinción de bromuro de etidio.

El genotipo homocigoto CC se definió como la presencia de una sola banda de 198 pb, homocigoto TT cuando se visualizó una banda de 175 pb y heterocigoto CT para el polimorfismo cuando se observaron fragmentos de 198 y 175 pb; la banda de 23 pb se sale del gel (Fig. 1).

A partir de las frecuencias genotípicas, se calcularon las frecuencias alélicas en los

2 grupos y para los genotipos se verificó el ajuste al modelo de Equilibrio de Hardy Weinberg (39) en el grupo control. Se utilizó el estadístico Chi cuadrado (χ^2), a un nivel de significación de $< 0,05$ para calcular la diferencia entre la frecuencia alélica entre el grupo estudiado y control. Para establecer la relación entre la presencia del alelo T en el polimorfismo C677T en el gen de la MTHFR y el incremento de riesgo de AR, se compararon las frecuencias de los genotipos con la variante (CT y TT) con el genotipo normal (CC), en el grupo estudiado y el control. Para el procesamiento de este estadístico, se utilizó el paquete SPSS V.10.0 (Statistical Package for the Social Sciences).

RESULTADOS

El grupo de estudio estuvo constituido por 30 mujeres con edades comprendidas entre 19-39 años. El número de pérdidas gestacionales osciló entre dos y siete y al menos dos fueron menores de 20 semanas. En el grupo Control se analizaron 50 mujeres de 21-58 años de edad al momento de la toma de la muestra sanguínea. El número promedio de nacidos vivos fue 3,38 (rango: 2-6).

Las frecuencias genotípicas y alélicas para el polimorfismo C677T (Fig. 1), se presentan en la Tabla I. Las comparaciones entre ambos grupos resultó no significativa para las distribuciones alélicas ($p > 0,05$) y genotípicas, tanto para los tres genotipos ($p > 0,05$) como para la comparación por pares y para la combinación de los genotipos positivos o negativos para T ($p > 0,05$). De manera análoga, los ORs resultaron no significativos para la comparación CC, CT:

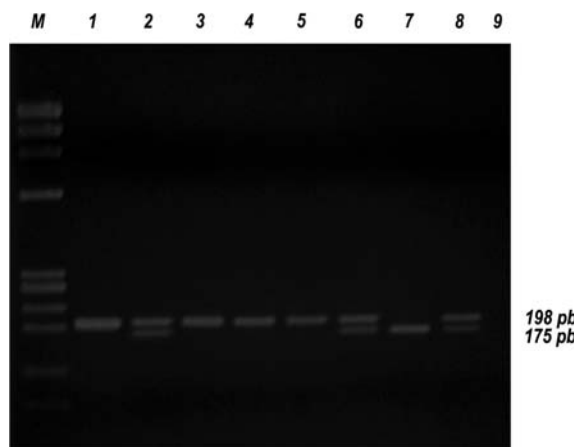


Fig. 1. Imagen de un gel de agarosa al 2% del producto de digestión con la enzima *HinI*, en un grupo de muestras analizadas. M: marcador de peso molecular ϕ 174 x Hae III. 2: control positivo CT (heterocigoto 677C/677T) para el corte de la enzima *HinI* y genera una banda de 198 pb, una de 175 pb, la banda de 23 pb no se evidencia en el gel. 1, 3-5: (homocigoto 677C/677C) no es cortada y genera un fragmento de 198 pb. 6,8: (heterocigoto 677C/677T). 7: (homocigoto 677T/677T) es cortado por la enzima y produce una banda de 175 pb, la banda de 23 pb no se evidencia en el gel. 9: control de sistema, mezcla de reacción sin ADN.

OR= 1,01 [0,39-2,63]; para CC, CT+TT: OR= 0,82 [0,32-2,11].

El polimorfismo analizado se encontró en Equilibrio de Hardy Weinberg en el grupo control.

DISCUSIÓN

El polimorfismo C677T localizado en el exón 4 del gen de la enzima MTHFR es

TABLA I
FRECUENCIA GENOTÍPICA Y ALÉLICA POR GRUPOS. CUENTAS (%)

	Genotipo			Alelo	
	CC	CT	TT	C	T
Grupo de estudio (n=30)	10 (33)	18 (60)	2 (7)	38 (63)	22 (37)
Grupo control (n=50)	19 (38)	29 (58)	2 (4)	67 (67)	33 (33)

responsable de una variante termolábil de dicha enzima y se asocia a una actividad reducida de la misma. A los individuos homocigotos TT se les ha asociado a un mayor riesgo de AR y pérdida gestacional. Con el fin de investigar esta asociación, se han realizado múltiples estudios caso control en diferentes poblaciones, revelando una gran heterogeneidad en la prevalencia del polimorfismo C677T con importantes variaciones étnicas y geográficas.

Mientras en ciertas poblaciones caucásicas en Europa (5, 15), Nueva York (13, 18), Medio Oriente (14), Este de Asia (16), Norte de África (17) y Brasil (19) se ha observado un riesgo incrementado de AR para el genotipo TT, en otras poblaciones tales como Georgia (20), Londres (21), Alemania (22), Grecia (23), este incremento del riesgo no ha sido corroborado.

En estudios de meta-análisis (4, 40, 41), por otra parte, se aprecia que la asociación se limita a pocos estudios o poblaciones. La diferencia en los resultados es probablemente secundaria a la heterogeneidad poblacional y de diseño metodológico. Investigaciones similares en poblaciones latinoamericanas (26, 27) y presente estudio parecen indicar que el polimorfismo C677T no se asocia con el AR.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia (Proyecto CC-0991-05).

REFERENCIAS

1. **Parrilla J.** Aborto recurrente, definiciones, incidencia y factores epidemiológicos. En cuadernos de Medicina Reproductiva. Aborto recurrente. 1997. 13-23.
2. **Wouters M, Boers G, Blom H, Trijbels F, Thomas C, Borm G, Steegers-Theunissen R, Eskes T.** Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril* 1993; 60:820-825.
3. **Nelen W, Blom H, Thomas CH, Steegers E, Boers G, Eskes T.** Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. *J Nutr* 1998; 128:1336-1341.
4. **Nelen W, Blom H, Steegers E, Heijer M, Eskes T.** Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2000; 74(6): 1196-1199.
5. **Unfried G, Griesmacher A, Weismüller W, Nagele Fritz, Huber J, Tempfer C.** The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and idiopathic recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol* 2002; 99:614-619.
6. **Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Mathews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LA.** A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10(1):111-113.
7. **Arruda V, Von Zuben P, Chiaparini L, Annichino-Bizzacchi, Costa F.** The mutation Ala677→Val in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: A risk factor for arterial disease and venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 77 (5): 818-821.
8. **Many A, Elad R, Yaron Y, Eldor A, Lessing J, Kupfermine M.** Third-Trimester unexplained intrauterine fetal death is associated with inherited thrombophilia. *Obstet Gynecol* 2002; 99:684-687.
9. **Alfirevic Z, Mousa H, Martlew V, Briscoe L, Perez-Casal M, Hock Toh C.** Postnatal screening for thrombophilia in women with severe pregnancy complications. *Obstet Gynecol* 2001; 97:753-759.
10. **Shields D, Kirke P, Mills J, Ramsbottom D, Molloy A, Burke H, Weir D, Scott J, Whitehead A.** The thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: An evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. *Am J Hum Genet* 1999; 64:1045-1055.

11. Alvarez A, D'Almeida V, Vergani N, de Oliveira A, de Lima F, Brunoni D. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): Incidence of mutations C677T and A1298C in Brazilian population and its correlation with plasma homocysteine levels in spina bifida. *Am J Med Genet* 2003; 119A:20-25.
12. Frosst P, Blom H, Milos R, Goyette P, Sheppard C, Mathews R, Boers Martinelli I, Taioli E, Cetin I, Marinoni A, Gerosa S, Villa M, Bozzo M, Mannucci P. Mutations in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss. *N Engl J Med* 2000; 343:1015-1018.
13. Nelen W, Steegers E, Eskes T, Blom H. Genetic risk factor for unexplained recurrent early pregnancy loss. *The Lancet* 1997; 350:861.
14. Lissak A, Sharon A, Fruchter O, Kassel A, Sanderovitz J, Abramovici H. Polymorphism for mutation of cytosine to thymine at location 677 in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with recurrent early fetal loss. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:126-130.
15. Zetterberg H, Regland B, Palmér M, Ricksten A, Palmqvist L, Rymo L, Arvanitis D, Spandidos D, Blennow K. Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. *Eur J Hum Genet* 2002; 10:113-118.
16. Keun N, Kyung Y, Seo M, Hee D, Hee S, Ok Myung, Lee S, Jeung M, Jae J, Oh D. Influence of combined Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and thymidylate synthase enhancer region (TSER) polymorphisms to plasma homocysteine levels in Korean patients with recurrent spontaneous abortion. *Thromb Res* 2006; 117:653-658.
17. Mtiraoui N, Zammiti W, Ghazouani L, Jmili N, Saidi S, Finan R, Almawi W, Mahjoub T. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. *Reproduction* 2006; 131:395-401.
18. Altomare I, Adler A, Aledort L. The 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and risk of fetal loss: a case series and review of the literature. *Thromb J* 2007; 5:17.
19. Coulo E, Barini R, Zaccaria R, Annicchino-Bizzacchi J, Passini R, Goncalves B, Gama J, Pinto J. Association of anti-cardiolipin 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.
20. Dilley A, Benito C, Hooper WC, Austin H, Miller C, El-Jamil M, Cottrell S, Benson J, Evatt BL, Patterson-Barnett A, Eller D, Philipp C. Mutations in the factor V, prothrombin and MTHFR genes are not risk factors for recurrent fetal loss. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2002; 11(3): 176-182.
21. Holmes Z, Regan L, Chilcott I, Cohen H. The C677T MTHFR gene mutation is not predictive of risk for recurrent fetal loss. *Br J Haematol* 1999; 105:98-101.
22. Pauer H, Voigt-Tschirschwitz T, Hinney B, Burfeind P, Wolf C, Emons G, Neesen J. Analyses of three common thrombophilic gene mutations in German women with recurrent abortions. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005; 82:942-947.
23. Foka Z, Lambropoulos A, Saravelos H, Karas G, Karavida A, Agorastos T, Zournatzi V, Makris P, Bontis J, Kotsis A. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 2000; 15(2):458-462.
24. Makino A, Nakanishi T, Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Suzumori N, Suzumori K. No association of C677T methylenetetrahydrofolate reductase and an endothelial nitric oxide synthase polymorphism with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52:60-66.
25. Bae J, Hee Choi D, Seo Kang M, Hee Cha S, Oh D, Keun Kim N. Effect of methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase enhancer region polymorphisms on the risk of idiopathic re-

- current spontaneous abortion in a Korean population. *Fertil Steril* 2009; 91(Suppl): 1560-1562.
26. **Otero A, Pou Ferrari R, Pons E, Lens D, De Lisa E, Dellepiane M, Storch E, Attarian D, Ferrari A, Pierri S, Motta N.** Trombofilia y pérdida recurrente de embarazo. *Rev Med Uruguay* 2004; 20:106-113.
 27. **Quintero-Ramos A, Valdez-Velázquez L, Hernández G, Baltazar L, Padilla-Gutiérrez J, Valle Y, Rodarte K, Ortiz R, Ortiz-Aranda M, Olivares N, Rivas F.** Evaluación de cinco polimorfismos de genes trombofílicos en parejas con aborto habitual. *Gac Méd Méx* 2006; 142:95-98.
 28. **Rivas F, Dávalos I, Olivares N, Dávalos N, Pérez-Medina R, Gómez-Partida G, Chakraborty R.** Reproductive history in Mothers of children with neural tube defects. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 49: 255-260.
 29. **Del Bianco A, Maruotti G, Fulgieri AM, Celeste T, Lombardi L, Amato NA, Pietropaolo F.** Recurrent spontaneous miscarriages and hyper homocysteinemia. *Minerva Ginecol* 2004; 56(5):379-383.
 30. **Quéré I, Mercier E, Bellet H, Janbon CH, Marés P, Gris J.** Vitamin supplementation and pregnancy outcome in women with recurrent early pregnancy loss and hyperhomocysteinemia. *Fertil Steril* 2001; 75(4):823-825.
 31. **George L, Mills J, Johansson A, Nordmark A, Olander B, Granath F, Cnattingius S.** Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. *Jama* 2002; 288(15):1867-1873.
 32. **Tempfer C, Kurz CH, Bentz E, Unfried G, Walch K, Czizek U, Huber J.** A combination treatment of prednisone, aspirin, folate, and progesterone in women with idiopathic recurrent miscarriage: a matched-pair study. *Fertil Steril* 2006; 86(1):145-148.
 33. **Goyette P, Sumner J, Milos R, Duncan A, Rosenblatt D, Matthews R, Rozen R.** Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994; 7:195-200.
 34. **McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD), 2000.** Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/OMIM-Online> Mendelian Inheritance in Man. (Online)
 35. **Rosenblatt DS, Fenton WA.** Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (Eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. McGraw Hill. New York, pp 3897-3933.
 36. **Jacques P, Bostom A, Williams R, Ellison C, Eckfeld J, Rosemberg I, Selhub J, Rozen R.** Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 93:7-9.
 37. **Gustincich S, Carminci P, Del Sal G, Mamfiollelli G, Schneider C.** A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* 1991; 11:300-302.
 38. **Goyette P, Frosst P, Rosenblatt D, Rozen R.** Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1052-1059.
 39. **Pierce B.** Genética poblacional y evolutiva. En: *Genética un enfoque conceptual*. 2da. Edición. Editorial Médica Panamericana, SA. 2006. pp. 676-720.
 40. **Rey E, Kahn S, David M, Shrier I.** Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 2003; 9361:901-908.
 41. **Ren A, Wang J.** Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2006; 86(6):1716-1722.