

Prevalencia de la mutación c677t en la enzima MTHFR en adultos del Valle Central de Costa Rica

Ileana Holst-Schumacher, MSc

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica y Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA), Universidad de Costa Rica.

Introducción

En Costa Rica la enfermedad cardiovascular (ECV) representa la primera causa de muerte desde la década de 1970 ⁽¹⁾, razón por la cual el estudio de los factores de riesgo asociados a esta patología resulta de gran importancia. Varios defectos genéticos en las enzimas que participan en el ciclo metabólico de la homocisteína han sido asociados con hiperhomocisteinemia, un factor de riesgo reconocido de ECV. La enzima 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa (MTHFR) participa en la remetilación de homocisteína a metionina y cataliza la síntesis de 5-metiltetrahidrofolato, el principal donador del grupo metilo. *Frosst et al* ⁽²⁾ identificaron una mutación puntual (C677T) en el gen que codifica la MTHFR y que genera una enzima termolábil y con el 50% de su actividad. Personas homocigotas (genotipo TT) para esta variante de la enzima tienen niveles significativamente más elevados de homocisteína, sugiriendo que esta condición sería un factor de riesgo para desarrollar hiperhomocisteinemia. Asimismo, niveles elevados de homocisteína sérica han sido asociados con concentraciones bajas de vitamina B-12 y ácido fólico ⁽³⁾. Para algunos autores, una hiperhomocisteinemia moderada es equivalente a una hipercolesterolemia como factor de riesgo cardiovascular ⁽⁴⁾. Por esa razón, algunos investigadores han señalado la importancia de conocer

las causas que generan concentraciones elevadas de homocisteína en sangre con el fin de desarrollar estrategias de prevención que permitan a mediano plazo reducir la prevalencia y mortalidad por enfermedad cardiovascular.

Material y métodos

Un total de 215 voluntarios costarricenses del valle central de San José con edades comprendidas entre los 20 y 40 años participaron en este estudio en el año 2001. Cada individuo firmó un consentimiento informado, tal y como lo establece, el Comité de Bioética de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica. La información sobre edad y género se recolectó a través de un instrumento validado. A cada individuo se le extrajo una muestra de sangre por venipuntura en estado de ayuno de 8 horas. Una porción de esta muestra se anticoaguló con EDTA para realizar la extracción de ADN para las pruebas genéticas de la enzima MTHFR, mientras que de otra porción se obtuvo suero para determinar las concentraciones séricas de homocisteína, vitamina B-12 y ácido fólico. Todas las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta ser procesadas. El ADN se extrajo de los leucocitos utilizando el método de Miller et al ⁽⁵⁾. La identificación de la sustitución de C por T en el nucleótido 677 del gen que codifica la enzima MTHFR se realizó utilizando la técnica de PCR descrita por Frosst et al

⁽²⁾. El protocolo de amplificación de la región del gen (198 pb) que codifica esta enzima incluyó iniciadores específicos y treinta y cinco ciclos a 95°C por 60s, 55°C por 60s y 72°C por 90s en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 de la casa Perkin Elmer. La digestión de las muestras de ADN amplificadas se realizó con la enzima de restricción Hinf I (Corporación Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) la cual es capaz de cortar secuencias específicas en el ADN para dejar dos fragmentos: uno de 175 pb y otro de 23 pb. Los productos de la digestión de ADN se identificaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 3%, preteñido con bromuro de etidio. Los niveles séricos de homocisteína, vitamina B-12 y ácido fólico se determinaron mediante inmunoensayos de fluorescencia polarizada y de micropartículas en un equipo automatizado IMx (Abbott Laboratorios, Division Diagnostica, Abbott Park, Illinois, Estados Unidos) ⁽⁶⁾. Los niveles séricos de homocisteína se categorizaron en normales (< 10 μmol/L), de riesgo (10-15 μmol/L) y elevados (>15 μmol/L) ^(6,7). Los datos del estudio se analizaron con el programa estadístico SPSS para Windows. Se utilizó estadística descriptiva y análisis de regresión logística considerando como significativo un valor de p < 0.05.

Resultados

La muestra en estudio consistió de 215 adultos, 159 hombres y 56 mujeres (74% y 26% respectivamente) con una edad promedio de $32,8 \pm 5,8$ años. La prevalencia de la mutación en su expresión homocigota (TT) en la población estudiada fue 29%. Un 39% de los adultos presentaron la mutación en forma heterocigoto (CT) y un 32% no presentaron esta mutación puntual (CC) en el nucleótido 677 del gen que codifica la MTHFR. No se observaron diferencias significativas en la prevalencia de la mutación por género. Tampoco se presentaron diferencias significativas entre los niveles séricos promedio de ácido fólico, vitamina B-12 y homocisteína entre los individuos sin la mutación y los heterocigotos (Cuadro 1). Los adultos homocigotos (TT) mostraron niveles séricos más bajos de ácido fólico que los individuos clasificados como "no TT" (genotipos CC y CT) (10,3 ng/mL y 11,7 ng/mL respectivamente; $p < 0,001$). Los individuos "TT" presentaron niveles séricos de homocisteína más elevados que los individuos "no TT". (12,31 μ mol/L y 9,89 μ mol/L respectivamente; $p < 0,001$). No se evidenciaron diferencias significativas en los valores medios de vitamina B-12 entre individuos homocigotos y "no TT".

El 52% de los adultos con el genotipo "no TT" para la mutación de la enzima MTHFR mostraron niveles de homocisteína inferiores a 10 μ mol/L ($p=0,002$). (Cuadro 2). El 19% de las personas homocigotas presentaron hiperhomocisteinemia, en contraste con un 3% de los individuos "no TT" ($p < 0,001$). No se observaron diferencias significativas entre las proporciones de adultos "TT" y "no TT" con niveles de homocisteína entre 10 y 15 μ mol/L. El modelo de regresión logística indicó que el riesgo de hiperhomocisteinemia es 3,12 veces mayor en los sujetos con la mutación

"TT" en la enzima MTHFR que en aquellos adultos heterocigotos o normales.

Discusión

La prevalencia del genotipo TT de la enzima MTHFR en la población estudiada fue 29%, mucho más elevada que las reportadas en otros países (2,5%-16,0%) (8,9). Solamente los caucásicos (36%) y asiáticos (40%) tienen prevalencias más elevadas de esta mutación homocigota que las reportadas en Costa Rica. Considerando que los costarricenses actuales representan una combinación genética de ancestros africanos (10-15%), amerindios (30%) y caucásicos (50-60%), es fácil explicar la alta prevalencia de la mutación en el gen que codifica la MTHFR (10). La frecuencia de ambos alelos (C y T) es prácticamente la misma, y por lo tanto, la probabilidad de que esta mutación puntual sea heredada en forma homocigota es alta.

El genotipo TT en la enzima MTHFR se ha asociado en múltiples investigaciones con hiperhomocisteinemia y concentraciones bajas de ácido fólico en suero. La expresión de esta mutación en forma heterocigota, sin embargo, no se ha relacionado con niveles elevados de homocisteína. Estos hallazgos son consistentes con los encontrados en esta investigación donde los individuos homocigotos para esta mutación presentaron niveles séricos promedio de ácido fólico y homocisteína 12% más bajos y 20% más altos respectivamente que los individuos con los genotipos CC y CT (No TT).

A pesar de que esta mutación puntual en el nucleótido 677 del gen que codifica la MTHFR es considerada un factor de riesgo no modificable para desarrollar hiperhomocisteinemia, es importante diagnosticar e identificar a

los individuos que presentan este genotipo TT ya que son ellos los que se beneficiarían mayormente de una intervención nutricional con ácido fólico. Estos y otros estudios sugieren la necesidad de un aporte de folato superior al normal en aquellos individuos portadores de la variante termolábil de la MTHFR para mantener la producción adecuada de 5-metil-tetrahidrofolato, previniendo de este modo un aumento en los niveles de homocisteína y por ende en el riesgo cardiovascular del individuo.

Bibliografía

1. Costa Rica, Ministerio de Salud, Departamento de Estadística. Mortalidad por enfermedades del aparato circulatorio. San José: Ministerio de Salud; 1996.
2. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Mathews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics*. 1995;10:111-3.
3. Molgaard J, Malinow MR, Lassvik C, Holm AC, Upson B, Olsson AG. Hyperhomocyst(e)inaemia: an independent risk factor for intermittent claudication. *J Intern Med*. 1992;231:272-9.
4. Boushey CJ, Beresford SAAA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*. 1995;274:1049-57.
5. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215-20.
6. Abbott Laboratories, Diagnostics Division. IMX System: Homocysteine, Vitamin B12 and Folate. Illinois: Abbott Laboratories; 1998.
7. Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem*. 1998;44:8(B);1833-43.
8. Refsum H, Yajnik CS, Gadkari M, Schneede J, Vollset SE, Orning L, et al. Hyperhomocysteinemia and elevated methylmalonic acid indicate a high prevalence of cobalamin deficiency in Asian Indians. *Am J Clin Nutr*. 2001;74(2):233-41.
9. Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet*. 1998;62:1258-60.
10. Franco RF, Araujo AG, Guerreiro JF, Elion J, Zago MA. Analysis of the 677 C/T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost*. 1998;79:119-21.