

234 M.T. Escudero^a
G. Ballesteros^{a,b}
J. León^c

^aServicio de Ginecología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. ^bDepartamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas. Universidad de Cantabria. Santander. ^cDepartamento de Biología Molecular. Universidad de Cantabria. Santander. España.

Correspondencia:

Dr. G. Ballesteros Olmos.
Servicio de Obstetricia y Ginecología.
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.
Cazoña, s/n. 39011 Santander. España.
Correo electrónico: dmebog@humv.es

Fecha de recepción: 13/11/02
Aceptado para su publicación: 5/4/03

Polimorfismo C677T del gen de la metilenotetrahidrofolato reductasa en mujeres gestantes

C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene in pregnant women

M.T. Escudero, G. Ballesteros, J. León. Polimorfismo C677T del gen de la metilenotetrahidrofolato reductasa en mujeres gestantes.

RESUMEN

Objetivo: Conocer la prevalencia de la mutación C677T en el gen de la metilenotetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en mujeres en edad reproductiva de Cantabria, ya que la disfunción enzimática que ocasiona se ha asociado con defectos de cierre del tubo neural, otras malformaciones y enfermedad de la gestación.

Método: Estudiamos el ADN genómico extraído de sangre periférica de 400 mujeres ingresadas por parto o aborto. La mutación C677T fue confirmada por secuenciación.

Resultados: La frecuencia del polimorfismo de la MTHFR fue: un 30% (intervalo de confianza [IC] del 95%, 25,6-34,8) genotipo normal; un 60% (IC del 95%, 55,0-64,8) genotipo heterocigoto, y un 10% (IC del 95%, 7,3-13,5) genotipo homocigoto mutante.

Conclusiones: Nuestros resultados son similares a los observados en grupos australianos de raza blanca (10,7%) y británicos (12%). No obstante, son

mayores que las referidas en holandeses (5%) y finlandeses (5%), y ligeramente menores que las observadas en un estudio italiano (16%) y otros llevados a cabo en España (del 13 al 17%) aunque en poblaciones muy diferentes de la nuestra.

PALABRAS CLAVE

Metilenotetrahidrofolato reductasa. Polimorfismo genético. Defectos del tubo neural. Ácido fólico. Hiperhomocisteinemia. Prevalencia.

SUMMARY

Objective: To determine the prevalence of the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in women of childbearing age from Cantabria (Spain), because the enzymatic dysfunction it provokes has been associated with neural tube defects (NTD), other birth defects, and pregnancy-associated diseases.

Method: We studied the genomic DNA extracted from the peripheral blood of 400 women who

were admitted to hospital for delivery or abortion. The C677T mutation was confirmed by sequencing.

Results: The frequency of this MTHFR polymorphism was: 30% (95% CI, 25.6-34.8) normal genotype; 60% (95% CI, 55.0-64.8) heterozygous mutation genotype and 10% (95% CI, 7.3-13.5) homozygous mutation genotype.

Conclusions: Our results are similar to those observed in Caucasian Australian (10.7%) and British (12%) populations but are higher than those obtained in Dutch (5%) and Finnish (5%) populations and are slightly lower than those obtained in two studies carried out in Italy (16%) and Spain (13-17%), although in populations very different from ours.

KEY WORDS

Methylenetetrahydrofolate reductase. Genetic polymorphism. Neural tube defects. Folic acid. Hyperhomocystinemia. Prevalence.

INTRODUCCIÓN

La alteración genética del gen que codifica la enzima 5-10 metilenotetrahidrofolato reductasa (MTHFR) se manifiesta como un trastorno metabólico, la hiperhomocisteinemia, que ocasiona teratogénia en el embrión y enfermedad grave en la gestación y en el adulto, y puede prevenirse aumentando la ingesta de un nutriente esencial, el ácido fólico. Esta secuencia de evidencias científicas se fundamenta en observaciones previas y en numerosos estudios observacionales y ensayos clínicos que a continuación se resumen.

Los defectos de cierre del tubo neural (DTN) son un grupo de malformaciones congénitas de causa desconocida que pueden aparecer de forma aislada o asociadas con otras anomalías. Los DTN aislados son el resultado de interacciones genéticas y ambientales, cuyo componente genético queda suficientemente evidenciado por el importante aumento del riesgo familiar. Así, la frecuencia pasa del 1-1,5 al 15-30 por mil (20 veces mayor) cuando

existe un hermano afectado; al 57 por mil cuando son dos los hermanos con espina bífida; al 11 por mil cuando esta enfermedad la padece uno de los progenitores, y al 3 por mil cuando el afectado es un primo hermano¹. El componente ambiental de mayor influencia es la dieta materna inadecuada en nutrientes esenciales, como los folatos y otras vitaminas, seguido de la exposición a agentes teratogénos, como los anticonvulsivos y otros fármacos con acción antifólica. Smithells et al² encontraron, ya en 1976, valores significativamente más bajos de folatos eritrocitarios en las madres con hijos afectados de DTN que en aquellas con descendencia sana. Schorah et al, en 1980³, observaron que la vitamina B₁₂ estaba disminuida en las madres con fetos anencéfalos. Kirke et al⁴ demostraron una prevalencia de DTN inversamente proporcional a los valores de folatos y de vitamina B₁₂ séricos, y que el riesgo era independiente para cada una de estas vitaminas. Por otro lado, estudios de intervención aleatorizados demuestran que, administrando suplementos de ácido fólico en el período periconcepcional a mujeres que habían tenido un hijo con DTN, el riesgo de recurrencia disminuía en un 70%⁵. Czeizel y Dudas⁶ demostraron que el ácido fólico también puede prevenir la primera aparición de estos defectos.

Pero no todas las madres con valores bajos de estas vitaminas tienen hijos afectados, ni todas las madres con hijos con DTN presentan valores bajos de estas vitaminas. Por tanto, aunque está suficientemente demostrado el efecto protector de la toma periconcepcional de folatos, sus mecanismos de acción no han sido bien establecidos.

La deficiencia mantenida de folatos ocasiona una progresiva elevación de los valores plasmáticos de homocisteína, y esto mismo puede ocurrir por bloqueo o disminución funcional de las enzimas que intervienen en la metabolización de la homocisteína, tanto de la vía de la transulfuración hacia cisteína y succinil-coA como de su remetilación a metionina. Esta última vía necesita la MTHFR para generar el 5-metiltetrahidrofolato, sustrato necesario para la remetilación. Además, la vitamina B₁₂ también interviene como cofactor en este proceso. Se sabe que las concentraciones elevadas de homocisteína en cultivos de embriones de ratón y de pollo tienen efectos teratogénicos. También en las mujeres que han tenido un hijo con DTN⁷ y en las personas con

236 espina bífida⁸ se han encontrado valores elevados de homocisteína en plasma.

Goyette et al⁹, en 1994, aislaron el gen localizado en la banda 36.3 del brazo corto del cromosoma 1, que codifica a la MTHFR. Posteriormente se identificaron varias mutaciones en el citado gen, siendo la más frecuente la 677C→T, consistente en la sustitución de la base citosina por timina en el nucleótido 677, lo que ocasiona el cambio de valina por alanina en la posición 223 de la secuencia de aminoácidos de la enzima. Esta variación origina un descenso en la actividad de la enzima, lo que ocasiona un aumento de los valores de homocisteína en sangre. Jacques et al¹⁰ observan que en los portadores de esta mutación (variante T/T) aumenta la concentración de homocisteína cuando los valores de folatos están por debajo de los valores medios, aunque se mantengan dentro del rango de la normalidad. Es decir, requieren mayor ingestión de folatos para evitar la hiperhomocisteinemia. Esta mutación es autosómica recesiva y su prevalencia es variable en cada población. Se ha encontrado un aumento de su frecuencia en niños con espina bífida y en sus padres¹¹. Ou et al¹² estiman que del 50 al 70% de los DTN son atribuibles a este defecto enzimático, y que éstos serían una parte importante de los casos susceptibles de prevención mediante la suplementación periconcepcional con ácido fólico.

Esta mutación también se ha relacionado con otras malformaciones y enfermedades de la gestación. Así, se ha observado una mayor prevalencia entre las madres de niños con malformaciones cardíacas aisladas¹³, así como en niños con labio leporino no sindrómico con o sin paladar hendido¹⁴ y en sus madres¹⁵.

La homocisteína induce alteraciones vasculares similares a las que ocurren en la preeclampsia, por lo que se cree que la hiperhomocisteinemia puede participar en la fisiopatología de esta enfermedad obstétrica. Se ha encontrado una mayor frecuencia del estado homocigoto de la mutación en mujeres que durante el embarazo desarrollaron preeclampsia, crecimiento intrauterino retardado (CIR) o desprendimiento prematuro de placenta normoinsera (DPPNI)^{16,17} y en las que tenían antecedentes de abortos de repetición, fetos muertos y muerte súbita de recién nacido, aunque no todas las publicaciones refrendan estos hallazgos.

Fuera de la gestación, se ha encontrado asociación de la variante T/T con alteraciones vasculares,

tanto arteriales como venosas, cerebrales, cardíacas y periféricas. Asimismo es más frecuente en pacientes con enfermedad de Alzheimer, con enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), migrañas y algunos cánceres ginecológicos.

Por todo ello, pero esencialmente por las posibles repercusiones en la salud materna y fetal, nos planteamos como objetivo principal conocer la prevalencia de la variante C677T en el gen de la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa de las gestantes de nuestra comunidad. De forma secundaria analizamos su asociación con los antecedentes obstétricos y con la afección y los resultados de la gestación actual.

MATERIAL Y MÉTODOS

Llevamos a cabo un estudio con ADN genómico obtenido de sangre de 400 mujeres ingresadas en los hospitales de la red pública de la Comunidad de Cantabria, con motivo de la finalización de su gestación (partos y abortos), en un período consecutivo que comprende los primeros 2 meses del año 2000. El número muestral fue calculado, según una estimación, a partir de datos de prevalencia de estudios previos, del 13% (± 5 unidades), para un riesgo $\alpha = 0,05$, asumiendo que la población total de mujeres en edad reproductiva en nuestra comunidad es de 100.000, de las que aproximadamente 4.000 al año finalizan su gestación en nuestros centros. Esto se consigue con una muestra de 167 casos. El estudio se amplió hasta alcanzar los 400 casos, para valorar mejor su asociación con los acontecimientos de la gestación.

El ADN obtenido de la sangre periférica de las mujeres que colaboraron en el estudio fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando los cebadores NCO-347 (5' GAAGCAGGGAGCTTTGAGGCTGACCT 3', posición 619-644 de la secuencia de ADN de la enzima MTHFR; número de acceso al GenBank: U09806) y NCO-346 (5' AAGGATGCCCATGTCTGGTGCATGCCT 3'; posición 760-733), obteniéndose un fragmento de ADN de 142 pares de bases que visualizamos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Posteriormente, purificamos el ADN mediante el kit QIAquick (Quiagen®) y a continuación una cantidad de ese ADN (15 μ l) fue sometida a digestión por la

enzima de restricción Taq I (Gibco BRL®), que separa la secuencia de ADN que codifica a la variante termolábil de la MTHFR en dos fragmentos de 84 y 58 pares de bases, respectivamente. La separación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo mediante electroforesis a 200 V en geles de poliacrilamida al 12%, que fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados a través de luz ultravioleta en el programa Molecular Analyst (Bio Rad®). En las personas que no son portadoras de la mutación (C/C) su ADN es resistente a la acción de dicha enzima y, por tanto, aparece un solo fragmento de ADN de 142 pares de bases. En los casos de sujetos heterocigotos (C/T) encontramos tres fragmentos de ADN (142, 84 y 58 pares de bases), y en los individuos homocigotos (T/T) dos fragmentos de 84 y 58 pares de bases. La separación de fragmentos de ADN puede observarse en la figura 1. Parte de las muestras fueron sometidas a secuenciación para verificar el resultado obtenido mediante la digestión con Taq I, obteniéndose idénticos resultados.

Para el análisis estadístico se utilizaron los programas informáticos SPSS 9.0 y EpiInfo. Para la comparación de grupos de variables cualitativas utilizamos el test de la χ^2 y la comparación de medias para las variables cuantitativas.

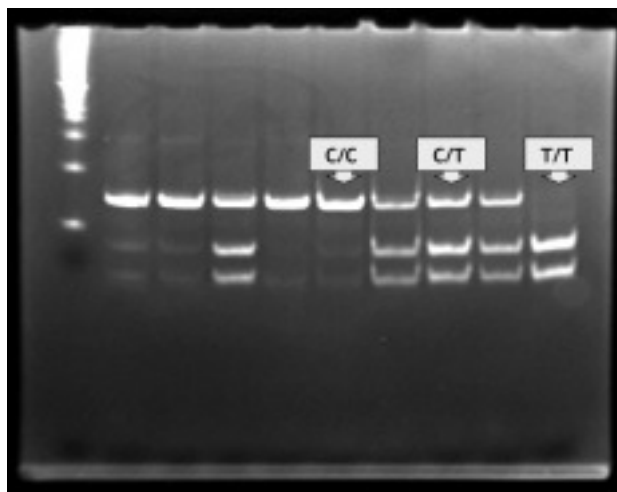


Figura 1. Fotografía de electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en la que se aprecia la separación de fragmentos de ADN de nueve muestras del gen de la MTHFR: C/C: fragmento único de 142 pares de bases; C/T: tres fragmentos de 142, 84 y 58 pares de bases; T/T: dos fragmentos de 84 y 58 pares de bases.

RESULTADOS

Durante el período establecido para la recogida consecutiva de muestras, sólo una mujer se negó a participar en el estudio. De 3 mujeres no se obtuvo muestra hemática y en 2 casos las muestras no se consideraron adecuadas para el estudio por posible contaminación entre ellas. En total las mujeres participantes fueron 400 de las 406 posibles (98,5%).

Se hallaron 40 mujeres homocigotas 677-T/T para el gen de la enzima MTHFR, lo que supone una prevalencia de la mutación del 10% (intervalo de confianza [IC] del 95%, 7,3-13,5%). Las mujeres heterocigotas 677-C/T fueron 240 (60%; IC del 95%, 55,6-64,8), y 120 mujeres (30%; IC del 95%, 25,6-34,8) presentaron un genotipo homocigoto normal 677-C/C. En la figura 2 se exponen con mayor realce los datos referidos. La frecuencia de alelos fue del 40% (IC del 95%, 36,6-43,5), para el alelo 677T y del 60% (IC del 95%, 56,5-63,4), para el 677C.

Distribuida la muestra por las distintas áreas de salud de nuestra comunidad, las variaciones de frecuencia de la mutación oscilaron entre el 8,3% del Área de Reinosa y el 10,8% del Área de Santander, sin ser estadísticamente significativas, como puede apreciarse en la figura 3.

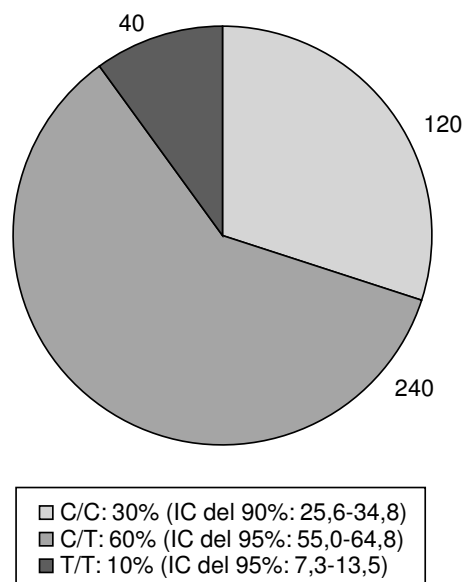


Figura 2. Prevalencia del genotipo C-677-T de la MTHFR de las mujeres gestantes de Cantabria. IC: intervalo de confianza.

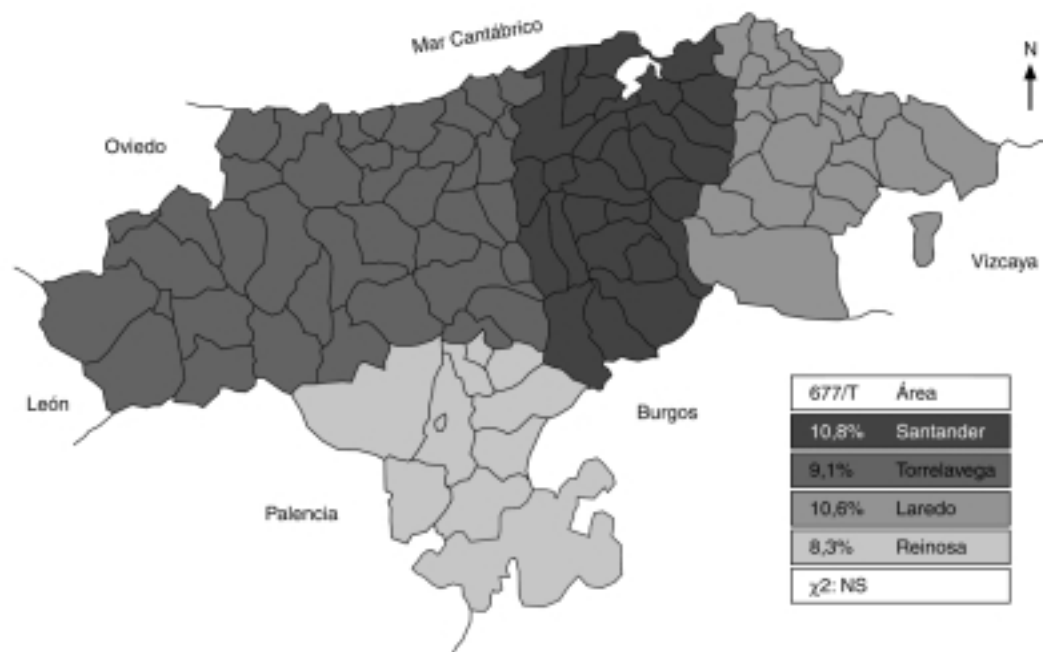


Figura 3. Frecuencias del genotipo mutante 677-T/T de la MTHFR en las mujeres de las distintas áreas de salud de Cantabria.

La edad de las mujeres que participaron en el estudio oscilaba entre los 18 y los 45 años, con una media de 30,2 años, y una mediana y moda de 30 años. En la tabla 1 se presenta la distribución por grupos de edad de las distintas variantes del polimorfismo C677T de la MTHFR. La mutación T/T es más frecuente en el grupo de las mujeres más año-

sas; no obstante, ni el contraste por grupos de edad (test de la χ^2) ni el análisis de variancia de un factor de Kruskal-Wallis alcanzan significación estadística en las diferencias.

Cuarenta y nueve mujeres (12,25%) finalizaron la gestación antes de la semana 22 (dos extrauterinos y 47 abortos); otras 27 entre la semana 22 y la 36,

Tabla 1 Frecuencias de distribución por grupos de edad de las variantes polimórficas del genotipo C-677-T de la MTHFR y contraste estadístico de la comparación de grupos y de medias

	C/C		C/T		T/T		Significación estadística
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Grupos de edad							
< 20	5	(41,6)	6	(50)	1	(8,3)	
20-24	14	(30,4)	26	(56,5)	6	(13,0)	
25-29	37	(31,1)	69	(57,9)	13	(10,9)	
30-34	41	(29,3)	90	(64,2)	9	(6,4)	
35-39	20	(28,5)	42	(60)	8	(11,4)	(0,774)
≥ 40	3	(23,0)	7	(53,8)	3	(23,0)	NS
	n	Media	n	Media	n	Media	
Edad (media)	120	29,8	240	30,4	40	29,9	(0,523) NS

Tabla 2 Frecuencias de distribución por grupos de edad gestacional del final del embarazo de las variantes polimórficas del genotipo C-677-T de la MTHFR y contraste estadístico de la comparación de grupos

	C/C		C/T		T/T		Significación estadística
	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)	
Final gestación*							
< 22 semanas	17	(34,7)	24	(49,0)	8	(16,3)	(0,151)
≥ 22 semanas	103	(29,3)	216	(61,5)	32	(9,1)	NS
Final gestación**							
< 22 semanas	17	(34,7)	24	(49,0)	8	(16,3)	(0,329)
22-36 semanas	7	(25,9)	18	(66,6)	2	(7,4)	
≥ 37 semanas	96	(29,6)	198	(61,1)	30	(9,2)	
	<i>n</i>	<i>Media</i>	<i>n</i>	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	
Final gestación (media)	103	38,8	216	38,6	32	39,3	(0,274) NS

*Abortos frente a partos. **Abortos frente a partos pretérmino y partos a término y medias.

Tabla 3 Frecuencias de distribución por grupos de peso fetal excluidos abortos y gestaciones múltiples de las variantes polimórficas del genotipo C-677-T de la MTHFR y contraste estadístico de la comparación de grupos

	C/C		C/T		T/T		Significación estadística
	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)	
Peso fetal*							
< 1.000	0	(0)	2	(100)	0	(0)	(0,893)
1.000-2.499	5	(22,7)	15	(68,2)	2	(9,1)	
2.500-3.999	91	(30,1)	182	(60,2)	29	(9,6)	
≥ 4.000	6	(31,6)	12	(63,1)	1	(5,2)	
Peso fetal**							
< 2.500	5	(20,8)	17	(70,8)	2	(8,3)	(0,581)
≥ 2.500	97	(30,2)	194	(60,4)	30	(9,3)	NS
	<i>n</i>	<i>Media</i>	<i>n</i>	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	
Peso fetal (media)	102	3289,5	211	3217,9	32	3264,0	(0,441) NS

*Cuatro grupos. **Dos grupos y medias.

lo que supone un 6,75% de partos pretérmino, y las 321 restantes finalizaron su gestación a término (81%). En las mujeres con la variante genómica T/T encontramos una mayor frecuencia de abortos. No existen diferencias en la comparación de medias de

la edad gestacional a la que finalizaron los casos de parto. Comparados por grupos, el conjunto de los partos y el de los abortos, las diferencias se aproximan a la significación estadística sin llegar a alcanzarla (tabla 2).

240

De los 345 partos de feto único, 24 (el 6,65%) tuvieron un peso inferior a 2.500 g. En la tabla 3 se recogen las distintas frecuencias de las variantes genómicas C677T de la MTHFR en función de los pesos de estos recién nacidos. En el contraste estadístico, tampoco encontramos diferencias en la comparación de medias ni en la de grupos.

Por otro lado, analizamos la relación existente entre algunas enfermedades obstétricas, antecedentes reproductivos desfavorables, malformaciones fetales y antecedentes familiares de malformaciones, y el polimorfismo génico C677T de la MTHFR. Habida cuenta de la escasa incidencia de estas afecciones agrupamos aquellas que pueden tener factores comunes en su origen y una correlación conocida o sospechada con estados de hipofolatemia o hiperhomocisteinemia que se asocian con la mutación génica que nos ocupa. En el grupo de «Antecedentes reproductivos desfavorables» se incluyó a 27 mujeres que, entre sus antecedentes, tienen mortinatos, hijos con malformaciones, interrupciones de gestaciones

previas por malformaciones fetales o dos o más abortos espontáneos. El grupo de «Antecedentes de DTN» incluye a las mujeres (13 casos) con estos antecedentes en sus familiares de primer y segundo grado (hermanos, primos y sobrinos), en sus embarazos previos (hijos con espina bífida o interrupciones por DTN), o que ellas mismas son portadoras de una espina bífida abierta u oculta. Analizamos los casos (17 gestaciones) con malformaciones fetales, en los que hay dos grupos bien diferenciados: las malformaciones leves que encontramos en recién nacidos vivos (9 casos) y las malformaciones graves incompatibles con la vida o asociadas con alteraciones cromosómicas que encontramos en las interrupciones legales de la gestación (8 casos), para las que el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla es centro de referencia. Las 27 mujeres que refieren un antecedente familiar próximo de malformación diagnosticada constituyen otro de los grupos analizados. Las 12 mujeres que habían presentado preeclampsia, CIR o desprendimiento de placenta durante la ges-

Tabla 4 Frecuencias de distribución por grupos de patología gestacional, malformaciones fetales o antecedentes reproductivos desfavorables o de malformaciones de las variantes polimórficas del genotipo C-677-T de la MTHFR y contraste estadístico.

	C/C		C/T		T/T		Significación estadística
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Antecedentes reproductivos desfavorables							
No	111	(29,7)	224	(60,0)	38	(10,2)	(0,859)
Sí	9	(33,3)	16	(59,2)	2	(7,4)	NS
Antecedentes de DTN (personales, familiares, obstétricos)							
No	117	(30,2)	232	(59,9)	38	(9,8)	(0,737)
Sí	3	(23,1)	8	(61,5)	2	(15,4)	NS
Antecedentes familiares de malformaciones							
No	117	(31,4)	218	(58,4)	38	(10,2)	(0,053)
Sí	3	(11,1)	22	(81,5)	2	(7,4)	NS
Preeclampsia, CIR, DPPNI*							
No	97	(28,6)	213	(62,8)	29	(8,6)	(0,019)
Sí	6	(50)	3	(25)	3	(25)	SE
Malformaciones fetales:							
No	112	(29,2)	233	(60,8)	38	(9,9)	(0,243)
Sí	8	(47,1)	7	(41,1)	2	(11,8)	NS

*Referido a gestaciones finalizadas después de la 22 semanas (n = 351 partos).

tación actual forman otro grupo de análisis, el único en que encontramos diferencias de distribución del polimorfismo C677T de la MTHFR con significación estadística. Las frecuencias de distribución del polimorfismo en los distintos grupos de análisis y los contrastes estadísticos se presentan en la tabla 4.

DISCUSIÓN

La prevalencia del 10% de la variante T/T del polimorfismo génico C677T, que codifica la variante termolábil de la MTHFR, hallada en nuestro estudio, es similar, aunque algo más baja que la observada en otras poblaciones españolas. En España todos los resultados publicados refieren frecuencias de la variante génica T/T mayores a las encontradas en nuestro estudio. Muñoz Morán et al¹⁸ en Málaga encuentran una prevalencia del 13% en el grupo de edad entre 21 y 41 años, que se corresponde con la edad de las mujeres de nuestro estudio. Guillén et al¹⁹ en Valencia reportan una prevalencia del 32% para la variante C/C, del 52,2% para la C/T y del 15,8% para la T/T. No obstante, la frecuencia de alelos 677T en su grupo de mujeres es totalmente superponible a la de nuestro estudio (40%; IC del 95%, 37-44). En Barcelona, Córdoba et al²⁰, en un estudio de casos y controles en pacientes ingresados por accidentes cerebrovasculares, encuentran una prevalencia T/T del 14% en los 50 controles.

En el resto de Europa, en países como Francia (10%)²¹, Noruega (10%)²², Reino Unido (12%)²³ e Irlanda (13%)²⁴ también se hallaron prevalencias similares a la nuestra, mientras que en otros, como Suiza (5%)²⁵, Finlandia (5%)²⁶, Alemania (5-7%)²⁷ y Países Bajos (5-9%)²⁸, éstas son sensiblemente menores. Por otra parte, la mayoría de los países desarrollados tienen prevalencias parecidas a las nuestras: Japón (10-11%)²⁹, Canadá (11-16%)³⁰, EE.UU. (12-14%)³¹, aunque es sabido que pueden presentarse variaciones geográficas, étnicas y raciales. Así, en el norte de Italia, el 21% de la población presenta la variante génica T/T, mientras que en el sur sólo la tiene el 15%. La población estadounidense de piel blanca presenta una frecuencia de esta variante del 12 al 15%, mientras que en los americanos de origen africano sólo se encuentra en el 1,4%. En Israel, donde convive una gran variedad de grupos étnicos, se observa la variante T/T en el 2% de los judíos ye-

menitas, el 4% de los sefarditas, el 9% de los orientales, el 16% de los norteafricanos, el 19% de los ashkenazis y en el 10% de los árabes musulmanes³². La menor prevalencia de esta mutación es la observada en África subsahariana, donde en los pocos estudios que se han llevado a cabo no se han encontrado sujetos homocigotos para esta variante polimórfica, siendo la frecuencia de aparición del alelo T del 7%³³. La mayor prevalencia ha sido la encontrada en México, donde el genotipo T/T aparece en un 34,8% de la población, lo que se corresponde con una incidencia de DTN del 3,6 por cada 1.000 recién nacidos vivos³⁴.

En algunos estudios se ha observado que la prevalencia del polimorfismo C677T puede ser diferente según la edad, y es mayor la variante T/T en los individuos más jóvenes. En España, en el referido estudio de Muñoz-Morán et al¹⁸ se encuentra un incremento de la prevalencia de T/T progresivo conforme disminuye la edad. En nuestro estudio esto no se cumple, y no sólo no encontramos esa tendencia, sino que precisamente las mujeres de mayor edad son las que presentan la variante mutante con mayor frecuencia. En el estudio de Guillén et al¹⁹ no se encuentran diferencias por la edad. En cambio, Matsushita et al³⁵, en Japón, hallan una frecuencia de la variante T/T del 7% entre los individuos mayores de 80 años, del 14% en los sujetos entre 55 y 79 años y del 19% en el grupo de edad de 14 a 55 años. En los Países Bajos, Heijmans et al³⁶ observan que esta mutación aparece con una frecuencia menor en los varones con 85 años o más. La conocida asociación de la mutación con enfermedades asociadas con el incremento de la mortalidad en adultos jóvenes, como la enfermedad cardiovascular isquémica y la trombosis, podrían explicar la disminución de la prevalencia de la mutación en especial en los grupos de mayor edad.

En el análisis de la edad de gestación de la finalización del embarazo en relación con los grupos genómicos, encontramos una mayor frecuencia de abortos en las mujeres con la variante T/T de la enzima. No encontramos, en cambio, diferencias manifestadas en la comparación de medias de la edad gestacional a la que finalizaron los casos de parto, pero es más frecuente el polimorfismo T/T en el grupo de los abortos que en el de los partos, aunque estas diferencias tampoco alcanzan la significación estadística. Brenner et al³⁷, en 1999, comunican una ma-

242 yor frecuencia de este polimorfismo entre las mujeres que tuvieron algún aborto (el 18 frente al 10%), pero tampoco encuentran significación estadística. En Francia, en el estudio de Gris et al³⁸ se halla una fuerte asociación entre el genotipo T/T y el antecedente de un feto muerto anteparto (el 16,8 frente al 0,9% en los casos y los controles, respectivamente). Nosotros tampoco encontramos ninguna asociación cuando estudiamos los antecedentes de mujeres que abortaron de forma espontánea; los de aquellas en las que se practicó un aborto por feto malformado, y los de las que dieron a luz mortinatos y recién nacidos con malformaciones. No obstante, la mayoría de las publicaciones no establecen ninguna relación entre el estado homocigoto de esta mutación y el antecedente de aborto o de pérdidas fetales. El contraste estadístico no es significativo en la comparación de medias ni en la de grupos, cuando comparamos los pesos fetales, excluidos los abortos y las gestaciones múltiples.

Diversos estudios han demostrado el aumento de frecuencia del genotipo T/T de la MTHFR en personas afectadas de espina bífida y en sus padres, y se ha estimado que el 50-70% de los DTN es atribuible a este defecto enzimático^{11,12}. Asimismo, Wenstrom et al¹³, entre otros, han encontrado aumento de la variante T/T en las madres de fetos con malformaciones cardíacas. También se ha comunicado la asociación de la mutación en madres con hijos con el labio leporino no sindrómico¹⁵, asociación que es mayor en los pacientes con paladar hendido¹⁴. Otros estudios sugieren esta asociación en madres con descendencia con defectos en las extremidades³⁹ y anomalías del tracto urinario⁴⁰. El síndrome de Down también se ha asociado en madres portadoras de la mutación⁴¹, y el riesgo de padecerlo se pone

de manifiesto si éstas son portadoras de un alelo (RR = 2,5), y es mayor en las homocigotas mutantes (RR = 3,2). Analizados estos acontecimientos, en nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en el grupo de las mujeres que tenían antecedentes personales, familiares u obstétricos de DTN ni en las que tuvieron fetos con algún tipo de malformación, aunque las frecuencias de la variante T/T sí son algo mayores. El grupo de mujeres que referían tener familiares directos con malformaciones presenta diferencias próximas a la significación, pero como puede observarse en la tabla 4, esto es debido más a las frecuencias de heterocigotas C/T (el 81,5 frente al 58,4%), que a las de la mutación homocigota (el 7,4 frente al 10,2%).

En nuestro estudio sí encontramos asociación de la mutación con el grupo de enfermedades obstétricas en la gestación actual, que incluye preeclampsia, CIR y DPPNI. Resultados similares a los obtenidos por Kupferminc et al¹⁶ en Israel y Van der Molen¹⁷ en los Países Bajos, que llevan a cabo estudios de casos y controles en los que se encuentra una prevalencia del genotipo T/T de la MTHFR del 22 frente al 8%, y del 12 frente al 5%, respectivamente, entre las mujeres que tuvieron alguna de estas complicaciones durante su embarazo, frente a las mujeres del grupo control. No obstante, no todas las publicaciones encuentran esta asociación.

Como puede observarse, los resultados encontrados no coinciden con los publicados, pero nuestra casuística en estos grupos de enfermedad de la gestación y de antecedentes es escasa, lo que condiciona tanto la significación como la potencia estadística. Por otro lado, algunos grupos no son homogéneos para un tipo determinado de malformación, lo que evidentemente también condiciona los contrastes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Main DM, Mennuti MT. Neural tube defects: issues in prenatal diagnosis and counseling. *Obstet Gynecol* 1986;67:1-15.
2. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 1976;51:944-50.
3. Schorah CJ, Smithells RW, Scott J. Vitamin B₁₂ and anencephaly. *Lancet* 1980;1:880.
4. Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DG, Scott JM. Maternal plasma folate and vitamin B₁₂ are independent risk factors for neural tube defects. *QJM* 1993;86:703-8.
5. MCR Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council vitamin study. *Lancet* 1991;338:131-7.

6. 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.
7. Steegers Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJ, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CM, et al. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects. *Metabolism* 1994;43:1475-80.
8. Bjorke-Monsen AL, Ueland PM, Schneede J, Vollset SE, Refsum H. Elevated plasma total homocysteine and C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with spina bifida. *QJM* 1997;90:593-6.
9. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rodenblatt DS, Matthews RG, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping an mutation identification. *Nat Genet* 1994;7:195-200.
10. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93:7-9.
11. Van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trejbel FJ, Eskes TK, Van den Heuvel LP, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995;346:1070-1.
12. Ou CY, Stevenson RE, Brown VK, Schwartz CE, Allen WP, Khoury MJ, et al. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. *Am J Med Genet* 1996;63:610-4.
13. Wenstrom KD, Johanning GL, Johnston KE, Dubard M. Association of the C677T metylenetetrahydrofolate reductase mutation and elevated homocystine levels with congenital cardiac malformations. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:806-12; discussion 812-7.
14. Mills JL, Kirke PN, Molloy AM, Burke H, Conley MR, Lee YJ, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. *Am J Med Genet* 1999;86:71-4.
15. Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Carinci P, Stabellini G, et al. C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: a risk factor for mothers? *Am J Med Genet* 2001;98:357-60.
16. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar Am A, Jaffa A, et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340:9-13.
17. Van der Molen EF, Arends GE, Nelen WL, Van der Put NJ, Heil SG, Eskes TK, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene as a new risk factor for placental vasculopathy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:1258-63.
18. Muñoz Moran E, Diéguez Lucena JL, Fernández Arcas N, Peran Mesa S, Reyes Engel A. Genetic selection and folate intake during pregnancy. *Lancet* 1998;352:1120-1.
19. Guillen M, Corella D, Portolés O, González JI, Mulet F, Saiz C. Prevalence of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T mutation in the Mediterranean Spanish population. Association with cardiovascular risk factors. *Eur J Epidemiol* 2001;17:255-61.
20. Córdoba A, Cirera S, Carrascosa C, Arcelus R, Castellví A, Rodés M, et al. Thermolabile genotype of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and hyperhomocysteinemia in patients with non hemorrhagic cerebro-vascular disease. *J Inher Metab Dis* 1996;19(Suppl 1):23.
21. Mornet E, Muller F, Lenvoise-Furet A, Delezoide AL, Col JY, Simon-Bouy B, et al. Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects. *Hum Genet* 1997;100:512-4.
22. Guttormsen AB, Ueland PM, Nesthus I, Nygard O, Schneede J, Vollset SE, et al. Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (≥ 40 micromol/L): the Hordaland Homocysteine Study. *J Clin Invest* 1996;98:2174-83.
23. Papapanetrou C, Lynch SA, Burn J, Edwards YH. Methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects [letter]. *Lancet* 1996;348:58.
24. Molloy A, Daly S, Mills J, Kirke PN, Whitehead AS, Ramsbottom D, et al. Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cells folates: implications for folate intake recommendations. *Lancet* 1997;349:1591-3.
25. Posey DL. Is mutated MTHFR a risk factor for neural tube defects? *Lancet* 1996;347:686-7.
26. Motulsky AG. Nutritional ecogenetics: homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defects, and folic acid. *Am J Hum Genet* 1996;58:17-20.
27. Koch M, Stegmann K, Ziegler A, Schroter B, Ermer A. Evaluation of the MTHFR C677T allele and the MTHFR gene locus in a German spina bifida population. *Eur J Pediatr* 1998;157:487-92.
28. Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects? *Am H Gyn Genet* 1998;62:1044-51.
29. Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y, et al. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation* 1997;95:2032-6.
30. Deloughery TG, Evans A, Sadeghi A, McWilliams J, Henner WD, Taylor LM Jr, et al. Common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Correlation with homocysteine metabolism and late-onset vascular disease. *Circulation* 1996;94:3074-8.
31. Verhoef P, Rimm EB, Hunter DJ, Chen J, Willett WC, Kelsey K, et al. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and risk of coronary heart disease: results among US men. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:353-9.
32. Pollak RD, Friedlander Y, Pollak A, Idelson M, Bejarano-Achache I, Blumenfeld A. Ethnic differences in the frequency of the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase

- (MTHFR) gene in healthy Israeli populations. *Genet Test* 2000;4:309-11.
33. Pepe G, Camacho Vanegas O, Giusti B, Brunelli T, Marcucci R, Attanasio M, et al. Heterogeneity in world distribution of the thermolabile C677T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase [letter]. *Am J Hum Genet* 1998;63:917-20.
34. Mutchinick OM, Lopez 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.
35. Matsushita A, Muramatsu T, Arai H, Matsui T, Higuchi S. The frequency of the methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation varies with age in the normal population [letter]. *Am J Hum Genet* 1997;61:1459-60.
36. Heijmans B, Gussekloo J, Kluit C, Droog S, Lagaay AM, Knook DL, et al. Mortality risk in men is associated with a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR). *Eur J Hum Genet* 1999;7:197-204.
37. Brenner B, Saring G, Weiner Z, Younis J, Blumenfeld Z, Lanir N. Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause. *Thromb Haemost* 1999;82:6-9.
38. Gris JC, Quere I, Monpeyroux F, Mercier E, Ripart-Neveu S, Tailland ML, et al. Case-control study of the frequency of thrombophilic disorders in couples with late foetal loss and no thrombotic antecedent. The Nîmes Obstetricians and Haematologists Study 5 (NOHA5). *Thromb Haemost* 1999;81:891-9.
39. Shashi V, Rickheim A, Pettenati MJ. Maternal homozygosity for the common MTHFR mutation as a potential risk factor for offspring with limb defects. *Am J Med Genet* 2001;100:25-9.
40. Hernandez-Díaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med* 2000;343:1608-14.
41. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999;70:495-501.