

Variante C677T del gen metileno-tetrahidrofolato reductasa en niños mexicanos con labio/paladar hendido no sindrómico

Ingrid Patricia Dávalos-Rodríguez,^{1,2}
Ernesto Javier Ramírez-Lizardo,²
Juan Pablo Mena,^{1,2}
Víctor Ledezma-Rodríguez,³
Nory Omayra-Dávalos,²
Mirna Gisel González-Mercado,^{1,2}
Jorge Durán-González,^{1,2}
María Cristina Morán-Moguel,^{1,2}
Valeria Peralta-Leal,^{2,3}
Mario Salazar-Páramo,⁴
Víctor Ledezma-Gómez¹

RESUMEN

Introducción: el labio hendido con o sin paladar hendido no sindrómico (LPHNS) es una de las anomalías de etiología multifactorial más común. La variante C677T de la enzima metileno-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es responsable de una forma termolábil de la enzima, disminución de folatos y aumento de homocisteína. Esta variante ha sido asociada a LPHNS, aunque los resultados son controversiales. En este estudio se buscó determinar la frecuencia alélica y genotípica de la variante MTHFR-C677T en 67 niños mexicanos con LPHNS.

Métodos: estudio transversal comparativo de pacientes provenientes del Instituto Jalisciense de Cirugía Reconstructiva, Secretaría de Salud, Jalisco. Grupo de referencia, mexicanos sin LPHNS.

Resultados: la frecuencia alélica de la variante MTHFR-C677T fue de 39 %. No hubo diferencia estadísticamente significativa al compararla entre ambos grupos (39 *versus* 41 %).

Conclusiones: el genotipo homocigoto TT de los niños mexicanos con LPHNS estudiados no mostró ser un factor de riesgo mayor para dicha malformación, sin embargo, se debe considerar el tamaño de la muestra, otros genes implicados y la interacción genes-ambiente para al desarrollo de LPHNS.

SUMMARY

Background: non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCLP) is a common malformation. The aetiology is multifactorial. An incidence of 1.1-1.39 per 1000 new births had been reported in Mexico. The folic acid intake in preconceptional stage has been reported to prevent malformations such as neural tube defects (NTD) and NSCLP. The C677T variant of the methylene-tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene is responsible of a thermolabile form, related to decrease of folate and increase homocysteine. This variant has been associated with CLP, in different populations, but results are still controversial. Our objective was to determine the allelic (AF) and genotypic frequency (GF) of the MTHFR-C677T variant in Mexican children with NSCLP.

Methods: transverse comparative study in 67 Mexican children with NSCLP and a control group with 70 unrelated Mexican individuals without NSCLP.

Results: the AF in NSCLP was 39 %. There was no statistical difference between AF in the two groups (39 *versus* 41%).

Conclusions: in this population, genotype C677T was not a major risk factor for this malformation, however, sample size, other genes implicated and genes-environment interactions must be considered.

¹Centro de Investigación Biomédica de Occidente

²Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara

³Instituto Jalisciense de Cirugía Reconstructiva, Secretaría de Salud

⁴División de Investigación, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional de Occidente

Autores 1 y 4, Instituto Mexicano del Seguro Social

Guadalajara, Jalisco, México

Comunicación con: Ingrid Patricia Dávalos-Rodríguez. Correo electrónico: ingriddavalos@hotmail.com

Recibido: 18 de octubre de 2007

Aceptado: 8 de octubre de 2008

Introducción

El labio hendido con o sin paladar hendido no sindrómico (LPHNS) constituye una de las anomalías congénitas más comunes. El LPHNS tiene una frecuencia de alrededor de uno por 1000 recién nacidos vivos en el mundo, aunque difiere según la zona geográfica y nivel socioeconómico; la proporción por sexo es 2:1 masculino:femenino.¹⁻³ Se ha informado

en México una frecuencia de 1.1 a 1.39 por cada 1000 recién nacidos vivos.⁴⁻⁶

La etiología del LPHNS es compleja e involucra factores ambientales y genéticos.^{3,7} Dentro de los factores ambientales se encuentran deficiencias nutricionales,⁸ deficiencia de ácido fólico, exposición a teratógenos, tabaquismo, alcohol, anticonvulsivantes, esteroides y vitamina A,^{8,9} y concentraciones elevadas de cinc.¹⁰

Palabras clave

paladar hendido
labio hendido
metilenotetrahidrofolato reductasa
niño

Key words

cleft palate
cleft lip
methylenetetrahydrofolate reductase
child

Se han propuesto varios genes candidatos en el origen del LPH, entre los que se encuentran el factor de crecimiento transformante alfa (TGFA), MSX1, IRF6, MYH9, MYH14, GABRB3 y MTHFR.^{8,9,11-15}

La enzima MTHFR participa en el metabolismo del ácido fólico, el cual ha sido involucrado en la patogénesis de LPHNS. Los folatos son necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos, aminoácidos y metilación, procesos fundamentales en el desarrollo normal del tejido embrionario que participa en el desarrollo del labio y paladar.¹⁶ Estudios previos informan que el consumo periconcepcional de ácido fólico puede prevenir esta malformación.¹⁷⁻²¹

La enzima MTHFR cataliza la reducción de 5-10-metilenotetrahidrofolato (5-10-metilenoTHF) a 5-metiltetrahidrofolato (5-metilTHF), forma circulante predominante de folato y donador de carbono para la remetilación de homocisteína a metionina.^{22,23}

Estructura del gen de la MTHFR

El gen MTHFR de 19 kb se localiza en el cromosoma 1 (1p36.3). Contiene 11 exones y 10 intrones (43,44) con rangos en tamaño de 102 a 432 pares de bases (pb) y 250 pb a 1.5 kilobases.²²

En 1995 se identificó una sustitución C-T (transición) en el nucleótido 677 en el gen *MTHFR*, lo que provoca un cambio de alanina por valina en la posición 222, localizada en el dominio catalítico, con una disminución de 50 % de la actividad normal de la enzima.²⁴ En estado homocigoto (TT) resulta en una variante termolábil de la enzima MTHFR con actividad reducida, homocisteína elevada y niveles bajos de ácido fólico.²²⁻²⁴

La variante MTHFR-C677T ha sido analizada en niños afectados con LPHNS y en sus madres, con resultados diversos.²⁵⁻²⁹ Se ha informado una fre-

cuencia alélica de la variante MTHFR-C677T desde 10 % en poblaciones de África y Oceanía, hasta más de 40 % en brasileños y amerindios.³⁰⁻³² En México, tanto en mestizos como en poblaciones nativas,^{33,34} la frecuencia es alta, hasta de 58 %. Dada la incidencia de LPHNS, la frecuencia de esta variante en México y la escasa información al respecto en niños mexicanos con LPHNS, decidimos analizar la frecuencia de ésta en dicha población.

Métodos

Se estableció un tamaño de muestra mínimo de 60 cromosomas (30 individuos) con base en el análisis de asociación de polimorfismos cuya frecuencia fuera mayor a 5 %.³⁵

Como grupo de casos (LPHNS) se analizaron 67 pacientes no relacionados (134 cromosomas), atendidos en el Instituto Jalisciense de Cirugía Reconstructiva, Secretaría de Salud, Jalisco, que participaron en este estudio con la autorización y previo consentimiento informado de sus padres o tutores. En el grupo de referencia se incluyeron 70 individuos no relacionados (140 cromosomas), sin antecedente de LPHNS, que decidieron participar en forma voluntaria, previo consentimiento informado.

Los procedimientos en los participantes se ajustaron a las normas éticas de la Declaración de Helsinki.

Análisis molecular

Extracción de ADN genómico de leucocitos de sangre periférica mediante técnica de micrométodo y macrométodo.^{36,37} La detección de la variante MTHFR C677T se realizó por PCR-RFLPs.^{22,24} El producto amplificado de 198 pb fue digerido con la enzima de restricción *HinfI*. Los productos digeridos fueron sometidos a corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida a 6 % y visualizados con nitrato de plata. La detección del homocigoto TT fue definido por una banda de 175 pb y una de 23 pb; heterocigoto CT, por tres bandas: una de 198 pb, una de 175 pb y una de 23 pb; y homocigoto CC, como una sola banda de 198 pb.

Análisis estadístico

El equilibrio de Hardy-Weinberg fue analizado en la población de referencia mediante χ^2 ; para la comparación de distribuciones alélicas y genotípicas entre los grupos se utilizaron las pruebas de χ^2 y prueba exacta.³⁶

Cuadro I
Distribución genotípica y alélica del la variante MTHFR-C77T en niños mexicanos con labio y paladar hendido no sindrómico (LPHNS) y en un grupo de referencia

Grupo	Genotipos						Alelos			
	CC		CT		TT		C		T	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Grupo LPHNS (n = 67)	22	33	38	57	7	10	82	61	52	39
Grupo de referencia (n = 70)	23	33	36	51	11	16	82	59	58	41

Resultados

La población de referencia estuvo en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p = 0.8$). Las cuentas y proporciones de los genotipos MTHFR y sus distribuciones alélicas son presentadas en el cuadro I.

La comparación de las distribuciones de las frecuencias genotípicas y alélicas entre ambos grupos de estudio no fue significativa ($p > 0.05$). La frecuencia del genotipo CT en el grupo de LPHNS fue de 57 %, mayor a 51 % que en la población de referencia ($p > 0.05$).

La frecuencia del alelo T en el grupo de referencia fue de 41 % y en el grupo LPHNS de 39 % ($p = 0.6$), y la presencia del alelo T en estado heterocigoto (CT) o estado homocigoto (TT) *versus* homocigoto silvestre (CC) presentó OR = 0.999 ($p = 0.997$, IC = 95 %) en la muestra analizada.

Las razones de momios no indicaron algún genotipo representativo de factor de riesgo para malformación; los intervalos de confianza a 95 % incluyeron un valor menor o igual a la unidad en todos los casos.

Discusión

El LPHNS es una malformación común en recién nacidos. Su etiología es multifactorial e intervienen factores genéticos y ambientales. Recientemente se ha considerado que la ingesta de ácido fólico en etapa periconcepcional pudiera disminuir la ocurrencia y recurrencia del LPHNS.¹¹⁻²¹ La frecuencia de la variante MTHFR-C677T ha sido analizada en poblaciones diversas y asociada a defectos del tubo neural, enfermedades cardiovasculares y preeclampsia, entre otras. En relación a LPHNS, en México son escasos los informes relativos a la frecuencia de la variante MTHFR-C677T en niños con LPHNS. En el presente trabajo, la frecuencia alélica en LPHNS fue de 39 %, las comparaciones de las distribuciones alélicas y genotípicas entre los grupos de estudio no fueron estadísticamente diferentes, y las razones de momios estimadas no indicaron que algún alelo o genotipo en los niños pudiera representar un factor de riesgo importante. De tal forma, no se encontró asociación entre la variante MTHFR-C677T y niños con LPHNS, dato que concuerda con otras poblaciones analizadas,^{28,29} sin embargo, en este estudio debe considerarse el tamaño de muestra.

El LPHNS es una entidad compleja, los resultados en diferentes poblaciones apoyan el papel de otros genes candidatos, de factores ambientales y la interacción con genes-ambiente en su etiología.

Agradecimientos

A los pacientes y a sus padres, por su participación voluntaria en este estudio.

Referencias

1. Vanderas AP. Incidence of cleft lip, cleft palate and cleft lip and palate among race. A review. *Cleft Palate J* 1987;24(3):216-225.
2. Sullivan WG. Cleft lip with and without cleft palate in black. An analysis of 81 patients. *Plast Reconstr Surg* 1989;84(3):406-408.
3. Gorlin RJ, Cohen MM, Hennekam RCM. Syndromes of the head and neck. Fourth edition. Oxford: Oxford University Press; 2001. p. 850-860.
4. Armendares S, Lisker R. Análisis genético del labio y paladar hendidos y paladar hendido solo. Un estudio en población mexicana. *Rev Invest Clin* 1974;26(4):317-332.
5. Pérez-Molina JJ, Alfaro-Alfaro N, Angulo-Castellanos E, Nario-Castellanos JG. The prevalence and risk malformations of cleft lip and cleft palate in 2 hospitals in the city of Guadalajara, Jalisco, Mexico. *Bol Med Hops Infant Mex* 1993;50(2):110-113.
6. Ochoa-Lozano BR, Ortiz-de Anda JD, Padilla-de la Paz KE, Chacón-Martínez H, Blanco-Dávila F. Casuística de 10 años de labio y paladar hendido en el Hospital Universitario de la UANL. *Med Universitaria* 2003;5(18):19-24.
7. Bender PL. Genetics of cleft lip and palate. *J Pediatr Nurs* 2000;15(4):242-249.
8. Murray JC. gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin genet* 202;61:248-256.
9. Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial cleft. *Teratology* 1999;59(1):39-50.
10. Tamura T, Munger RG, Corcoran C, Bacayao JY, Nepomuceno B, Solon F. Plasma zinc concentrations of mothers and the risk of nonsyndromic oral clefts in their children: a case-control study in the Philippines. *Birth Defects res A Clin Mol Teratol* 2005;73(9):612-616.
11. Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, Bardach J, VanDemark DR, Murray JC. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 1989;45:348-353.
12. FitzPatrick D, Farral M. An estimation of number of susceptibility loci for isolated cleft palate. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1993;13:230-235.
13. Martinelli M, Arlotti M, Palmieri A, Scapoli L, Savoia A, Di Stazio M, Pezzetti F, Masiero E, Carnici F. Investigation of MYH14 as a candidate gene in cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Oral Sci* 2008;116(3):287-290.
14. Chiquet BT, Hashimi SS, Henry R, Burt A, Mulliken JB, Stal S, Bray M, Blanton SH, Hecht JT. Genomic screening identifies novel linkages and provides further evidence for a role of MYH9 in nonsyndromic cleft lip and palate. *Eur J Hum Genet* 2008; Aug 20.
15. Prescott NJ, Malcolm S, Patch MRC. Folate and the face: evaluating the evidence for the influence of folate genes on craniofacial development. *Cleft Plate Craniofac J* 2002;39(3):327-331.
16. Bailey LB. New standard for dietary folate intake in pregnant women. *Am J Clin Nutr* 2000;71(5 Supp I): 1304S-1307S.
17. Czeizel AE, Timar L, Sarkozi A. Dose-dependent effect of folic acid on the prevention of orofacial clefts. *Pediatrics* 1999;104(6):e66.

18. Shaw GM, Wasserman CR, O'Malley CD, Tolarova MM, Lammer EJ. Risks of orofacial cleft in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *Lancet* 1995;346(8972):393-396.
19. Krapels IP, van Rooij IA, Ocke MC, West CE, van der Horst CM, Steegers-Theunissen RP. Maternal nutritional status and the risk for orofacial cleft offspring in humans. *J Nutr* 2004;134(11): 3106-3113.
20. Van Rooij IA, Ocke MC, Straatman H, Zielhuis GA, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. Periconceptional folate intake by supplement and food reduces the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Prev Med* 2004;39 (4):689-694.
21. Wilcox AJ, Lie RT, Solvoll K, Taylor J, McConaughy DR, Abyholm F, et al. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *Br Med J* 2007;334(7591):433-434.
22. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994;7(2):195-200.
23. Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, van Oost BA, et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996; 58(1):35-41.
24. 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(1):111-113.
25. Wan WD, Wang LJ, Zhou XP, Zhou DL, Zhang QG, Huang JL, et al. Relationship between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P) and genetic polymorphisms of MTHFR-C677T and A1298C. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* 2006;22(1):8-11.
26. Zhu J, Ren A, Hao L, Pei L, Liu J, Zhu H, et al. Variable contribution of the MTHFR-C677T polymorphism to non-syndromic cleft lip and palate risk in China. *Am J Med Genet A* 2006;140(6):551-557.
27. Chevrier C, Perret C, Bahuau M, Zhu H, Nelva A, Herman C, et al. Fetal and maternal MTHFR-C677T genotype, maternal folate intake and the risk of nonsyndromic oral clefts. *Am J Med Genet A* 2007; 143A(3):248-257.
28. Verkleij-Hagoort A, Blik J, Sayed-Tabatabaei F, Ursem N, Steegers E, Steegers-Theunissen R. Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms in association with orofacial clefts and congenital heart defects: a meta-analysis. *Am J Med Genet A* 2007;143A(9):952-960.
29. Brandalize AP, Bandinelli E, Borba JB, Félix TM, Roisenberg I, Schüler-Faccini L. Polymorphisms in genes MTHFR, MTR and MTRR are not risk factors for cleft lip/palate in South Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2007;40(6):787-791.
30. Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet* 1998; 62(5):1258-1260.
31. Arruda VR, Siqueira LH, Goncalves MS, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, et al. Prevalence of the mutation C677 → T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet* 1998;78 (4):332-335.
32. Gaspar DA, André M, Sterman S, Wyszynski DF, Mاتيولli SR. Role of the C677T polymorphism at the MTHFR gene on risk to nonsyndromic cleft lip with/ without cleft palate: Results from a case-control study in Brazil. *Am J Med Genet* 1999;87: 197-199.
33. 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(4): 461-467.
34. Dávalos IP, Olivares N, Castillo MT, Cantú JM, Ibarra B, Sandoval L, et al. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Ann Genet* 2000;43(2):89-92.
35. Chakraborty R. Simple size requirements for addressing the population genetic issues for forensic use of DNA typing. *Hum Biol* 1992;64: 141-159.
36. Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, Schneider C, Carninci P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* 1991;11(3):298-300.
37. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215.