

## Artículo original

## Polimorfismo 677CT del gen de la metilentetradihidrofolato reductasa y cardiopatías congénitas aisladas en población mexicana

Rocío Sánchez-Urbina<sup>a,b</sup>, Carlos Galaviz-Hernández<sup>c,\*</sup>, José Alfredo Sierra-Ramírez<sup>d,e</sup>, Héctor Rangel-Villalobos<sup>f</sup>, Rodrigo Torres-Saldúa<sup>d</sup>, Carlos Alva-Espinoza<sup>g</sup>, María de Lourdes Ramírez-Dueñas<sup>h</sup>, Ricardo García-Cavazos<sup>d</sup> y Eliakym Arámbula-Meraz<sup>i</sup>

<sup>a</sup> Genética Humana, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México

<sup>b</sup> Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental, Hospital Infantil de México Federico Gómez, SS, México DF, México

<sup>c</sup> Academia de Genómica Aplicada, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Durango, Durango, México

<sup>d</sup> Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México DF, México

<sup>e</sup> Instituto Nacional de Perinatología, Secretaría de Salud, México DF, México

<sup>f</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Centro Universitario la Ciénega, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México

<sup>g</sup> Servicio de Cardiopatías Congénitas, Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México

<sup>h</sup> Departamento de Genética, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, México

<sup>i</sup> Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa, México

## Historia del artículo:

Recibido el 28 de febrero de 2011

Aceptado el 24 de septiembre de 2011

On-line el 24 de diciembre de 2011

## Palabras clave:

Cardiopatía congénita

Mutación

Metilentetrahidrofolato reductasa

Hiperhomocisteinemia

## RESUMEN

**Introducción y objetivos:** México tiene alta frecuencia de la mutación 677C>T del gen de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa. Se ha demostrado que esta mutación en estado homocigoto y la hiperhomocisteinemia se asocian a cardiopatías congénitas. Nuestro objetivo es determinar si existe dicha asociación en la población mexicana.

**Métodos:** Se analizaron los genotipos de 60 pacientes con cardiopatías congénitas y sus madres, así como las concentraciones de homocisteína en estas, y se los comparó con los genotipos del grupo control (n = 62) y sus madres. También se compararon las combinaciones de los genotipos madre-hijo en ambos grupos.

**Resultados:** No se encontraron diferencias significativas de las frecuencias alélicas y genotípicas entre las pacientes con cardiopatía congénita y sus controles ni en sus madres (p > 0,05). Aunque no se encontraron diferencias entre la concentración de homocisteína y la presencia del genotipo CC o TT, la tendencia fue evidente (p = 0,0621). No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de homocisteína dependientes de la ingesta de ácido fólico. El análisis de las diferentes combinaciones genotípicas del binomio madre-hijo entre casos y controles no mostró diferencias significativas.

**Conclusiones:** Las frecuencias obtenidas concuerdan con las publicadas para nuestro país. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Tampoco se encontró asociación de la mutación TT con hiperhomocisteinemia. No hay asociación entre las combinaciones genotípicas madre-hijo y las cardiopatías. Es necesario desarrollar estudios semejantes con un mayor número de pacientes para confirmar o descartar algunas tendencias observadas en este trabajo.

© 2011 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene 677CT Polymorphism and Isolated Congenital Heart Disease in a Mexican Population

## ABSTRACT

**Introduction and objectives:** The frequency of the 677C>T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexico is one of the highest worldwide. Some studies have shown that both the homozygous state of this mutation and a high homocysteine concentration are associated with congenital heart disease. The aim of this study was to determine whether this association exists in the Mexican population.

**Methods:** Genotypes were analyzed in 60 patients with congenital heart disease and in their mothers, and the levels of homocysteine were determined in the latter group. The genotypes were compared with those of a control group (n=62) and of their mothers. All the possible mother-child genotype combinations were also compared.

**Results:** There were no significant differences in allele or genotype frequencies between the patients with congenital heart disease and the controls or their respective mothers (P>.05). Although no significant differences were observed when the homocysteine concentrations in the presence of the CC or the TT genotype were compared, a clear trend was observed (P=.0621). We found no significant

## Keywords:

Congenital heart disease

Mutation

Methylenetetrahydrofolate reductase

Hyperhomocysteinemia

\* Autor para correspondencia: Academia de Genómica, CIDIR IPN Unidad Durango, Sigma 119, Fraccionamiento 20 de Noviembre II, 34220 Durango, Durango, México. Correos electrónicos: carlosgalavizhernandez55@gmail.com, cgalaviz@ipn.mx (C. Galaviz-Hernández).

differences in homocysteine concentrations in relation to folic acid intake. The study cases and controls did not differ in terms of the possible combinations of mother-child genotypes.

**Conclusions:** The frequencies obtained were consistent with those reported for Mexico. No significant differences were found between groups. Nor did we find any association between TT mutations in both the mother and child and hyperhomocysteinemia. There was no evidence of an association between any of the mother-child genotype combinations and congenital heart disease. Similar studies with larger numbers of patients are required to confirm or refute some of the trends observed in this report.

Full English text available from: [www.revespcardiol.org](http://www.revespcardiol.org)

© 2011 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Abreviaturas

CaCo: cardiopatía congénita  
 CCC: cardiopatía congénita compleja  
 CCS: cardiopatía congénita simple  
 Hcy: homocisteína  
 MTHFR: metilentetradihidrolato reductasa  
 OR: odds ratio

## INTRODUCCIÓN

Las cardiopatías congénitas (CaCo) afectan de 3 a 8/1.000 recién nacidos vivos en el mundo<sup>1-3</sup>. En México constituyen la tercera causa de muerte de niños preescolares<sup>4</sup>. La etiología de las CaCo es compleja y muestra heterogeneidad genética<sup>5,6</sup>, y se observan patrones de herencia multifactorial en la mayoría de los casos. Entre los factores de riesgo de CaCo genéticos, se encuentra el polimorfismo 677CT del gen de la enzima metilentetradihidrolato reductasa (MTHFR)<sup>7,8</sup>. Esta enzima es esencial en el metabolismo del folato, participa en el ciclo de remetilación de la homocisteína (Hcy) y formación de metionina.

El gen *MTHFR* con *locus* en 1p36.3 presenta 11 exones<sup>9</sup>. Frosst et al (1995) identificaron una sustitución de citosina (C) por timina (T) en el nucleótido 677, que genera un cambio de alanina por valina en el dominio catalítico de la enzima<sup>9,10</sup>. El estado homocigoto T/T causa la disminución de hasta el 70% de la actividad<sup>10</sup>, lo que determina un aumento de Hcy cuando la ingesta de ácido fólico es insuficiente<sup>9,10</sup>.

Hay un componente étnico importante en la prevalencia del polimorfismo 677CT; en población italiana, la frecuencia del alelo T es de un 44-46%; en población hispana de Estados Unidos, del 42%; en población francesa, del 36% y en población japonesa, del 34%<sup>11-13</sup>. En población mexicana, el polimorfismo 677CT es aún más frecuente; en mestizos, un 44-58% y en población indígena tarahumara, el 36%<sup>13-16</sup>. Las frecuencias genotípicas para el estado homocigoto T/T publicadas para población mexicana mestiza varían del 19 al 34,8%<sup>14-16</sup>.

El polimorfismo 677CT del gen *MTHFR* se ha encontrado en mayor proporción en pacientes y madres de pacientes con CaCo que en población sana, lo que indica que la presencia del polimorfismo es un factor de riesgo de esta enfermedad<sup>7,8,17-20</sup>. Además, la presencia del genotipo T/T en pacientes con CaCo se asocia al aumento de la Hcy en líquido amniótico durante el embarazo<sup>8</sup>.

La ingesta insuficiente de ácido fólico antes de la concepción es un factor de riesgo de CaCo. Se ha publicado que la ingesta periconcepcional de multivitaminicos disminuye el riesgo de CaCo en el 59% de las CaCo troncoconales aisladas<sup>17</sup>. El efecto protector del uso de multivitaminicos fue evidente en las madres que los ingirieron en el periodo periconcepcional, comparadas con las que los tomaron después del segundo mes de la gestación<sup>17</sup>.

Por otra parte, el riesgo de tener un hijo con CaCo del tipo troncoconal para las mujeres con genotipo T/T que no ingirieron ácido fólico preconcepcional fue 6,3 veces mayor<sup>20</sup>. Sin embargo, esta evidencia tiende a ser inconsistente debido a que existen publicaciones en las que no se ha encontrado riesgo de CaCo en madres de pacientes con genotipo T/T o pacientes T/T<sup>21-23</sup>.

Debido a la elevada frecuencia del polimorfismo 677T/T en población mexicana y la alta incidencia de CaCo, el objetivo de este estudio es analizar la posible asociación entre CaCo aisladas y el genotipo 677T/T del gen *MTHFR*.

## MÉTODOS

### Selección de pacientes

Este proyecto fue aprobado por los comités de ética e investigación del Instituto Nacional de Perinatología y del Instituto Mexicano del Seguro Social, según los lineamientos de la Declaración de Helsinki. Se incluyó a 60 pacientes mestizos en edad pediátrica de ambos sexos con diagnóstico de CaCo aisladas y a sus madres, previa firma de la carta de consentimiento informado. Los pacientes fueron captados entre el 1 de marzo de 2004 y el 28 de febrero de 2005 en el Servicio de Cardiopatías Congénitas del Hospital de Cardiología del Centro Médico Siglo XXI. Se excluyó a los pacientes cuyas madres tenían diabetes mellitus 1 o 2 o tomaban anticonvulsivos. Asimismo, previo consentimiento informado del binomio madre-hijo, se captó a 62 controles sanos de la población general mestiza del centro del país.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica en tubos con EDTA, de las que se extrajo el ADN con el *kit* de extracción Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, Estados Unidos). La cantidad y la pureza del ADN fueron verificadas por espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio respectivamente.

### Determinación del polimorfismo 677CT

Se utilizaron 250 ng de ADN genómico para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en las siguientes condiciones: 5 µl de 10X PCR Buffer (200 mM; Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 1 µl de dNTP a 2,5 mM, DMSO al 5%, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol de cada oligonucleótido para el análisis del polimorfismo 677CT, sentido: 5'GAGGGAGCTTTGAGGCTGAC-3' y antisentido: 5'AGGACGGT-GCGGTGAGAGTG-3', 0,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen<sup>TM</sup>) en un volumen final de 50 µl. Se amplificó un segmento de 228 pb que se localiza en el exón 4, el cual contiene un sitio de corte para la enzima de restricción *Hinf*I, (New England Biolabs<sup>TM</sup>), producto de un cambio de C por T en la posición 677. El programa utilizado consiste en: desnaturalización inicial a 92 °C durante 2 min y 35 ciclos de desnaturalización: 92 °C 1 min, alineación a 58 °C 45 s, extensión a 72 °C 30 s y extensión final a 72 °C 7 min. Se tomaron 15 µl del producto de PCR para someterlos a digestión con 1 U de la

enzima de restricción *Hinfl* en un volumen total de 25  $\mu$ l, e incubado 3 h a 37 °C. El análisis de los fragmentos de restricción se hizo a través de electroforesis en gel de agarosa al 4%, teñido con bromuro de etidio. Si el polimorfismo 677CT del gen *MTHFR* está presente, los productos de la digestión son de 172 y 56 pb<sup>24</sup>.

### Determinación de las concentraciones de homocisteína

La cuantificación de la L-homocisteína se realizó mediante inmunoanálisis competitivo en suero de binomios madre-hijo con CaCo, en un analizador IMMULITE® 2000 (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Malvern, Pennsylvania). Las muestras fueron procesadas siguiendo las especificaciones del proveedor. El volumen de muestra requerido fue de 15  $\mu$ l y la sensibilidad del test para Hcy fue de 0,5  $\mu$ mol/l.

### Ingesta de ácido fólico prenatal por las madres de los casos

Se indagó directamente por cuestionario a todas las madres de casos con CaCo si habían recibido terapia con ácido fólico en presentación farmacéutica única o como parte de un complejo multivitamínico, a dosis de 400  $\mu$ g. La ingesta se clasificó en pregestacional y gestacional, en cuyo caso se preguntaba por el periodo de inicio de la suplementación y su duración.

### Análisis estadístico

Tanto las frecuencias alélicas como las heterocigosis observada y esperada se estimaron por método de recuento génico. Se determinó si la distribución de genotipos estaba en equilibrio Hardy-Weinberg usando el método de Monte Carlo (Guo y Thompson, 1992). Se valoró la diferencia entre grupos/poblaciones mediante pruebas exactas con el programa TFGA (*Tools For Population Genetics Analysis*) versión 3.1 (Miller, 1998). Se estimó para cada comparación la razón de momios (*odds ratio* [OR]) con el programa Epi Info™ 2000. El nivel de significación para las pruebas exactas se valoró mediante 5.000 simulaciones con un intervalo de confianza del 95% (IC95%). Para establecer asociación entre los genotipos del binomio madre-hijo y la presencia de CaCo, se aplicó la prueba de la  $\chi^2$  con un nivel de confianza del 95%. En las madres de pacientes con CaCo se determinó la relación entre concentraciones de Hcy, genotipos y consumo de ácido fólico, así como la comparación de las concentraciones de Hcy entre los diferentes genotipos de los pacientes con CaCo mediante ANOVA. Además, se aplicó la prueba de correlación de Pearson al valor de Hcy de cada paciente con CaCo respecto a la presencia del alelo de riesgo en el genotipo, convertido en variable continua de la siguiente forma: CC = 1, CT = 2, TT = 3.

## RESULTADOS

Se analizaron 60 casos con CaCo aisladas y sus madres, así como a 62 controles con sus madres. Los casos provenían de 10 estados de la República (Distrito Federal, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Querétaro, Morelos, Nayarit, Puebla y Veracruz), mientras que los 62 controles eran originarios del Distrito Federal y el Estado de México. Las edades de los pacientes oscilaron desde recién nacidos hasta 17 años de edad, con una media de 5,6 años debido a que se los captó en un hospital pediátrico. El intervalo de edad de los controles fue 18-26 años, con una media de 20 años. Del total de los pacientes, 33 (55%) eran mujeres y 27 (45%) varones; en tanto que entre los controles 24 (38,7%) eran mujeres y 38 (61,3%) varones. La media de edad materna al embarazo de las madres de

los pacientes fue de 26 años (24 años la de las madres de los controles). Las anomalías cardíacas de los casos estudiados se listan en la **tabla 1**.

La población de pacientes con CaCo estudiada tenía un origen geográfico diverso, del norte, el centro y el sur del país; a pesar de ello, se observó homogeneidad en las frecuencias alélicas y genotípicas (**tabla 2**). Destaca que no se observaron diferencias significativas entre las frecuencias alélicas y genotípicas de los pacientes y los controles o en las madres de los pacientes y las del grupo control ( $p > 0,05$ ). Los genotipos de los casos y de los controles se encontraban en desequilibrio Hardy-Weinberg ( $p < 0,05$ ), lo que en ambos casos se puede atribuir al exceso de heterocigotos respecto a lo esperado, aunque estos resultados son compatibles con el llamado «vigor híbrido» para el polimorfismo 677CT; nuestro estudio no fue diseñado para demostrar dicho

**Tabla 1**

Tipo de cardiopatías congénitas aisladas de los pacientes captados en el Servicio de Cardiopatías Congénitas del Hospital de Cardiología del Centro Médico Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (México DF)

Diagnóstico cardiológico	Genotipos			Sujetos
	CC	CT	TT	
CIV		4	3	7
CIA	2	8	1	11
CoAo		3		3
Atresia tricuspídea	1	2		3
Ventana aortopulmonar		1		1
Estenosis mitral	1			1
Estenosis aórtica		1		1
Estenosis valvular pulmonar		1		1
Anillo aórtico		1		1
TF		1	1	2
AP + CIV	1	1		2
TC		1		1
TGV		1	1	2
Ventrículo único y aurícula única			1	1
Ventrículo único y aurícula única + AP		1		1
Ventrículo único		2		2
Ventrículo único + EP		1	1	2
Ventrículo único + AP	1			1
DVSVD	1	2		3
DVSVD + CIV		1		1
DVSVD + EP		1		1
DVSVD + EP + dextrocardia		1		1
CATVP + CIA		1	1	2
CATVP		1		1
Anomalía de Ebstein		2	1	3
CIA + estenosis valvular aórtica			1	1
CIA + estenosis de la válvula pulmonar		1		1
AP + PCA			1	1
Estenosis mitral + insuficiencia tricuspídea		1		1
CoAo + CIV + PCA		1		1
Total	7 (11,7)	41 (68,3)	12 (20)	60 (100)

AP: atresia pulmonar; CATVP: conexión anómala total de venas pulmonares; CIA: comunicación interauricular; CIV: comunicación interventricular; CoAo: coartación de la aorta; DVSVD: doble vía de salida de ventrículo derecho; EP: estenosis de la arteria pulmonar; PCA: persistencia de conducto arterioso; TC: tronco cono; TF: tetralogía de Fallot; TGV: transposición de los grandes vasos. Los datos expresan n (%).

**Tabla 2**Comparación de la distribución alélica y genotípica del polimorfismo 677CT del gen *MTHFR* entre casos y controles y entre madres de casos y controles

MTHFR	Hijos					Madres				
	Genotipo			Alelo		Genotipo			Alelo	
	C/C	C/T	T/T	C	T	C/C	C/T	T/T	C	T
Casos	7 (11,7)	41 (68,3)	12 (20)	55 (45,8)	65 (54,2)	8 (13,3)	38 (63,3)	14 (23,3)	54 (45)	66 (55)
Controles	9 (14,5)	46 (74,2)	7 (11,3)	64 (51,6)	60 (48,4)	13 (21)	37 (59,7)	12 (19,3)	63 (50,8)	61 (49,2)
Comparación <sup>a</sup>	$p \geq 0,788^b$			$p = 0,844$		$p \geq 0,264^b$			$p = 0,364$	

Los datos expresan n (%).

<sup>a</sup> Prueba exacta de Fisher para comparar casos y controles.<sup>b</sup> Menor valor de probabilidad al comparar genotipos agrupados asumiendo diferentes modelos de herencia para el alelo de riesgo T: a) recesivo (C/C+C/T) y T/T, y b) dominante, C/C y (C/T+T/T).**Tabla 3**Comparación de la distribución alélica y genotípica del polimorfismo 677CT del gen *MTHFR* entre casos con cardiopatía congénita compleja y casos con cardiopatía congénita sencilla

	Genotipo			Alelo	
	C/C	C/T	T/T	C	T
CCC	5 (14,3)	23 (65,7)	7 (20)	33 (47,14)	37 (52,8)
CCS	2 (8)	18 (72)	5 (20)	22 (44)	28 (56)
Comparación <sup>a</sup>	$p = 0,4546^b$			$p = 0,7334$	

CCC: cardiopatía congénita compleja; CCS: cardiopatía congénita simple.

Los datos expresan n (%).

<sup>a</sup> Prueba exacta de Fisher para comparar casos y controles.<sup>b</sup> Menor valor de probabilidad al comparar genotipos agrupados asumiendo diferentes modelos de herencia para el alelo de riesgo T: a) recesivo (C/C+C/T) y T/T, y b) dominante, C/C y (C/T+T/T).

fenómeno, y el hallazgo no merece una discusión más profunda al respecto. Cabe señalar que se descartaron errores de genotipificación evaluando por triplicado cada muestra, por el uso de controles positivos y negativos para la PCR y digestión enzimática, además de la lectura de los resultados (genotipos) por dos personas de manera independiente.

Se realizó una estratificación de grupos entre la población con CaCo (n = 60), que se dividió en pacientes con cardiopatías congénitas complejas (CCC), compuesta de 35 pacientes (58,33%), y cardiopatías congénitas simples (CCS), 25 pacientes (41,67%). La evaluación de los genotipos T/T, C/T y C/C y los alelos T y C entre los pacientes con CCC y aquellos con CCS no reveló diferencias significativas en las frecuencias genotípicas o alélicas por tipo de cardiopatía ( $p > 0,05$ ) (tabla 3).

Los valores de Hcy en las madres no mostraron diferencias significativas al agruparlas en relación con los genotipos, los alelos o el consumo de ácido fólico ( $p = 0,7465$ ). Se determinaron las diferencias en las cifras de Hcy de los pacientes de acuerdo a los grupos de genotipos (tabla 4). La comparación de la distribución de las concentraciones de Hcy entre los grupos CC y TT mostró un valor de  $p = 0,0621$ . La correlación entre las cifras de Hcy con la presencia del alelo T tampoco fue significativa ( $p = 0,2497$ ;  $r^2 = 0,42$ ). El 41,7% de las madres de casos con CaCo no recibían terapia folínica. El restante 58,3% de las madres sujetas a

**Tabla 4**Concentraciones de homocisteína en los pacientes con cardiopatía congénita según el genotipo del polimorfismo 677CT del gen *MTHFR*

	Pacientes (n)	Homocisteína ( $\mu\text{g/l}$ ), media $\pm$ DE	EE
C/C	7	6,8 $\pm$ 2,4	0,9
T/C	41	9,3 $\pm$ 5,5	0,8
T/T	12	11,6 $\pm$ 5,6	1,6

DE: desviación estándar; EE: error estándar.

Prueba de ANOVA. Intervalo de confianza del 95%.

suplementación se dividió entre quienes la recibieron en etapa pregestacional (8,57%) y las que la tomaron en etapa gestacional (91,43%), más allá de las 6 semanas de gestación. Se buscó la relación entre tomar y no tomar ácido fólico con los valores de Hcy, y se encontraron valores de  $8,20 \pm 2,39$  y  $8,0164 \pm 3,4 \mu\text{g/l}$ , respectivamente, en las madres de los pacientes con CaCo, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

El análisis de los genotipos para los binomios madre-hijo dio como resultado 7 combinaciones, y aunque ninguna presentó diferencias entre los grupos de casos y controles, se observó una tendencia para mayor frecuencia de la combinación CT/TT entre los casos que entre los controles (OR = 2,9; IC95%, 0,98-10,87) (tabla 5).

## DISCUSIÓN

La CaCo son una de las más frecuentes causas de muerte de niños tanto en México como en otros países. Debido a la elevada

**Tabla 5**

Combinaciones genotípicas encontradas en el binomio madre-hijo con cardiopatía congénita y binomio madre-hijo control

Genotipo	Casos, n (%)	Controles, n (%)
TT/TT	3 (5)	3 (4,8)
TT/CT	11 (18,3)	9 (14,5)
CT/TT	9 (15)	4 (6,4)
CT/CT	24 (40)	28 (45,2)
CT/CC	5 (8,3)	5 (8,1)
CC/CT	6 (10)	9 (14,5)
CC/CC	2 (3,3)	4 (6,5)
Total	60 (100)	62 (100)

Casos frente a controles ( $\chi^2$ ),  $p = 0,7465$ ; error estándar = 0,014.

frecuencia del polimorfismo 677CT del gen *MTHFR* en la población mexicana respecto a otros países, fue de nuestro interés determinar principalmente el factor genético que pudiera estar asociado a las alteraciones de los procesos en el desarrollo embrionario de las CaCo.

Las frecuencias alélicas determinadas en los grupos de estudio se encuentran dentro de lo ya publicado sobre población mexicana mestiza del noroeste, el centro y el sureste de la República Mexicana<sup>15-17</sup>. El origen de nuestra población es principalmente (85%) del centro del país (Distrito Federal, Estado de México, Guanajuato, Querétaro, Morelos y Puebla). La población mestiza restante (15%) provino del oeste y el sur del país (Nayarit, Guerrero, Oaxaca y Veracruz), y en ellos se encontró una frecuencia genotípica del 22% para T/T y el 56% para el alelo T, lo que también se corresponde con lo ya publicado<sup>15-17</sup>. La evaluación inicial de las frecuencias genotípicas y alélicas en ambos grupos reveló el predominio del alelo T en los casos y en sus madres, mientras en controles prevaleció el alelo C.

El análisis estadístico que se realizó para las frecuencias genotípicas C/C, C/T, T/T entre los grupos de pacientes contra los controles, así como las frecuencias genotípicas de las madres de los sujetos de ambos grupos, no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Con lo anterior podemos decir que no se puede asociar ninguna CaCo con la presencia del polimorfismo 677CT del gen *MTHFR* en el grupo pacientes respecto de los controles y sus madres respectivas en nuestra población. El tipo de CaCo estudiadas fue heterogéneo de acuerdo con su origen embrionario, y había tanto CCS como CCC. A pesar de que las CCC más graves (en función de su alta tasa de mortalidad) no se encuentran en gran proporción en los pacientes de mayor edad, las diferencias en las frecuencias observadas por tipo de CaCo permiten establecer que, para los fines de este estudio, el tipo de cardiopatía no introduce sesgo en la modificación de dichas frecuencias.

Por lo dicho, los procesos patogénicos del desarrollo cardíaco en el grupo de pacientes, son diferentes e implican eventos celulares simultáneos con un orden cronológico en periodos cortos, lo que hace más complejo hallar una asociación en este grupo afecciones.

La hiperhomocisteinemia en la madre es un evento relacionado con la presencia de CaCo, observación respaldada por estudios en los que se halló que, de las madres de hijos con esta alteración, hasta el 46,2% tenía hiperhomocisteinemia en ayunas y sin suplementación de multivitamínicos, frente a sólo el 14,3% de las madres de los controles sanos<sup>25</sup>. Aunado a esto, se ha determinado que la hiperhomocisteinemia en las madres de estos pacientes incrementa de 2,9 a 4,4 veces el riesgo de tener un hijo con CaCo respecto a quienes no la presentan<sup>26</sup>. Uno de los elementos que determinan la elevación de la Hcy en sangre es la presencia del polimorfismo 677CT en estado homocigoto<sup>27</sup>.

En nuestro estudio se determinaron las concentraciones de Hcy en los pacientes y en sus madres, y no se encontraron diferencias entre los pacientes con genotipo C/C y con T/T. Esto indica que, al menos en la población estudiada, el genotipo homocigoto para la mutación no es determinante para establecer las concentraciones de Hcy o que la suplementación con ácido fólico tiene efecto directo en esas concentraciones, lo que finalmente no protege de sufrir la alteración cardíaca. Estos eventos se han apreciado en otras poblaciones<sup>23</sup> en las que no se ha podido relacionar la hiperhomocisteinemia asociada al polimorfismo 677CT con la presencia de CaCo. Sin embargo, la diferencia en las cifras de Hcy entre los pacientes con genotipos CC y con TT fue cercana al límite de significación ( $p = 0,06$ ), por lo que se debe confirmar o descartar este hallazgo en particular.

Aunque la combinación genotípica CT/TT del binomio madre-hijo en pacientes y controles tampoco mostró diferencias significativas entre los grupos, el valor de OR (2,9; IC95%,

0,975-10,871) hace posible que a la larga se pudiera encontrar asociación al incrementar el tamaño de la muestra. Llama la atención que en los genotipos TT/TT binomio madre-hijo con CaCo no se encontraron diferencias en las OR, probablemente porque: a) tal combinación genotípica no se encuentra asociada al tipo de cardiopatías estudiadas en este trabajo, y b) el número de casos analizados por tipo de alteración no fue suficiente para encontrar tal asociación para el análisis del genotipo del binomio madre-hijo.

Por su parte, la combinación de genotipos CT/TT (OR = 2,9) podría conferir mayor riesgo de CaCo y confirma estudios en que se ha encontrado el genotipo T/T en pacientes con la alteración<sup>7,8,18,19</sup>. Con los resultados obtenidos en este estudio, el riesgo de CaCo puede provenir de la combinación de genotipos en el binomio madre-hijo, lo cual puede aumentar las concentraciones de Hcy<sup>27</sup> en el desarrollo embrionario, con la consecuente deficiencia en la síntesis de ácidos nucleicos durante la gestación. Esto podría indicar que la conjunción del estado heterocigoto en la madre con la homocigosis T/T en el feto es un factor de riesgo de las CaCo. Esto es significativo debido a que la frecuencia alélica de T en población mestiza mexicana es de hasta el 58,5%<sup>14-16</sup>.

Entre las limitaciones del estudio, podemos mencionar que el tamaño de muestra es pequeño en la población analizada, considerando que: a) el error de tipo I que produce el tamaño de muestra pequeño aconseja confirmar estos resultados incrementándola; b) los intervalos de confianza al analizar las combinaciones genotípicas son amplios, y c) la frecuencia publicada del polimorfismo 677CT en la población general de México es la más alta del mundo. Es importante mencionar que los valores marginales de OR (2,9) y su IC95% (0,975-10,871) indican que incrementar el tamaño de la población estudiada permitiría encontrar la asociación con el fenotipo analizado. Por otro lado, las concentraciones de Hcy determinadas en los pacientes con CaCo y genotipo CC no mostraron diferencias significativas respecto a aquellos con genotipo TT, probablemente por la suplementación prenatal con ácido fólico. Sin embargo, este efecto es inevitable al considerar la naturaleza transversal del estudio.

## CONCLUSIONES

Según los hallazgos del presente estudio, no es posible establecer asociación entre el polimorfismo 677CT del gen *MTHFR* y la presencia de cardiopatías en la población mestiza mexicana. Las concentraciones de Hcy no fueron diferentes en los pacientes y sus madres según el genotipo C/C o T/T, ni tampoco en relación con la ingesta materna de ácido fólico. Es necesario desarrollar estudios semejantes con un mayor número de pacientes.

## AGRADECIMIENTOS

A los pacientes, los controles y sus madres por su apoyo para realizar este estudio. Al Instituto Nacional de Perinatología SS, por el apoyo brindado al facilitar sus instalaciones para el desarrollo experimental del trabajo.

## FINANCIACIÓN

Este estudio fue financiado por Recursos Institucionales del Laboratorio de la Subdirección de Investigación, Instituto Nacional de Perinatología (INPer), México.

**CONFLICTO DE INTERESES**

Ninguno.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Hoffman JIE, Chistianson R. Congenital heart disease in a cohort of 19,502 births with long-term follow-up. *Am J Cardiol.* 1978;42:641–7.
- Ferencz C, Neill CA, Boughman JA, Rubin JD, Brenner JJ, Perry LW. Congenital cardiovascular malformations associated with chromosome abnormalities: An epidemiologic study. *J Pediatr.* 1989;114:79–86.
- Loffredo CA. Epidemiology of cardiovascular malformations: prevalence and risk factors. *Am J Med Genet.* 2000;97:319–25.
- Dirección General de Información en Salud, Secretaría de Salud. Mortalidad preescolar. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México.* 2005;62:69–82.
- Marín-García J. Cardiología pediátrica en la era de la genómica. *Rev Esp Cardiol.* 2004;57:331–46.
- Martín M, Rodríguez I, Palacín M, Coto E. Polimorfismos de metaloproteasas y válvula aórtica bicúspide. *Rev Esp Cardiol.* 2010;63:1383–4.
- Junker R, Koththoff S, Heintich V, Halimeh S, Kosch A, Koch HG, et al. Infant methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype is a risk factor for congenital heart disease. *Cardiovasc Res.* 2001;51:251–4.
- Wenstrom KD, Johanning GL, Johnston KE, Dubard M. Association of the C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation and elevated homocysteine levels with congenital cardiac malformations. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184:806–17.
- Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet.* 1994;7:195–200.
- Frosst P, Blom H, Milos R. Identification of a candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995;10:111–3.
- Botto LD. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2000;151:862–77.
- Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, 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 worldwide. *J Med Genet.* 2003;40:619–25.
- Guéant-Rodríguez RM, Guéant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP, et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677TT and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr.* 2006;83:701–7.
- Mutchinick OM, López MA, Luna L, Waxman J, Babinsky VE; RYVEMCE collaborative Group. 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.
- González-Herrera L, García-Escalante G, Castillo-Zapata I, Canto-Herrera J, Pinto-Escalante D, Díaz-Rubio F, et al. Frequency of thermolabile variant defects in the State of Yucatan, Mexico. *Clin Genet.* 2002;62:394–8.
- Davalos RIP, Olivares P, Castillo MT, Cantú JM, Ibarra B, Moran MC. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Ann Genet.* 2000;43:89–92.
- Botto LD, Khoury MJ, Mulinare J, Erickson JD. Periconceptional multivitamin use and the occurrence of conotruncal heart defects: results from a population-based, case-control study. *Pediatrics.* 1996;98:911–7.
- Zhu WL, Li Y, Yan L, Dao J, Li S. Maternal and offspring MTHFR gene C677T polymorphism as predictors of congenital atrial septal defect and patent ductus arteriosus. *Mol Hum Reprod.* 2006;12:51–4.
- Kueh K, Loffredo C, Lammer EJ, Iovannisci DM, Shaw GM. Association of congenital cardiovascular malformations with 33 single nucleotide. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010;88:101–10.
- Van Beynum IM, Kapusta L, Den Heijer M, Vermeulen SHM, Kouwenberg M, Daniëls O, et al. Maternal MTHFR 677C>T is a risk factor for congenital heart defects: effect modification by periconceptional folate supplementation. *Eur Heart J.* 2006;27:981–7.
- Storti S, Vittorini S, Iacone MR, Sacchelli M, Collavoli A, Ripoli A, et al. Association between 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and conotruncal heart defects. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41:276–80.
- McBride KL, Fernbach S, Menesses A, Molinari L, Quay E, Pignatelli R, et al. A family-based association study of congenital left-sided heart malformations and 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2004;70:825–30.
- Verkleij-Hagoort A, Bliëk J, Sayed-Tabataebaei 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.* 2007;143A:952–60.
- Blanco Muñoz J, Lacasaña M, García Cavazos R, Borja-Aburto VH, Galaviz-Hernández C, Aguilar Garduño C. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and the risk of anencephaly in Mexico. *Mol Hum Reprod.* 2007;13:419–24.
- Kapusta L, Haagmans MLM, Steegers EAP, Cuypers MHM, Blom HJ, Eskes TKAB. Congenital heart defects and maternal derangement of metabolism. *J Pediatr.* 1999;135:773–4.
- Verkleij-Hagoort AC, Verlinde M, Ursem N, Lindemans J, Helbing WA, Ottenkamp J, et al. Maternal hyperhomocysteinemia is a risk factor for congenital heart disease. *BJOG.* 2006;113:1412–8.
- Blom HJ. Genetic determinants of hyperhomocysteinemia: the roles of cystathionine beta-synthase and 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase. *Eur J Pediatr.* 2000;159:S208–12.