



TEMA 1-2021:

Variación alélica del polimorfismo Metilentetrahidrofolato reductasa c677t y factores de riesgo cardiovasculares en población de Santa Ana, El Salvador

Allelic variation of the polymorphism Metilentetrahidrofolato reductase c677t and cardiovascular risk factors in the population of Santa Ana, El Salvador

Recibido: 25/01/2019

Aceptado: 07/09/2022

¹ Acosta Martínez A.

² Santos Mayorga O.

¹ Departamento de Investigación, Universidad Autónoma de Santa Ana, Km 63 ½ autopista Sur, Santa Ana, El Salvador. Correo: investigador2@unasa.edu.sv

² Departamento de Investigación, Universidad Autónoma de Santa Ana, Km 63 ½ autopista Sur, Santa Ana, El Salvador. Correo: investigador2@unasa.edu.sv

Resumen

Abstract

El polimorfismo C677T en el gen de la 5, 10 metilentetrahidrofolato reductasa fue analizado usando la técnica de PCR-RFLP en 132 individuos entre los 20 y 59 años de edad sin parentesco en la ciudad de Santa Ana, El Salvador; a cada participante se le realizó una evaluación odontológica, entrevista médica y exámenes clínicos de Triglicéridos, colesterol y glucosa. Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron 677: TT=0.22, CT=0.59, CC=0.19. La frecuencia de la obesidad en la población es el riesgo cardiovascular modificable más recurrente. Comparando las frecuencias alélicas y genotípicas entre la población con factores de riesgo tradicionales como colesterol, triglicéridos, glucosa, IMC no encontramos diferencias estadísticamente significativas para la prueba de Kruskal-Wallis. Los antecedentes familiares más frecuentes fueron hipertensión arterial 0.47, diabetes Mellitus 0.44. Además, el 0.62 de la población en estudio fue clasificada con periodontitis que fue considerada como un factor de riesgo no tradicional cardiovascular por su acción inflamatoria y aumento del fibrinógeno sanguíneo.

The C677T polymorphism in the 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase gene was analyzed using the PCR-RFLP in 132 between 20 and 59 years old in the city of Santa Ana, El Salvador. In addition, he performed a dental evaluation, medical interview and clinical tests of triglycerides, cholesterol and glucose. The allelic and genotypic frequencies were 677: TT = 0.22, CT = 0.59, CC = 0.19. The frequency of obesity in the population is the most recurrent modifiable cardiovascular risk. Comparing the allelic and genotypic frequencies among the population with traditional risk factors such as cholesterol, triglycerides, glucose, BMI, we found no statistically significant differences for the Kruskal-Wallis test. The most frequent family history was arterial hypertension 0.47, diabetes mellitus 0.44. The 0.62 of the study population was classified with periodontitis that was considered in the study as a non-traditional cardiovascular risk factor for its inflammatory action and increase in blood fibrinogen.

Palabras claves:

C677T, Metilentetrahidrofolato reductasa, Factores de riesgo cardiovasculares.

Keywords:

C677T, Methylenetetrahydrofolate reductase, Cardiovascular risk factors.

Introducción

El gen de la Metilentetrahidrofolato reductasa se encuentra en la posición cromosomal 1p36.22 en la cual se han identificado varios tipos de cambios, algunos de las cuales no presentan repercusiones en el funcionamiento metabólico de la enzima, el polimorfismo C677T representa un cambio de significado (missense), que produce la codificación de un codón (tripleto de nucleótido) diferente, el cual genera un aminoácido diferente para la composición de la proteína funcional. El interés por el gen de la Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y la variante polimórfica de la posición 677 (ALA222VAL) es conocer la frecuencia poblacional por su posible relación en la predisposición de enfermedades cardiovasculares cuando se analiza conjuntamente con otros polimorfismos o bien con alguna condición médica adyacente, ya que difícilmente un solo polimorfismo puede explicar una enfermedad compleja.

El cambio C677T ha sido relacionado con la elevación de la homocisteína, por lo que se ha definido que en pacientes con homocistinuria debido a deficiencia de MTHFR se elevan los niveles plasmáticos de proteínas unidas a la homocisteína, incluido el fibrinógeno protrombótico ⁽¹⁾.

La MTHFR se encarga del reciclaje de la homocisteína a metionina en el portador del polimorfismo la reacción es lenta porque la enzima es termolábil, y por tanto menos eficiente, se acumula homocisteína en el organismo siendo un marcador de riesgo cardiovascular pacientes ^{(1) (2)}.

Frecuencia alélica:

Diferentes investigaciones sugieren que la distribución de la genética poblacional es importante incluso desde el punto de vista étnico, en un estudio de 101 caucásicos y 102 afroamericanos, se encontró que la frecuencia homocigota para la forma termolábil, 677T, era de 0,06 en caucásicos y de 0,02 en afroamericanos la más baja reportada en la región americana, mientras que en Latinoamérica la frecuencia del polimorfismo es claramente mayor (Tabla 1).

■ **Tabla 1:** Cuadro de clasificación sintomatológica de la enfermedad vascular periférica

País	n	CC (Frecuencia)	CT (Frecuencia)	TT (Frecuencia)	Ref
Ref	49	0,980	0,020	0,000	3
Estados Unidos (afroamericanos)	185	0,821	0,156	0,065	4
Estados Unidos (caucásicos)	307	0,485	0,450	0,065	5
Brazil	111	0,369	0,478	0,153	6
México	631	0,337	0,419	0,244	7
Colombia	150	0,280	0,467	0,253	8
Italia	236	0,292	0,479	0,229	9
Francia	133	0,375	0,526	0,098	4
Japón	778	0,434	0,464	0,015	4
China	398	0,163	0,525	0,312	10

Fuentes: distribución de variación alélica del polimorfismo C677T.

Las investigaciones de la frecuencia polimórfica, han desarrollado una metodología de investigación por asociación con las patologías cardiovasculares como; accidente cerebrovascular isquémico, isquemia cardiaca y trombosis venosa, esto debido a su asociación de implicancia con los factores de coagulación con la perdida recurrente de embarazos, de ser establecida una frecuencia elevada del polimorfismo genético, también puede relacionarse con la alta frecuencia de este tipo de enfermedades (Tabla 2).

■ **Tabla 2:** Estudios relacionados con el polimorfismo C677T y manifestaciones clínicas.

Patología	Población en estudio		Genotipo	Odds ratios	Referencia
	Casos	Controles		(95% CI)	
ACV isquémico	1533	2786	T VS C	1.46 (1,19-1,79)	11
Isquemia cardiaca	12193	11945	TT vs CC	1.21 (1,06-1,39)	12,13
La trombosis venosa profunda	8364	12468	TT vs CC	1.20 (1,08-1,32)	14
Pérdida recurrente de embarazos	2120	2949	CC vs TT	1.40 (1,11-1,77)	15

Fuente: Estudios de comparación de distribución de variaciones alélicas en pacientes con manifestaciones clínicas.

Materiales y métodos:

Esta fue una investigación de tipo descriptivo con diseño transversal que se realizó de junio 2017 a marzo del 2018, en la cual se determinó la variación alélica del polimorfismo C677T y factores de riesgo cardiovascular en población de Santa Ana, El Salvador, la muestra estuvo constituida por 132 voluntarios, 95 mujeres y 37 hombres los cuales fueron seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión: originarias del departamento de Santa Ana, mayores de 20 años de edad aparentemente sanos, no consanguíneos con otro participante, con el consentimiento informado aprobado por el comité de ética de la Universidad Autónoma de Santa Ana.

A los participantes se les extrajo una muestra de sangre que se obtuvo por venopunción que consto de dos tubos uno para muestras clínicas y otro para extracción de ADN, los datos de factores de riesgo cardiovascular, fueron obtenidos mediante una entrevista y examen clínico. Posteriormente el ADN se obtuvo mediante un proceso de extracción y purificación usando la técnica de columnas gel, con el kit de invitrogen purelink genomic DNA siguiendo el protocolo establecido por el fabricante y almacenada a - 20° C hasta su procesamiento que no excedió los 6 meses. El análisis del polimorfismo se realizó la amplificación del ADN por PCR de un fragmento del gen que codifica para la MTHFR humana sobre el que se detecta la presencia o ausencia

Se realizó la carga 20 ul de cada producto de amplificación digerido y del marcador de peso molecular en gel de agarosa al 2% preteñido con Red gel (20 ug/ml). de un cambio de base mediante digestión con una enzima de restricción (RFLP), con el uso del kit MTHFR C677T para investigación ATGen (Reg. MSP 1734).

La amplificación de ADN se llevó a cabo siguiendo los protocolos del fabricante ATGen como se describen a continuación: mezcla de reacción 18 ug/ml se le agregó 2 ug/ml de taq polimerasa y 2 ug/ml de ADN el cual se procesó en un Termociclador marca Lanet; 30 ciclos de 94 °C/0:30', 59 °C/0:30', 72 °C/0:30' con una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94 °C y una extensión final de 3 minutos a 72 °C. El producto amplificado fue 225 pb el cual fue testeado en una agarosa al 2%, posteriormente se sometió a digestión con la enzima HinfI a una temperatura de 37 °C por toda la noche y finalmente a 10 minutos a 65 °C, se contó con un control positivo y negativo provisto por el fabricante para el control de las reacciones, el cual podría identificar el producto digerido y no digerido, los resultados esperados fueron 203 pb alelo normal y 180 pb alelo mutado.

Posterior al protocolo se realizó la carga 20 ul de cada producto de amplificación digerido y del marcador de peso molecular en gel de agarosa al 2% preteñido con Red gel (20 ug/ml).

Se permitió su migración a 95 voltios, hasta que el colorante azul de bromofenol del buffer de carga tuvo un recorrido de 3,5 cm en la agarosa, la cual se visualizó en un equipo ENDURO GDS transiluminator a 302nm a 420 nm UV.

El protocolo de investigación fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Autónoma de Santa Ana, el cual está avalado el comité de ética nacional de investigación de salud de El Salvador, este protocolo se adhirió a los principios para las investigaciones médicas contenidos en la declaración de Helsinki, en el cual se garantizó que la participación fuera totalmente voluntaria, la cual se hace constar mediante la firma del respectivo consentimiento informado individual. El estudio respeta los principios éticos y legales recogidos por los derechos al paciente decreto 307, artículo 16 que refiere los lineamientos del Consentimiento Informado en Casos de Investigación Médica del El Salvador.

Resultados

De las 132 muestras validadas para el estudio, 110 fueron menores a los 50 años de edad (83.3%) siendo en su mayoría mujeres (72%) las participantes del estudio, dato que no afecta la finalidad del estudio.

El 55% de los participantes no tenía ningún historial clínico de antecedente personal considerado como riesgo cardiovascular, cabe destacar que se puede considerar la frecuencia del colesterol y triglicéridos altos como marcador de riesgo en un 26% de los participantes, la hipertensión arterial (16%) también es uno de los antecedentes con mayor frecuencia, es interesante valorar que la media de los resultados de la química sanguínea es de 207 mg/dl para colesterol, 200 mg/dl para triglicéridos lo cual es considerado un factor de riesgo cardiovascular, también la media de glucosa presente en la población estudiada fue de 105 mg/dl, ninguno de los datos mencionados presentaron diferencias entre hombres y mujeres (Tabla 3).

■ **Tabla 3:** Índices determinantes de riesgo cardiovascular en la población

Variable	Hombre	Mujer	Total	Mínimo	Máximo
Glucosa	113 ± 45	101 ± 33	105 ± 37	53	280
colesterol	213 ± 56	204 ± 52	207 ± 53	102	363
Triglicéridos	269 ± 335	173 ± 160	200 ± 226	30	1840*
Presión arterial sistólica	118 ± 16	116 ± 12	117 ± 13	--	--
Presión arterial diastólica	78 ± 10	75 ± 9	76 ± 9	--	--
IMC	27.6 ± 5.7	29.9 ± 5.6	29.3 ± 5.7	--	--

MC: índice de masa corporal.

*valor controlado

Fuente: Exámenes clínicos y métricos realizados a los asistentes a la investigación.

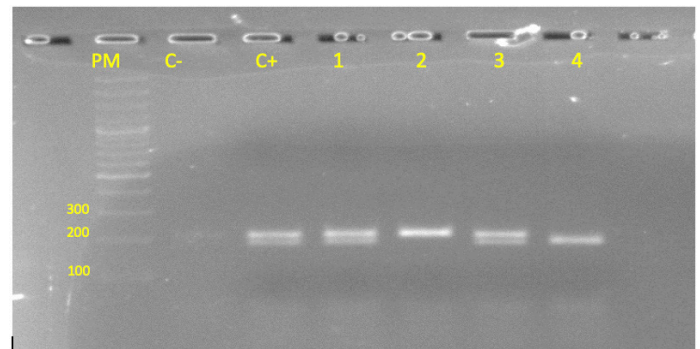
La medición de los Índices de masa corporal (IMC) en los sujetos de estudio, estableció que la población estudiada presentaba índices de masa corporal superiores a los considerados normales (<25), (Sobrepeso >25 H=0.49, M= 0.34) (Obesidad >30 0.24 0.47) lo cual es un indicador de problemas de alimentación, así como de estilo de vida sedentarios y los cuales son factores de riesgo modificables que aumenta el pronóstico de padecer una enfermedad cardiovascular. El porcentaje de obesidad en las mujeres es mayor con respecto al encontrado en el sexo masculino (47% vs 24%), en su totalidad solo un bajo porcentaje de la población total (21%) se encuentra dentro de lo considerado como normopeso.

La frecuencia alélica fue determinada en frecuencias y porcentajes, a través de la fórmula siguiente:

$$Frecuencia\ alélica = \frac{n^\circ\ alelos\ (a)}{n^\circ\ total\ de\ alelos\ (a + A)} \times 100$$

La variante alélica del polimorfismo C677T fue encontrada de forma homocigota con una frecuencia del 0.22, mientras que el porcentaje del alelo T en la población estudiada es del 52% (Tabla 4) (Figura 1)

Figura 1 - separación de fragmentos de biología molecular



Las bandas 203 pb para producto normal, y 180 pb para producto mutado, el control positivo proporcionado por el fabricante indica la forma heterocigoto de los alelos. PM: peso molecular, C-: control negativo; C+: control positivo; 1 – 4: muestras.

Fuente: resultados de corrida por PCR punto final, imagen tomada con transiluminador ENDURO™ GDS Gel.

■ **Tabla 4:** Distribución genotípica y frecuencia alélica del polimorfismo C677T en población aparentemente sana

Genotipo	n =132	Frecuencia
677 TT	29	0.22
677 CT	78	0.59
677 CC	25	0.19
Frecuencia alélica de C (%)	n=128*	48%
Frecuencia alélica de T (%)	n=136*	52%
Genotipos	Observados	Esperados
CC	25	30.3
CT	75	64.4
TT	29	34.3
EHW	132	0.063*

Equilibrio de Hardy-Weinberg EHW ($r > 0,05$).

677 TT: homocigoto mutado; 677 CT: heterocigoto; 677 CC: homocigoto normal. *Total de alelos.

Fuente: Resultados de PCR punto final representada con la distribución alélica obtenida.

Se realizó una subdivisión de muestras según las edades de los participantes para realizar un análisis de los genotipos obtenidos, comparando las frecuencias esperadas y las observadas mediante el equilibrio de Hardy-Weinberg. Estas comparaciones se realizaron valorando las frecuencias de los genotipos y la frecuencia porcentual del alelo T, En las cuales se encuentran diferencias en el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$), encontrándose un exceso de los heterocigotos observados con relación a los esperados, las muestras menores a 59 años se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg lo que sugiere que no existe ninguna fuerza de selección poblacional en el grupo investigado, cuando la muestra se analiza de forma grupal, la muestra se encuentra en desequilibrio.

Discusión:

La frecuencia de los genotipos de la MTHFR 677 se distribuye similarmente en toda Latinoamérica, con las frecuencias más altas México y en África más bajas del alelo T, en comparación con la frecuencia encontrada en esta investigación (0.22) es muy cercana a las reportadas en los países latinoamericanos de México y

población colombiana, y muy distante de la población de caucásicos en los Estados Unidos de América, Europa, India y África, lo que comprueba que las distintas frecuencias encontradas en Etnias son diferentes.

Sin embargo, la alta frecuencia del alelo T parece tener explicación en lo que detallan algunos investigadores, quienes lo han explicado como parte de la suplementación de ácido fólico y hierro, con lo que disminuyó la influencia de la variante por su línea directa con los folatos, lo que puede propiciar que este polimorfismo no tenga repercusión selectiva dentro de nuestro entorno, por lo que sí es posible esta intervención, se puede deducir que el mejoramiento de las condiciones nutricionales interfiere directamente en la salud y tiene un abordaje desde la perspectiva molecular que se puede investigar en la historia evolutiva de la región latinoamericana, la cual sería conveniente abordar ya que aún existen comunidades indígenas y aisladas que no han sido parte de estas intervenciones.

Con respecto a los resultados los porcentajes del

homocigoto T (22%) y alelo T (52%) son también semejantes a las frecuencias más altas reportadas del polimorfismo MTHFR C677T en México y Colombia.

El alelo T parece estar sometido a una presión de selección positiva dentro de la población, dado su alto porcentaje podría explicarse por la suplementación con ácido fólico y otros folatos incluidos hace ya algunas décadas en los granos básicos que consume la población en general, aunque la población mayor de 50 años es escasa y solo conto con 22 participantes, esta población se encuentra en equilibrio y no presenta la condición selectiva del alelo T, lo cual sería interesante medir en población mayor o en población indígena de la zona, de esta manera poder evaluar si la suplementación tiene una incidencia en la elevación del alelo T en la población general.

En cuanto a los factores de riesgo cardiovascular modificables, se puede evidenciar una elevada frecuencia de sobrepeso tanto en hombres como en mujeres, aunque las personas que participaron del sexo femenino tienen índices más altos de obesidad, los perfiles de alimentación analizados en base a la entrevista clínica sugieren ingesta baja en calorías y la valoración de los participantes en cuanto a llevar un estilo de vida sedentaria es baja, lo cual resultan contradictorios, esto se podría explicar como la falta de información que poseen las personas sobre los alimentos que consideran saludables, así como también lo que consideran actividad física necesaria para llevar una vida saludable, factores que sin duda condicionan la salud cardiovascular, por el alto contenido de alimentos procesados que han ingresado en el mercado en los últimos años, factor que hace unos 40 años no era considerado.

El diseño de esta investigación permitió describir la frecuencia del polimorfismo MTHFR C677T en la población aparentemente sana y los factores de riesgo cardiovascular más frecuentes en dicha población, esta investigación aporta datos nacionales que pueden ser comparables con las cifras reportadas en estudios anteriores de frecuencia alélica en población latinoamericana y diferenciales según al relacionarlos con datos registrados en etnias distintas como las caucásicas y afroamericanas.

La frecuencia del genotipo TT sugiere que el valor predictivo hacia algunas enfermedades es escaso, por

o que algunos de los test comerciales que se están ofreciendo a poblacional general en los últimos años, que cuentan con tres o cuatro polimorfismos que incluyen el C677T de la MTFHR como valor predictivo debe considerarse como poco probable y no debe de ser utilizado desde el punto de vista comercial del personal de salud sin una valoración del costo beneficio para el paciente.

Declaración de conflictos de interés

No existe conflicto de intereses por parte de los investigadores de este proyecto.

Bibliografía

1. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom a G, Chen Z, Curtis Ellison R, et al. The 1298A-->C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis*. 2001;156(2):409-15.
2. OMIM-603174- HOMOCYSTEINEMIA [Internet]. Omim.org. 2018; [citado 15 diciembre 2018]
3. Alluri RV, Mohan V, Komandur S, Chawda K, Chaudhuri JR, Hasan Q. MTHFR C677T gene mutation as a risk factor for arterial stroke: a hospital based study. *Eur J Neurol*. 2005; 12(1): 40–4.
4. Botto LD, Yang Q. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2000; 151: 862–77
5. Li D, Ahmed M, Li Y, Jiao L, Chou T, Wolff RA, et al. 5,10 - methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and the risk of pancreatic cancer and the risk of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14: 1470–6.
6. Santos KG, Tschiedel B, Schneider J, Souto K, Roisenberg I. Diabetic retinopathy in Euro-Brazilian type 2 diabetic patients: relationship with polymorphisms in the aldose reductase, the plasminogen activator inhibitor-1 and the methylenetetrahydrofolate reductase genes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2003; 61: 133–6.
7. Lacasaña-Navarro M, Galván-Portillo M, Chen J, López-Cervantes M, López-Carrillo L. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphism and gastric cancer susceptibility in Mexico. *Eur J Cancer*. 2006; 42: 528–33
8. Camacho Vanegas O, Giusti B, Restrepo Fernandez CM, Abbate R, Pepe G. Frequency of factor V (FV) Leiden and C677T methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations in Colombians. *Thromb and Haemost*. 1998; 79: 883-4.
9. Fabris C, Toniutto P, Falleti E, Fontanini E, Cussigh A, Bitetto D, et al. MTHFR C677T polymorphism and risk of HCC in patients with liver cirrhosis: role of male gender and alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009; 33: 102–7.
9. Fabris C, Toniutto P, Falleti E, Fontanini E, Cussigh A, Bitetto D, et al. MTHFR C677T polymorphism and risk of HCC in patients with liver cirrhosis: role of male gender and alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009; 33: 102–7.
10. Golbahar J, Fathi Z, Tamadon M. Distribution of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (C667T) polymorphism and its association with red blood cell 5-methyltetrahydrofolate in the healthy Iranians. *Clin Nutr*. 2005; 24: 83–7.
11. Kim RJ, Becker RC. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies. *Am Heart J*. 2003; 146: 948–57.
12. Wu AH, Tsongalis GJ. Correlation of polymorphisms to coagulation and biochemical risk factors for cardiovascular diseases. *Am J Cardiol*. 2001; 87: 1361–6.
13. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ*. 2002; 325(7374): 1202.
14. Den Heijer M, Lewington S, Clarke R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost*. 2005; 3: 292–9.
15. Cao Y, Xu J, Zhang Z, Huang X, Zhang A, Wang J, et al. Association study between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Gene*. 2013; 514: 105–11.