

# Polimorfismo C677T del gen Metilentetrahidrofolato Reductasa como posible factor de riesgo materno para la presentación de síndrome de Down en la población guayaquileña

## *C677T Polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate Reductase gene as a possible maternal risk factor for the presentation of Down syndrome in the population of Guayaquil*

TERCER MEJOR TRABAJO DE GRADUACIÓN XLVI PROMOCIÓN DE MÉDICOS, FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS, UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL

Andrea Miranda Mendizábal<sup>1</sup>, Xavier Landívar Varas<sup>2</sup>, Cecibel Ramírez Morán<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Facultad de Ciencias Médicas, Guayaquil, Ecuador

<sup>2</sup> Instituto de Biomedicina, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Ecuador.

### RESUMEN

**Objetivo:** evaluar la presencia del polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR como posible factor de riesgo materno para la presentación de síndrome de Down, en la población guayaquileña. **Metodología:** se realizó un estudio de casos y control que incluyó 51 madres de niños o niñas con síndrome de Down y 52 mujeres que tuvieron en su último embarazo un producto de cualquier sexo sano. Se recolectaron muestras de sangre venosa periférica entre los meses de diciembre 2010 y mayo 2011 posterior a lo que se realizó extracción de ADN y genotipificación del polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR. Para el análisis estadístico se utilizó Chi cuadrado de Pearson ( $X^2$ ), odds ratio (OR) con intervalo de confianza de 95% (95%IC). Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos. **Resultados:** se incluyeron 51 mujeres madres de hijos/as con síndrome de Down y 52 madres control. La frecuencia del alelo T fue mayor en el grupo casos ( $X^2=0.944$ ,  $p=0.331$ ). En el análisis simultáneo de las variantes genotípicas heterocigota y homocigota del gen MTHFR 677 (CT y TT) en los grupos casos y control, no se observó aumento de riesgo para el síndrome (OR=0.87 [IC 95% 0.34 – 2.20];  $p=0.772$ ). **Conclusión:** no se encontró relación entre la presencia del polimorfismo C677T MTHFR y aumento en el riesgo materno para síndrome de Down. Es necesario realizar mayores investigaciones en la población ecuatoriana en general que determinen la asociación de diversos polimorfismos en diferentes genes.

**Palabras clave:** Síndrome de Down. Polimorfismo Genético. Ácido Fólico.

### ABSTRACT

**Aim:** to assess the presence of the C677T polymorphism of the MTHFR gene as a possible maternal risk factor for Down syndrome in the population of Guayaquil. **Methodology:** a case study and control research involving 51 mothers of boys and girls with Down syndrome and 52 women who delivered a healthy offspring of either sex in their last pregnancy. Venous blood samples were collected in the months of December 2010 and May 2011 after that, a DNA extraction and genotyping of the C677T polymorphism of the MTHFR gene were performed. Pearson's Chi-squared test ( $X^2$ ), and odds Ratio (OR) with confidence interval of 95% (95% CI) were used for the statistical analysis. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. **Results:** 51 women mothers of sons / daughters with Down syndrome and 52 control mothers were included. The T-allele frequency was higher in the cases ( $X^2=0.944$ ,  $p:0.331$ ). In the simultaneous analysis of heterozygous and homozygous genotype variant of MTHFR 667 (CT and TT) in the case and control groups, no risk increase for the syndrome (OR=0.87 [IC 95% 0.34 – 2.20];  $p=0.772$ ) was observed. **Conclusion:** no relationship was found between the presence of MTHFR C677T polymorphism and increased maternal risk for Down syndrome. It is necessary to perform further research on the general Ecuadorian population to determine the association of various polymorphisms in different genes.

**Keywords:** Down syndrome. Genetic Polymorphism. Folic Acid.

Correspondencia a:

Md. Andrea Miranda Mendizábal

Correo electrónico: [amic\\_15@hotmail.com](mailto:amic_15@hotmail.com)

Recibido: 01 de marzo de 2012

Aceptado: 10 de mayo de 2012

## Introducción

El síndrome de Down es una condición genética que se produce a consecuencia de la presencia y expresión simultánea de tres copias del cromosoma 21, se considera que el producto de 1 de cada 150 embarazos lo presenta, de éstos el 80% terminan en aborto espontáneo.<sup>1</sup> Debido a este alto porcentaje de abortos, solo se observa el síndrome en 1 de cada 600 a 1000 nacidos vivos; siendo ésta la causa de retraso mental de origen genético más común.<sup>1-3</sup>

Un factor de riesgo bien establecido para el síndrome de Down es la edad de la mujer por encima de los 35 años al momento de la concepción; entre otros factores se encuentran las alteraciones en la microcirculación, el tabaquismo materno y el uso de contraceptivos orales.<sup>4,5</sup> Actualmente se considera que el déficit de folatos, junto a la presencia y asociación de diferentes polimorfismos en los genes encargados de su metabolismo podrían aumentar también dicho riesgo.<sup>6-8</sup> Existen muchos genes involucrados en el metabolismo de los folatos, uno de ellos es el de la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), diversos estudios reportan la asociación de diferentes polimorfismos de este gen y un aumento en el riesgo materno de tener hijos con síndrome de Down.<sup>2,9,10</sup>

Investigaciones realizadas en diferentes poblaciones han demostrado que la manifestación del polimorfismo C677T en el gen MTHFR aumenta el riesgo<sup>2,6,7, 11,12</sup>, resultado que difiere de otros estudios en donde no se observa esta asociación.<sup>13-15</sup> En caso de que ésta exista, se considera que el consumo de suplementos de ácido fólico en el periodo pre, peri y posconcepcional, ayudaría a disminuir el riesgo y la frecuencia de aparición de este síndrome.<sup>9,16</sup> En la población ecuatoriana no se ha llevado a cabo investigaciones de este tipo, por lo que no se conoce si dicho polimorfismo pueden considerarse como un factor de riesgo materno para esta condición genética, permitiendo establecer políticas de prevención que disminuyan la prevalencia del síndrome de Down en el Ecuador.

Este estudio se realizó para evaluar la presencia del polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR como posible factor de riesgo materno para la presentación de síndrome de Down, en la población guayaquileña.

## Metodología

Se realizó un estudio de casos y control en el periodo comprendido entre los meses de abril 2010 – mayo 2011, en el cual las participantes del grupo control fueron mujeres voluntarias atendidas en el hospital “Dr. Teodoro Maldonado Carbo” de la ciudad de Guayaquil, que tuvieron en su último embarazo un producto de cualquier sexo sano. El grupo de los casos comprendía mujeres voluntarias madres de niños o niñas con síndrome de Down, que reciben estimulación temprana o instrucción primaria en la Fundación de Asistencia Sicopedagógica para Niños y Adolescentes que sufren Retraso Mental (FASINARM).

La obtención de datos se la hizo a través de una entrevista con cada una de las madres, en la cual los investigadores informaron acerca del estudio y entregaron un documento escrito con el mismo propósito. De ambos grupos se obtuvo información acerca de antecedentes patológicos familiares, ginecobstétricos y neonatales, debidamente registrados en una hoja de recolección de datos.

Las variables estudiadas fueron: consumo de ácido fólico preconcepcional definido como la ingesta de suplementos de ácido fólico en dosis diaria de 400 µg o más durante mínimo tres meses previo al embarazo, consumo de ácido fólico durante el embarazo definido como ingesta de suplementos de ácido fólico en dosis diaria de 1 mg o más durante un periodo mínimo de tres meses consecutivos, antecedentes familiares de personas con síndrome de Down considerados como positivos cuando existe relación hasta de tercer grado de consanguinidad con el niño o niña afectado con dicha condición genética, antecedentes de amenaza de aborto y abortos espontáneos, presencia del polimorfismo C677T del gen MTHFR en su forma homocigota o heterocigota.

La recolección de muestras se realizó en el periodo comprendido entre diciembre 2010 – mayo 2011 mediante punción de una vena periférica extrayendo 5 ml de sangre en un tubo con anticoagulante EDTA, en un grupo de 51 madres de hijos con síndrome de Down y 52 madres pertenecientes al grupo control. Inmediatamente después de su obtención las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta el momento de su uso.

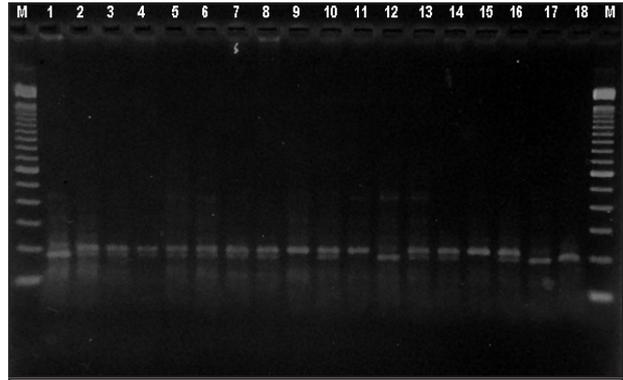
El consentimiento informado se obtuvo de todas las madres participantes. El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil.

### Análisis genético

Se realizó la extracción de ADN utilizando el KIT PureLink genomic (INVITROGEN®), se trabajó con los glóbulos blancos y posterior a esto se realizó genotipificación del polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR.

La amplificación por PCR del exón 4 del gen MTHFR se realizó en un termociclador programable para el análisis de la mutación C677T. Las secuencias de los primers de avance y retroceso fueron: 5'TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA'3 y 5'AGGACGGTGCGGTGAGAGTG'3, respectivamente. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 10 microlitros. Contendían 5.62 µl de agua ultra pura, 1 µl de tampón PCR 1X, 1 µl de MgCl<sub>2</sub> (0.5 mM), 0.5 µl del primer de avance (0.5 mM) y 0.5 µl del primer de retroceso (0.5 mM), 0.08 µl de mezcla de dNTP (200 mM), 1.0 µl de ADN genómico (20 pmol) y 0.3 µl de Taq ADN polimerasa (en la generación in vitro). La mezcla se sometió a amplificación con desnaturalización inicial a 94°C durante cuatro minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 62°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 40 segundos.

Los primers utilizados están diseñados para generar un producto amplificado de 198 pares de bases (pb), el cual se sometió a digestión con la enzima de restricción HinfI a 37°C durante 24 horas, la cual reconoce el sitio de restricción creado por la transición C>T en la posición 677. El alelo con la variante polimórfica T se corta (+) en dos fragmentos, uno de 175 y otro de 23 pb y el alelo normal (C) no se corta (-). El producto digerido se caracterizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%, y se visualizó utilizando la tinción de bromuro de etidio. El genotipo homocigoto CC se definió como la presencia de una sola banda de 198 pb, homocigoto TT cuando se visualizó una banda de 175 pb y heterocigoto CT para el polimorfismo cuando se observaron fragmentos de 198 y 175 pb; la banda de 23 pb se sale del gel (figura 1).



**Figura 1.** Imagen de un gel de agarosa al 3% del producto de digestión con la enzima HinfI, en un grupo de muestras analizadas. M: marcador de peso molecular 100pb. 10: control positivo CT (heterocigoto 677C/677T) para el corte de la enzima HinfI genera una banda de 198 pb, una de 175 pb, la banda de 23pb no se evidencia en el gel. 9, 11, 15: (homocigoto 677C/677C) no es cortada genera un fragmento de 198pb. 12, 17, 18: (homocigoto 677T/677T) es cortado genera una banda de 175pb, la banda de 23 pb no se evidencia en el gel. 1-8, 13, 14, 16: (heterocigoto 677C/677T).

### Análisis estadístico

A partir de los genotipos obtenidos se calcularon las frecuencias alélicas para el grupo estudio y control, en este último se verificó el ajuste al modelo de Equilibrio de Hardy Weinberg. Se tomó en cuenta la edad materna al momento del nacimiento de un niño sano o con síndrome de Down, consumo de ácido fólico pre y posconcepcional y la interacción de todas las variables.

Para calcular la diferencia de los genotipos y frecuencias alélicas entre el grupo estudiado y control se utilizó el estadístico Chi cuadrado de Pearson ( $X^2$ ), cuando las frecuencias esperadas se encontraron por debajo de cinco se utilizó test exacto de Fisher.

Para establecer la relación entre la presencia del alelo T en el polimorfismo C677T en el gen de la MTHFR y el incremento de riesgo materno de síndrome de Down, se compararon las frecuencias de los genotipos con la variante (CT y TT) con el genotipo normal (CC), en el grupo estudiado y el control. Se consideró estadísticamente significativos los valores de  $p$  por debajo de 0.05 ( $p < 0.05$ ). Se utilizó odds ratio con intervalo de confianza de 95% (IC=95%).

Los datos obtenidos se analizaron mediante el software IBM-SPSS versión 19.0 (Statistical Package for the Social Sciences).

## Resultados

El estudio incluyó 51 mujeres madres de hijos/as con síndrome de Down y 52 madres control, dentro del grupo de estudio la edad media al momento del nacimiento del niño/ fue 32 años (rango=16-47), 26 mujeres eran menores de 35 años (51%) y 25 se encontraron en el grupo mayor o igual a 35 años (49%) al momento del nacimiento, 15 tenían antecedentes familiares de síndrome de Down (29.4%) mientras que 36 no los refirieron (70.6%). Cuarenta y nueve mujeres (96.1%) no consumieron ácido fólico previo a la concepción, 35 (68.6%) indicaron haber ingerido ácido fólico en el periodo posconcepcional. En el grupo control, 49 mujeres tenían menos de 35 años (94.2%) y 3 formaron parte del grupo de 35 años o más (5.8%).

La tabla 1 muestra las características generales de los dos grupos.

## Frecuencias alélicas

La frecuencia del alelo MTHFR 677T fue 51.9% (53/102 alelos) en las madres del grupo casos ( $X^2=0.944$ ,  $p=0.331$ ). La frecuencia alélica MTHFR 677C>T para el grupo casos y control se encuentra enlistada en la tabla 2.

## Genotipo materno MTHFR 677CT y riesgo de síndrome de Down

Las frecuencias del genotipo MTHFR 677C>T (CC, CT y TT) en el grupo de los casos fue 12, 25 y 14 respectivamente (tabla 3). En el grupo control las frecuencias corresponden a 11, 35 y 6 de la misma manera. No se observó asociación entre la presencia de las variantes genotípicas heterocigota y homocigota del gen MTHFR 677 (CT y TT) y riesgo para síndrome de Down, en los grupos casos y control (OR=0.87 [95% IC= 0.34 - 2.20];  $p>0.05$ ).

**Tabla 1. Asociación entre factores de riesgo del grupo de madres de niños con síndrome de Down y el grupo control**

Factores de Riesgo	Casos (n=51)		Controles (n=52)		OR	95% IC	p
	n	%	n	%			
<b>Edad Materna</b>							
< 35 años	26	51.0	49	94.2	1.00		
≥ 35 años	25	49.0	3	5.8	15.71	4.33 - 56.97	0.000
<b>Abortos espontáneos</b>							
No	24	47.1	36	69.2	1.00		
Si	27	52.9	16	30.8	2.53	1.13 - 5.67	0.023
<b>Ácido fólico preconcepcional</b>							
Si	2	3.9	9	17.3	1.00		
No	49	96.1	43	82.7	5.13	1.10 - 25.05	0.028
<b>Ácido fólico postconcepcional</b>							
Si	35	68.6	39	75.0	1.00		
No	16	31.4	13	25.0	1.37	0.58 - 3.25	0.472

**Tabla 2. Frecuencias alélicas de MTHFR 677 C>T en madres de niños con síndrome de Down y madres del grupo control**

ALELO	Casos		Controles		X <sup>2</sup>	p
	n	%	n	%		
<b>C</b>	49	48.1	57	54.8		
<b>T</b>	53	51.9	47	45.8	0.944	0.331

**Tabla 3. Asociación entre el genotipo MTHFR de las madres de niños con síndrome de Down (n=51) y madres del grupo control (n=52)**

GENOTIPO	Casos		Controles		OR	95% IC	p
	n	%	n	%			
CC	12	13.3	11	21.2	1.00		
CT	25	27.8	35	67.3	0.65	0.24 - 1.72	0,39
TT	14	15.6	6	11.5	2.13	0.60 - 7.53	0,236
CT + TT	39	43.3	41	78.8	0.87	0.34 - 2.20	0,772

De la misma manera, la prevalencia del genotipo homocigoto (TT) en el grupo de los casos no fue significativa en relación al grupo control (OR=2.13 [95% IC= 0.60 - 7.53]; p=0.236) (tabla 3).

### Discusión

El síndrome de Down se presenta en 1 a 2 de cada 1000 nacidos vivos y es la anomalía cromosómica más común en los seres humanos, el único factor de riesgo comprobado para la presencia de esta condición es la edad materna avanzada, mientras que los mecanismos moleculares y bioquímicos implicados en el síndrome no han podido ser claramente establecidos hasta el momento<sup>17</sup>. Se conoce que alrededor del 95% de los casos ocurren por una no disyunción durante la meiosis I de la madre<sup>7,17</sup>, a medida que la edad materna avanza se favorece el proceso de envejecimiento del ovocito primario, que puede permanecer quiescente más de cincuenta años, provocando disrupción en el proceso celular y generando un incremento de esta anomalía cromosómica en hijos de madres mayores. Además, se ha sugerido que los efectos ambientales acumulados sobre los ovocitos primarios durante la fase de dictioteno pueden dañar la formación del huso celular y de los mecanismos reparadores, aumentando la predisposición a la no disyunción.<sup>1</sup>

Sabiendo que el síndrome de Down se presenta también en hijos de madres jóvenes y en busca de esclarecer otros factores que se encuentren implicados en esta condición, se han realizado investigaciones que establecen que alteraciones en los mecanismos de recombinación y la asociación de inestabilidad cromosómica por hipometilación del ADN, permiten que ocurran daños espontáneos a nivel cromosomal<sup>1,8,17-20</sup>, contribuyendo a la aparición del síndrome y considerando como un factor favorable el mecanismo alterado de los folatos ya

que a través de la vía metabólica de la homocisteína éstos participan tanto en la síntesis como en la metilación del ADN.<sup>1,8</sup>

El metabolismo del ácido fólico incluye una reacción que ocurre mediada por la acción de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) que transforma el metabolito 5,10 metilentetrahidrofolato en 5 metilentetrahidrofolato, esta reacción garantiza que se donen grupos metilo necesarios para la metilación de la homocisteína permitiendo la formación de metionina y de la S adenosil metionina (SAM) el mayor donante de metilo intracelular.<sup>1,8</sup> Esta última transformación esta catalizada por la enzima metionina sintasa (MS o MTR), dependiente del folato y de la vitamina B12, que a su vez en otra vía convierte al 5 metilentetrahidrofolato en ácido tetrahidrofólico (THF) que corresponde a la forma biológicamente activa del ácido fólico y es utilizado para la síntesis de novo del nucleótido precursor de ADN, los niveles adecuados de vitamina B12 se mantienen por la acción de la enzima metionina sintasa reductada (MTRR). De esta manera la enzima MTHFR determina la cantidad de derivados de folato que van a ser parte de la síntesis de ADN o de los procesos de metilación celular.<sup>1,8</sup> La actividad reducida de la enzima MTHFR incrementa los requerimientos de ácido fólico para alcanzar niveles adecuados de metionina mediante la metilación de homocisteína, en ausencia de suficientes folatos hay un incremento de homocisteína y las reacciones de metilación se encuentran comprometidas.<sup>21</sup>

Uno de los primeros estudios realizado por James y colaboradores<sup>6</sup> indica que el polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR puede aumentar el riesgo materno para tener hijos con síndrome de Down, ya que ocasiona hipometilación en regiones centroméricas y pericentroméricas del ADN incrementando la posibilidad de no disyunción, además de un aumento en los niveles plasmáticos

de homocisteína en las madres de niños con esta condición.<sup>7</sup> James determinó la presencia del polimorfismo C677T del gen MTHFR en 57 mujeres madres de hijos con síndrome de Down y 50 madres control, como resultado obtuvo que la presencia del alelo T al análisis simultáneo de la forma heterocigota (CT) y homocigota (TT) del gen aumenta 2.6 veces el riesgo de tener un hijo con síndrome de Down (95%IC=1.2-5.8;  $p<0.03$ ); en el análisis individual del genotipo heterocigoto (CT) se obtuvo OR=2.5 (95%IC=1.0-5.7;  $p<0.04$ ) y en el genotipo homocigoto (TT) OR=3.2 (95%IC=0.8-12.5;  $p<0.10$ ). En el grupo de los casos los niveles de homocisteína plasmática se encontraron elevados indicando una alteración en el metabolismo de los folatos de estas mujeres.<sup>6</sup> De igual forma otros estudios respaldan esta afirmación<sup>2,18,22</sup> (tabla 4).

Si bien el polimorfismo C677T MTHFR fue el primero en ser estudiado, se conoce que son varios los genes implicados en el metabolismo de los folatos y que diferentes polimorfismos pueden estar implicados, en el año 2005 Acácio y colaboradores<sup>11</sup> llevaron a cabo un estudio en 70 madres controles e igual número de casos para determinar la frecuencia de los polimorfismos C677T y A1298C del gen MTHFR y verificar si su presencia está asociada con un aumento en el riesgo de síndrome de Down, este segundo polimorfismo causa la sustitución de adenosina por citocina en la posición 1298 del gen que a su

vez origina el cambio de glutamato por alanina en la enzima MTHFR alterando su función.<sup>17</sup> Los análisis del estudio de Acácio mostraron que el genotipo heterocigoto en las dos posiciones (677 y 1298) fue significativamente más frecuente en los casos (27.1%) frente a los controles (5.7%) OR=5.7 (95%IC 1.73-18.83;  $p<0.0131$ ) concluyendo que la presencia concomitante de dichos polimorfismos está asociada a un aumento en el riesgo para el síndrome<sup>11</sup>; en el mismo año da Silva y colaboradores encuentran resultados similares.<sup>23</sup> En el año 2009, en India Cyril y colaboradores<sup>24</sup> encontraron asociación entre la presencia simultánea de los polimorfismos MTHFR C677T y A1298C y aumento del riesgo para síndrome de Down respaldando la información publicada previamente. Más tarde, Brandalize y colaboradores<sup>12</sup> en el 2009 mediante un estudio de 239 casos y 197 mujeres control, muestra que la presencia simultánea del genotipo 677CT o TT y 1298AA incrementa el riesgo de tener un niño con síndrome de Down cuando la edad materna se encuentra por debajo de los 35 años OR=1.99 (95%IC= 1.11-3.55;  $p=0.02$ ).

Los resultados del presente estudio no respaldan las hipótesis propuestas previamente, de acuerdo a los análisis, no existe asociación entre la presencia del polimorfismo C677T del gen MTHFR y el incremento en el riesgo materno para síndrome de Down. Un dato estadísticamente significativo encontrado en este estudio es la elevada tasa de

**Tabla4. Asociación entre polimorfismos C677T MTHFR, A1298C MTHFR y A66G MTRR y riesgo para síndrome de Down**

Año	Estudio	SD casos (n)	Control (n)	MTHFR C677T <sup>a</sup>	MTHFR A1298C <sup>a</sup>	MTRR A66G <sup>a</sup>	Combinación <sup>a</sup>
1999	James <sup>(6)</sup> (EEUU)	57	50	2.6 (1.2-5.8)	NR	NR	NR
2000	Hobbs <sup>(21)</sup> (EEUU)	157	140	1.9 (1.2-3.0)	NR	2.6 (1.3-5.0)	4.1 (1.9-5.0)
2002	O'Leary <sup>(18)</sup> (Irlanda)	48	192	1.1 (0.6-2.2)	NR	10.5 (1.4-78.6)	3.0 (1.2-7.5)
2002	Chadefaux-Vekemans <sup>(14)</sup> (Francia)	85	107	0.5 (0.2-1.3)	NR	NR	NR
2002	Grillo <sup>(22)</sup> (Brasil)	36	200	1.6 (0.4-5.5)	NR	NR	NR
2002	Stuppia <sup>(15)</sup> (Italia)	64	112	0.9 (0.4-1.9)	NR	NR	NR
2003	Bosco <sup>(22)</sup> (Italia)	92	140	$P>0.05$	NR	5.0 (1.1-24.1)	NR
2004	Boduroglu <sup>(17)</sup> (Turquía)	152	91	2.5 (0.7-9.2)	0.72 (0.40-1.30)	NR	0.92 (0.34-2.5)
2005	DaSilva <sup>(23)</sup> (Brasil)	154	158	2.3 (0.9-5.7)	NR	1.2 (0.8-2.1)	NR
2005	Chango <sup>(22)</sup> (Francia)	119	119	$P=0.51$	$P=0.51$	$P=0.75$	$P=0.64 / P=0.99$
2005	Acácio <sup>(11)</sup> (Brasil)	70	88	0.83 (0.23-3.01)	1.0 (0.41-2.46)	NR	5.7 (1.7-18.8)
2006	Coppede <sup>(26)</sup> (Italia)	80	111	1.7 (0.7-4.1)	0.6 (0.1-2.6)	NR	3.5 (0.9-13.8) $P=0.06$
2008	Wang <sup>(16)</sup> (China)	64	70	3.8 (1.8-8.5)	NR	5.2 (1.9-14.2)	6.0 (2.06-17.50)
2008	Kohli <sup>(22)</sup> (India)	104	109	$P=0.29$	NR	NR	NR
2009	Brandalize <sup>(12)</sup> (Brasil)	239	197	1.99 (1.11-3.55)	1.4 (0.7-2.8)	NR	1.1 (0.5-2.2)
2009	Pozzi <sup>(15)</sup> (Italia)	74	184	0.8 (0.4-1.6)	NR	2.2 (1.1-4.4)	NR
2010	Cyri <sup>(24)</sup> (India)	36	60	12.64 (6.52-99.71)	1.2 (0.6-2.1)	NR	NR
2011	Miranda [Ecuador]	51	52	<b>0.87 (0.34-2.20)</b>	NR	NR	NR

a: datos de odds ratio (intervalo confianza 95%). NR: no realizado.

abortos espontáneos presente en las madres de hijos con síndrome de Down (52.9%) frente a las mujeres control (30.8%) OR=2.53 (95% IC= 1.13 – 5.67; p=0.023). Se reafirmó que la edad materna por encima de los 35 años incrementa el riesgo para la ocurrencia del síndrome OR=15.7 (95% IC= 4.33 – 56.97; p<0.001).

En este mismo sentido Chadeaux-Vekemans y colaboradores<sup>14</sup> mediante un estudio de cohorte no mostró diferencia significativa ni asociación del polimorfismo C677T MTHFR con el síndrome de Down, al analizar de forma simultánea la presencia de los genotipos CT y TT, que en las mujeres del grupo en estudio correspondió al 58% y de igual forma, en el grupo control ( $X^2=0.35$ ), Stuppia y colaboradores<sup>15</sup> en su estudio de casos y control tampoco mostró diferencia significativa entre los dos grupos incluso considerando en los casos solo a las mujeres menores de 35 años ( $X^2=3.11$ , p>0.05), además la frecuencia del alelo T era mayor en el grupo control (48.2%) en relación a los casos (44%) ( $X^2=0.6$ , p>0.2).

Resultados similares obtuvieron O'Leary y colaboradores<sup>13</sup> en cuanto al análisis del genotipo TT OR 0.55 (95% IC= 0.12-2.6; p=0.74) y de los genotipos CT y TT de forma sincrónica OR 1.13 (95% IC= 0.6-2.2; p=0.86) del polimorfismo C677T MTHFR sin demostrar asociación con aumento del riesgo; sin embargo, al asociar la forma CT o TT de dicho polimorfismo con el genotipo GG del polimorfismo 66 MTRR el riesgo de tener un niño con síndrome de Down aumenta 2.98 veces (95% IC= 1.19-7.46; p=0.02). Boduroglu y colaboradores<sup>17</sup> en un estudio de 152 casos y 91 controles no demostró relación entre la presencia paralela de los polimorfismos C677T y A1298C MTHFR y el riesgo para síndrome de Down. Chango y colaboradores<sup>25</sup> estudiaron de forma individual los polimorfismos C677T y A1298C MTHFR, A2756G MTR, A66G MTRR, 844ins68 CBS, G80A RFC-1, sin encontrar asociación con dicho síndrome, resultados similares obtuvieron los estudios de Coppèdè y colaboradores<sup>26</sup> y Kohli y colaboradores.<sup>27</sup>

En el año 2009 Pozzi y colaboradores<sup>19</sup> llevaron a cabo un estudio que incluyó 74 madres de hijos con síndrome de Down y 184 mujeres control, determinaron la presencia de los polimorfismos C677T MTHFR y A66G MTRR, en cuanto al primer

polimorfismo el genotipo TT no se asoció con aumento en el riesgo para síndrome de Down OR=1.19 (95% IC= 0.49-2.9; p=0.70) así como no se encontró relación al analizar los genotipos CT y TT simultáneamente OR 0.86 (95% IC= 0.45-1.64; p=0.65); mientras que la presencia del alelo G en la forma heterocigota u homocigota del gen MTRR fue más común en las madres de hijos con el síndrome, por lo que se concluyó que provoca aumento en el riesgo para el mismo OR=2.21 (95% IC= 1.11-4.40; p=0.02). No se estudió la asociación de los dos polimorfismos.

Actualmente no se conoce la distribución genotípica y la frecuencia alélica de cada polimorfismo en la población ecuatoriana en general; este estudio ha sido dirigido a la población guayaquileña como inicio para el desarrollo de futuras investigaciones más amplias. La distribución y frecuencia mencionadas varían de acuerdo a las zonas geográficas y características étnicas lo que puede explicar las discrepancias que existen entre los resultados de los estudios realizados en Europa, Norteamérica y Sudamérica<sup>19</sup>. Específicamente sobre la prevalencia del genotipo 677TT MTHFR se sabe que en descendientes europeos es alrededor del 10% mientras que en afro-descendientes corresponde al 1.5%<sup>12</sup>.

En cuanto a la elevada tasa de abortos espontáneos encontrada en madres de niños que presentan el síndrome, se pueden mencionar varias explicaciones; alrededor del 5% de las anomalías cromosómicas encontradas en los abortos espontáneos corresponden al síndrome de Down y el 80% de mujeres que se encuentran embarazadas y de quienes el producto posee trisomía 21, presentan interrupción espontánea del embarazo<sup>1</sup>.

Bianco y colaboradores<sup>28</sup> mostró que en los embarazos posteriores a un aborto espontáneo el riesgo de una aneuploidía fetal se incrementa en 1.51 veces, es por esto que se podría esperar que dentro del grupo en estudio, en su mayoría las mujeres, refieran historia previa de abortos espontáneos los mismos que pudieron deberse a aneuploidías fetales<sup>12</sup>.

No se encontró asociación entre el polimorfismo C677T MTHFR y aumento en el riesgo materno para síndrome de Down lo que sugiere que una mutación aislada no es suficiente para la

presentación de la alteración cromosómica, es posible que al asociar varios polimorfismos en diferentes genes el riesgo se incremente notablemente<sup>7</sup>. Además, es importante considerar la interacción multifactorial entre el genotipo y el ambiente que pueden afectar el metabolismo de los folatos, se conoce que los suplementos de ácido fólico reducen la ocurrencia y recurrencia de defectos del cierre del tubo neural<sup>29</sup>, patología relacionada etiológicamente también a mutaciones del gen MTHFR<sup>30</sup>.

De la misma manera en el caso de la trisomía 21 se puede especular que el consumo de ácido fólico preconcepcional disminuye el riesgo para la presentación de la misma manteniendo también niveles adecuados de homocisteína plasmática. Una limitación del presente estudio es la ausencia de datos acerca de los valores de homocisteína plasmática que incrementaría la sensibilidad para la detección de correlación entre el genotipo y el síndrome.

En conclusión, la búsqueda sobre los componentes bioquímicos y demás factores que favorecen la no disyunción involucrada en la trisomía 21, es de gran importancia e interés para la comunidad científica en general; este estudio demuestra que no hay relación entre la presencia del polimorfismo C677T MTHFR y el aumento en el riesgo materno para la presentación del síndrome de Down; sin embargo, es necesario realizar investigaciones con muestras de mayor tamaño, que incluyan poblaciones étnicamente diferentes, en las que se determine diferentes polimorfismos de diversos genes involucrados en las vías metabólicas de los folatos proveyendo mayor información al respecto del rol que cumplen dichas variables en el riesgo materno para la nombrada condición genética.

La importancia de éste y otros estudios posteriores, radica no solo en el conocimiento científico que pueden aportar, sino en las recomendaciones que basados en esta información se deberían realizar a mujeres en edad fértil como una política de prevención para la ocurrencia de síndrome de Down.

### Agradecimiento

Especial agradecimiento a las personas que conforman la Fundación de Asistencia Sicipedagógica

ca para Niños y Adolescentes que sufren Retraso Mental (FASINARM) quienes con su colaboración y apertura hicieron posible la realización de esta investigación.

### Referencias bibliográficas

1. Montoya JC, Satizabal JM, Vallejo FC, Garcia F, Sanchez A: Perspectiva y comprensión bioquímica del síndrome de Down. *El Hombre y la Máquina* 2008(30):118-129.
2. Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, Pogribna M, Rozen R, James SJ: Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 2000, 67(3):623-630.
3. Hernandez D, Fisher EM: Down syndrome genetics: unravelling a multifactorial disorder. *Hum Mol Genet* 1996, 5 Spec No:1411-1416.
4. Morris JK, Wald NJ, Mutton DE, Alberman E: Comparison of models of maternal age-specific risk for Down syndrome live births. *Prenat Diagn* 2003, 23(3):252-258.
5. Hassold T, Hunt P: To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2001, 2(4):280-291.
6. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, Yi P, Tafoya DL, Swenson DH, Wilson VL 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(4):495-501.
7. Patterson D: Folate metabolism and the risk of Down syndrome. *Downs Syndr Res Pract* 2008, 12(2):93-97.
8. Martinez-Frias ML: The biochemical structure and function of methylenetetrahydrofolate reductase provide the rationale to interpret the epidemiological results on the risk for infants with Down syndrome. *Am J Med Genet A* 2008, 146A(11):1477-1482.
9. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE: Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2001, 22(4):195-201.
10. Czeizel AE, Puho E: Maternal use of nutritional supplements during the first month of pregnancy and decreased risk of Down's syndrome: case-control study. *Nutrition* 2005, 21(6):698-704; discussion 774.
11. Acacio GL, Barini R, Bertuzzo CS, Couto EC, Annichino-Bizzacchi JM, Junior WP: Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with trisomy 21. *Prenat Diagn* 2005, 25(13):1196-1199.
12. Brandalize AP, Bandinelli E, dos Santos PA, Roisenberg I, Schuler-Faccini L: Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as maternal risk factors for Down syndrome and congenital heart defects. *Am J Med Genet A* 2009, 149A(10):2080-2087.
13. O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, Kirke PN, Johnson Z, Conley M, Scott JM, Mills JL: MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? *Am J Med Genet* 2002, 107(2):151-155.
14. Chadeaux-Vekemans B, Coude M, Muller F, Oury JF, Chabli A, Jais J, Kamoun P: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in the etiology of Down syndrome. *Pediatr Res* 2002, 51(6):766-767.

15. Stuppia L, Gatta V, Gaspari AR, Antonucci I, Morizio E, Calabrese G, Palka G: C677T mutation in the 5,10-MTHFR gene and risk of Down syndrome in Italy. *Eur J Hum Genet* 2002, 10(6):388-390.
16. James SJ: Maternal metabolic phenotype and risk of Down syndrome: beyond genetics. *Am J Med Genet A* 2004, 127A(1):1-4.
17. Boduroglu K, Alanay Y, Koldan B, Tuncbilek E: Methylenetetrahydrofolate reductase enzyme polymorphisms as maternal risk for Down syndrome among Turkish women. *Am J Med Genet A* 2004, 127A(1):5-10.
18. Wang SS, Qiao FY, Feng L, Lv JJ: Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in China. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008, 9(2):93-99.
19. Pozzi E, Vergani P, Dalpra L, Combi R, Silvestri D, Crosti F, Dell'Orto M, Valsecchi MG: Maternal polymorphisms for methyltetrahydrofolate reductase and methionine synthetase reductase and risk of children with Down syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2009, 200(6):636 e631-636.
20. Medica I, Maver A, Augusto G, Peterlin B: Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome — meta-analysis. *Central European Journal of Medicine* 2009, 4(4):395-408.
21. Martinez-Frias ML, Perez B, Desviat LR, Castro M, Leal F, Rodriguez L, Mansilla E, Martinez-Fernandez ML, Bermejo E, Rodriguez-Pinilla E et al: Maternal polymorphisms 677C-T and 1298A-C of MTHFR, and 66A-G MTRR genes: is there any relationship between polymorphisms of the folate pathway, maternal homocysteine levels, and the risk for having a child with Down syndrome? *Am J Med Genet A* 2006, 140(9):987-997.
22. Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, Romano A, Romano C, Gueant JL: Methionine synthase (MTR) 2756 (A --> G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet A* 2003, 121A(3):219-224.
23. da Silva LR, Vergani N, Galdieri Lde C, Ribeiro Porto MP, Longhitano SB, Brunoni D, D'Almeida V, Alvarez Perez AB: Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down syndrome in Brazil. *Am J Med Genet A* 2005, 135(3):263-267.
24. Cyril C, Rai P, Chandra N, Gopinath PM, Satyamoorthy K: MTHFR Gene variants C677T, A1298C and association with Down syndrome: A Case-control study from South India. *Indian J Hum Genet* 2009, 15(2):60-64.
25. Chango A, Fillon-Emery N, Mircher C, Blehaut H, Lambert D, Herbeth B, James SJ, Rethore MO, Nicolas JP: No association between common polymorphisms in genes of folate and homocysteine metabolism and the risk of Down's syndrome among French mothers. *Br J Nutr* 2005, 94(2):166-169.
26. Coppede F, Marini G, Bargagna S, Stuppia L, Minichilli F, Fontana I, Colognato R, Astrea G, Palka G, Migliore L: Folate gene polymorphisms and the risk of Down syndrome pregnancies in young Italian women. *Am J Med Genet A* 2006, 140(10):1083-1091.
27. Kohli U, Arora S, Kabra M, Ramakrishnan L, Gulati S, Pandey RM: Prevalence of MTHFR C677T polymorphism in north Indian mothers having babies with Trisomy 21 Down syndrome. *Downs Syndr Res Pract* 2008, 12(2):133-137.
28. Bianco K, Caughey AB, Shaffer BL, Davis R, Norton ME: History of miscarriage and increased incidence of fetal aneuploidy in subsequent pregnancy. *Obstet Gynecol* 2006, 107(5):1098-1102.
29. Zabala R, Waisman I, Corelli M, Tobler B, Bonora L, Cappato F, Cardetti M, Cervera M, Chepparo C, Costero A et al: [Folic acid for neural tube defects prevention: consumption and information in fertile-age women in Centro Cuyo Region]. *Arch Argent Pediatr* 2008, 106(4):295-301.
30. Montanari DFG, Jeniffer A; Barreiro, Cristina Z: Defectos de cierre del tubo neural. Prevención de ocurrencia y recurrencia. Recomendaciones útiles/ Neural tube closure defects. Occurrence and recurrence prevention useful recommendations. *Med infant* 2008, 15(2):95-104.
31. Grillo LB, Acacio GL, Barini R, Pinto W, Jr, Bertuzzo CS: [Mutations in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene and Down syndrome]. *Cad Saude Publica* 2002, 18(6):1795-1797.