

Análisis de las frecuencias de todas las combinaciones genotípicas de 4 polimorfismos de genes implicados en el ciclo del folato en la población española



María Luisa Martínez-Frías^{a,b,c}, Eva Bermejo^{a,b}, Belén Pérez^{b,d}, Lourdes R. Desviat^{b,d}, Margarita Castro^{b,d}, Fátima Leal^{b,d}, Elena Mansilla^{a,b}, María Luisa Martínez-Fernández^{a,b}, Elvira Rodríguez-Pinilla^{a,b}, Laura Rodríguez^{a,b}, Magdalena Ugarte^{b,d} y Grupo de Trabajo del Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC)*

^aCentro de Investigación sobre Anomalías Congénitas (CIAC). Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid.

^bCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER). Madrid

^cDepartamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid.

^dCentro de Biología Molecular Severo Ochoa. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. España.

FUNDAMENTO Y OBJETIVO: Distintas poblaciones muestran diferencias en cuanto a las frecuencias de polimorfismos de genes del ciclo del folato. El objetivo de este estudio ha sido analizar las frecuencias genotípicas de 4 polimorfismos, uno de los cuales -1561C-T del gen de la glutamato carboxipeptidasa II (GCP II)- se analiza por primera vez en España, así como realizar un metaanálisis de los datos publicados.

SUJETOS Y MÉTODO: Utilizando la Red del Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC) se obtuvieron, en 15 comunidades autónomas, muestras de sangre de 190 parejas madres-recién nacidos sin defectos. Se analizaron los polimorfismos 677C-T y 1298A-C del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR); 66A-G del gen de la metionina sintasa reductasa (MTRR), y 1561C-T del gen de la GCP II. Los valores poblacionales se calcularon por los intervalos de confianza del 99%.

RESULTADOS: Las frecuencias en nuestro país difieren de las de otras poblaciones, excepto las del área mediterránea europea. La frecuencia del polimorfismo 1561C-T (gen GCP II) en España es del 5,11%, igual que en Francia (5%) e Italia (6%). Las de MTHFR, CTCC y TTAC en España son muy bajas y no se observó ninguna madre-hijo con TTCC. El metaanálisis (23.612 individuos) mostró que, con un 99% de probabilidad, las frecuencias poblacionales de CTCC, TTAC y TTCC serían de 0,10-0,24; 0,20-0,36, y 0,003-0,05, respectivamente.

CONCLUSIONES: Estos resultados son importantes para estudios sobre la relación de dichos polimorfismos con problemas de salud y susceptibilidad individuales, así como para investigar sus implicaciones biológicas. Tras los últimos hallazgos estructurales y funcionales en la MTHFR pueden entenderse las diferencias, porque los genotipos infrecuentes podrían relacionarse con la viabilidad fetal, las concentraciones de homocisteína materno/fetal y los estilos de vida.

Palabras clave: Polimorfismos. 677C-T MTHFR. 1298A-C MTHFR. 66A-G MTRR. Síndrome de Down. Genotipos. Frecuencias. Metabolismo de un solo carbono.

Analysis of the frequencies of genotype combinations of 4 polymorphisms of genes acting on the folate cycle in the Spanish population

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Studies on different populations have shown a great variability of the frequencies of different polymorphisms in genes acting in the folate cycle. The present study was aimed to analyze the frequency in the Spanish population of each genotype combination of four polymorphisms, one of them -1561C-T of the glutamate carboxypeptidase II (GCP II) gene- being the first time that is studied in Spain. The study included a meta-analysis of the published data.

SUBJECTS AND METHOD: Using the Spanish Collaborative Study of Congenital Malformations (ECEMC) Network, blood samples of 190 mother-child couples with newborns without any congenital defect, were obtained from 15 Spanish autonomous regions. The study polymorphisms were the 677C-T and 1298A-C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), the 66A-G of the methionine synthase reductase (MTRR), and the 1561C-T polymorphism of the GCP II gene. To estimate the range for the population frequencies, 99% confidence intervals were calculated.

RESULTS: The frequencies observed in our country were significantly different from others, being similar to those obtained in countries of the Mediterranean European area. The 1561C-T polymorphism of the GCP II gene has a frequency in Spain of 5.11%, which is also similar to the values observed in France (5%) and in Italy (6%). On the other hand, the frequency of the genotypes CTCC, TTAC is quite few, while the genotype TTCC was not observed in any mother or infants. A meta-analysis was performed for a big sample (23,612 individuals) and the results showed that with a 99% of probability the values for the genotype combinations CTCC, TTAC, and TTCC were within 0.10-0.24; 0.20-0.36; and 0.003-0.05, respectively.

CONCLUSIONS: Our results are important to further analyze the relationship with some health problems and individual susceptibilities. Indeed, considering the published observations of the structure and function of the MTHFR enzyme, it is understandable that those genotype combinations that are quite little frequent, may be related to the embryo-fetal viability, and to the life style of each population.

Key words: Polymorphisms. 677C-T MTHFR. 1298A-C MTHFR. 66A-G MTRR. Down syndrome. Genotypes. Frequencies. One carbon metabolism.

Obra Social de Caja Madrid ha financiado este estudio.

*Al final del artículo se indican los componentes del Grupo de Trabajo del ECEMC.

Correspondencia: Dra. M.L. Martínez-Frías.
Dirección del CIAC. Instituto de Salud Carlos III.
Sinesio Delgado, 6 (Pabellón 6). 28029 Madrid. España.
Correo electrónico: mlmartinez.frias@isciii.es

Recibido el 21-3-2007; aceptado para su publicación el 4-9-2007.

Cada día son más numerosos los estudios sobre la posible relación entre genotipo y fenotipo, tanto en las enfermedades muy frecuentes como en las muy raras. Entre ellos vamos a referirnos a los que versan sobre variaciones polimórficas de un solo nucleótido de genes implicados en el ciclo del metabolismo del folato. Éste es un metabolismo importante porque está relacionado con 2 procesos biológicos básicos: la síntesis y la metilación de ADN, de proteínas y de neurotransmisores, entre otros. El efecto de muchos de esos polimorfismos implica una reducción de la actividad enzimática que modifica las concentraciones de homocisteína, que a su vez depende estrechamente de los hábitos alimentarios (sobre todo del aporte de vitaminas B₁₂ y B₆, folatos -vitamina B₉-, metionina y betaina). Aunque ya son muchos los polimorfismos que se han descrito en los diferentes genes que controlan esa vía metabólica, los más estudiados en diferentes poblaciones son: 677C-T y 1298A-C del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)¹⁻⁴; una variante muy frecuente (66A-G) en el gen de la metionina sintasa reductasa (MTRR)^{5,6}; el polimorfismo 2756A-G en la metionina sintasa (MTR); distintas variantes en el gen de la cistationina betasintasa (CBS)⁶⁻⁸, y el 80A-G del gen portador del folato reducido⁹.

Más recientemente se ha identificado^{10,11} una sustitución C-T en el nucleótido 1561 del gen de la glutamato carboxipeptidasa (GCP II), que causa disminución de la actividad de la enzima que codifica (la folil-polil-gammaglutamato carboxipeptidasa). Como esta enzima transforma los folatos de la dieta para su absorción en el intestino delgado, la variante 1561C-T altera la absorción intestinal de los folatos de la dieta, lo que puede incrementar los valores séricos de homocisteína.

Tras la identificación de esos polimorfismos, se están analizando no sólo las frecuencias de las distintas variantes polimórficas y sus genotipos individuales, sino también las combinaciones de los genotipos de varias de ellas y sus posibles efectos conjuntos^{9,12-16}. Las más estudiadas son las de las posiciones 677 y 1298 del gen de la MTHFR, que están localizadas a una distancia muy corta una de la otra (2,1 kb), por lo que algunos autores¹⁷ las consideraron ligadas (es decir, que no había recombinación entre ellas), a pesar de que en ciertos estudios se había observado alguna combinación del 677T y 1298C en posición *cis*^{2,18,19}. Sin embargo, en estudios posteriores no todas las posibles combinaciones se han observado con la misma frecuencia, lo que ha llevado a postular que las combinaciones en *cis* podrían ser potencialmente nocivas o letales.

En este contexto, el presente trabajo se ha estructurado con el objetivo de analizar, en una muestra de madres y sus hijos nacidos sin defectos congénitos, la frecuencia de todos los genotipos posibles resultantes de las combinaciones de las siguientes variaciones polimórficas: 677C-T y 1298A-C de la MTHFR; la 66A-G de la MTRR, y (creemos que por primera vez en nuestro país) la 1561C-T del gen de la GCPII. Además, para poder interpretar los resultados en su contexto biológico se comparan con los publicados en otras poblaciones con similar y diferente componente étnico.

Ofrecer las frecuencias de estos polimorfismos y sus combinaciones en nuestra población puede ser de gran ayuda para fundamentar los estudios sobre variabilidad genética y su papel en la susceptibilidad para diferentes problemas de salud.

Sujetos y método

Para la toma de las muestras de sangre se utilizó la Red del Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC), que viene trabajando desde el año 1976. El ECEMC tiene un diseño de tipo de casos y controles, con base hospitalaria, y su objetivo es el estudio tanto de las frecuencias de los defectos congénitos y su vigilancia epidemiológica como de sus características y causas, ya sean genéticas y/o ambientales. La organización estructural de esta Red se basa en 2 grupos: el Periférico y el Coordinador. El grupo Periférico está constituido por pediatras, neonatólogos y obstetras de hospitales distribuidos por todas las comunidades autónomas. Ellos son los encargados de identificar a los recién nacidos con defectos (los casos) y seleccionar como control de cada caso al siguiente recién nacido en el mismo hospital, que sea del mismo sexo que el caso y no presente defectos congénitos. El grupo Coordinador, localizado en Madrid, está integrado por un equipo multidisciplinario de expertos en dismorfología, genética clínica y citogenética, epidemiología y teratología clínica²⁰⁻²².

Durante 3 años (de noviembre de 2001 a octubre de 2004), en el grupo del ECEMC se recogieron muestras de sangre total y/o impregnada en papel de todos los recién nacidos consecutivos que tuvieran sin-

TABLA 1
Frecuencias alélicas

Alelos	Madres controles		Hijos sanos		Comparación entre madres e hijos	
	N	Frecuencia (%)	N	Frecuencia (%)	χ^2	p
MTHFR 677C-T						
C	241	63,42	227	61,02	0,46	0,50
T	139	36,59	145	38,98		
MTHFR 1298A-C					1,07	0,30
A	260	69,15	171	73,08		
C	116	30,85	63	26,92		
MTRR 66A-G					0,10	0,75
A	197	51,84	195	52,99		
G	183	48,16	173	47,01		
GCPII C-T					0,59*	
C	353	94,89	87	6,67		
T	19	5,11	3	3,33		

*p de Fisher.

drome de Down y de sus madres, así como de sus correspondientes controles y madres. Siguiendo las pautas aprobadas por el comité de ética, se informó del estudio a todas las madres, que dieron su consentimiento por escrito para participar en él. Se obtuvieron muestras de 148 parejas madre-hijo con síndrome de Down y 190 parejas madre-hijo sano, procedentes de 15 de las 17 comunidades autónomas. El objetivo planteado fue analizar la relación entre los polimorfismos de los 3 genes seleccionados y el riesgo para niños con síndrome de Down, y los resultados de dicho estudio ya han sido publicados²². Para este trabajo se utilizaron sólo las muestras de las 190 madres y sus hijos sin defectos congénitos, como muestra de la población general, para mostrar las frecuencias de las combinaciones genotípicas de esos polimorfismos en nuestra población. Además, se realizó un metaanálisis.

Análisis genético

Sobre las muestras de los niños y de sus respectivas madres se realizó el análisis genético de 4 polimorfismos funcionales o polimorfismos de un solo nucleótido identificados en las proteínas MTHFR, MTRR y GCPII. Para ello se utilizaron sangre total y/o sangre impregnada en papel como fuente de ADN. La extracción de ADN se realizó en ambos casos utilizando los reactivos de Generations (Gentra System). Una vez extraído, el ADN se cuantificó mediante espectrofotometría (λ 260 nm) y su tamaño se visualizó en un gel de agarosa al 0,8%. Las muestras de ADN se almacenan indefinidamente a -20 °C hasta su utilización. Posteriormente se diseñaron las sondas y los cebadores para la diferenciación de los 2 alelos en los genes MTHFR (677C-T y 1298A-C), MTRR (66A-G) y GCPII (1561C-T). Se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación de los exones 4 y 8 del gen de la MTHFR, el exón 2 de la MTRR y el 13 del gen de la GCPII (números de acceso en las bases de datos de secuencias: AF105980, AF121202 y AF007544), y las correspondientes sondas marcadas con fluorescencia para la detección específica de los 3 polimorfismos²³.

Para verificar la correcta detección de los genotipos correspondientes a los 3 genes se utilizó ADN de individuos previamente genotipificados mediante digestión con enzimas de restricción y/o secuenciación cíclica directa.

La detección de los polimorfismos dialélicos c.677C-T y c.1298 A-C, localizados en el gen de la MTHFR, y c.66A-G, localizado en el gen de la MTRR, se realiza en 50 ng de ADN empleando sondas específicas de alelo mediante el sistema FRED en un termociclador/fluoróforo Lightcycler (Roche). El fragmento que contiene el cambio C-T en la posición 677 se amplifica utilizando cantidades equimolares (0,5 μ mol) de cada uno de los oligos directo (5'CCTTGAACAGGTG-GAGGCCA3') e inverso (5'CTC CCTCCACCCCACTC-CACCGC3') a una concentración de 2 mmol de Cl_2Mg . La detección se realiza con las sondas MTHFR-f 5'TGACCTGAAGCACTTGAAGGAGGT3' y MTHFR-640 5'CGGGAGCCGATTTCATCAT3' a una

concentración de 0,2 μ mol cada una. Mediante este sistema se identifica rápida y eficazmente a individuos homocigotos CC o TT e individuos heterocigotos CT.

En el caso del polimorfismo 1298A-C, el fragmento que contiene el cambio nucleotídico A-C en la posición 1298 se amplifica utilizando cantidades equimolares (0,5 μ mol) de cada uno de los oligos directo MTHFR1298-U (5'gcaattcctctcccctg3') en inverso MTHFR-L (5'tcccaactccagcactc3'), a una concentración de 3 mmol de Cl_2Mg . La detección se realiza con las sondas MTHFR1298-f' y MTHFR-640 5' a una concentración de 0,2 μ mol cada una. Mediante este sistema se puede identificar rápida y eficazmente a individuos homocigotos AA o CC e individuos heterocigotos AC.

Para la detección del polimorfismo 66A-G en el exón 2 de la MTRR (AF121202) se realiza una amplificación asimétrica utilizando 2 μ mol del oligo directo (5'gtgatgaggaggttctgtact3') y 0,1 μ mol del oligo inverso (5'aaatccactgtaacggctca3') a una concentración de Cl_2Mg de 2 mmol. Tras la amplificación se añaden las sondas de MTRR-f (gtaccacagctgtaccacatttc) y MTRR-640 (ctgcatggccttgcctgtccct), se realiza la fusión y se identifican los 3 posibles genotipos AA, GG y AG.

En los 3 casos se realizaron comprobaciones mediante detección con enzimas de restricción y/o secuenciación cíclica directa de los correspondientes fragmentos. Se utilizaron las enzimas HinfI, Avall y NdeI para la diferenciación alélica de los polimorfismos de un solo nucleótido 677C-T, 1298A-C y 66A-G, respectivamente.

El polimorfismo funcional 1561C-T, localizado en el gen que codifica para la proteína GCPII, se detectó mediante digestión con la enzima de restricción AccI del exón 13 del gen (GenBank, número de acceso: AF007544).

Análisis estadístico

Para la comparación de las frecuencias de los distintos alelos y genotipos se utilizaron el test de la χ^2 de Pearson y el test exacto de Fisher cuando algún valor esperado era menor de 5. El programa SABER (Statistical Analysis Blackbox for Epidemiological Research, versión 1.4) se usó para estimar el intervalo de confianza del 99% en el que se encontrarían los valores poblacionales para los diferentes valores muestrales analizados. Para rechazar la hipótesis nula, se estableció un valor de p a 2 colas menor o igual a 0,05.

Resultados

Análisis de las frecuencias obtenidas en una muestra de la población española

En la tabla 1 se exponen las frecuencias alélicas de los 4 polimorfismos estudia-

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3803196>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3803196>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)