

## ARTÍCULO ORIGINAL

## Coexistencia de las mutaciones C677T y A1298C en la enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa en pacientes pediátricos con trombosis

*Coexistence of C677T and A1298C mutations in the 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase enzyme in pediatric patients with thrombosis*

Israel Parra-Ortega<sup>1</sup>, Briceida López-Martínez<sup>1</sup>, Itamar González-Ávila<sup>2</sup>, Cecilia Rodríguez-Castillejos<sup>2</sup>, Vanesa Jonguitud-Díaz<sup>3</sup>, Alma Luna-Gaspar<sup>1</sup>, José Luis Sánchez-Huerta<sup>1</sup>, Armando Vilchis-Ordóñez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Clínico, <sup>2</sup>Servicio de Hematología, <sup>3</sup>Servicio de Medicina Transfusional, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México, D. F., México.

**Resumen**

**Introducción.** Una de las alteraciones genéticas que predisponen a trombosis, y que ha sido ampliamente estudiada, es la mutación C677T en el gen que codifica para la enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Así también, la presencia de la mutación A1298C en el mismo gen es considerada como un factor genético que predispone a trombosis.

**Métodos.** Estudio realizado a 9 pacientes pediátricos con diagnóstico de trombofilia, 7 de sexo masculino y 2 del femenino, con edades de 1 mes a 13 años, a los cuales se les realizó, mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, el estudio de las mutaciones C677T y A1298C en la enzima MTHFR, la mutación G1691A (Leiden) del factor V y la mutación G20210A de la protrombina. Por métodos convencionales se realizó el fenómeno de resistencia a la proteína C activada (RPCa) y las proteínas C y S de la coagulación, así como la antitrombina (AT).

**Resultados.** Todos los pacientes presentaron la coexistencia de las mutaciones C677T y A1298C en la MTHFR; solamente uno de ellos presentó un estado homocigoto para C677T y hete-

**Summary**

**Introduction.** One of the thrombophilic conditions that has been widely studied is the C677T mutation in the gene encoding the 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) enzyme. The presence of mutation A1298C in the same gene is also considered as one factor that predisposes thrombosis.

**Methods.** We report on 9 pediatric patients diagnosed with thrombophilia, 7 males and 2 females with ages ranging from 1 month to 13 years. Real-time polymerase chain reaction was performed along with the study of the C677T and A1298C mutations in the MTHFR enzyme, G1691A mutation (Leiden) and factor V, prothrombin mutation G20210A. Conventional methods were used for activated protein C (APC) resistance and protein C and S coagulation, as well as antithrombin (AT).

**Results.** All patients had coexisting mutations C677T and A1298C in MTHFR. Only 1 patient was homozygous for C677T and heterozygous for A1298C. The other 8 patients presented heterozygous mutations and in the 9 patients the presence of mutations of G1691A factor V (Leiden) and G20210A prothrom-

Autor de correspondencia: QC Israel Parra Ortega. Correo electrónico: i\_parra@hotmail.com

Fecha de recepción: 25-08-2008.

Fecha de aprobación: 30-01-2009.

rocigoto para A1298C, los otros 8 pacientes presentaron estados heterocigotos para ambas mutaciones; en los 9 pacientes no se demostró la presencia de las mutaciones G1691A del factor V (Leiden) y la G20210A de la protrombina, ni alteraciones en la RPCa, AT y las proteínas C y S de la coagulación.

**Conclusiones.** La coexistencia de las mutaciones C677T y A1298C debe considerarse para su investigación en todos los pacientes que presenten un estado de trombofilia.

**Palabras clave.** Trombosis; metilentetrahidrofolato reductasa; factor V Leiden.

bin was not demonstrated, as well as alterations in APC, AT and proteins C and S.

**Conclusions.** Coexistence of the C677T and A1298C mutations should be considered for investigation in all patients presenting thrombophilia.

**Key words.** Thrombosis; methylenetetrahydrofolate reductase; factor V, Leiden.

## Introducción

La incidencia de eventos trombóticos es poco frecuente en los niños, pero parece estar aumentando. La Comisión Canadiense de Pediatría, estima que existen 0.67 casos por 100 000 niños por año;<sup>1</sup> la causa de estos eventos trombóticos se ha atribuido a una combinación de diversos factores de riesgo (infección, línea venosa central o quimioterapia). Las directrices internacionales recomiendan la detección de factores de riesgo hereditarios y adquiridos como parte importante en el manejo de la trombosis.<sup>2</sup> Múltiples investigaciones realizadas en nuestro país han contribuido a la identificación de los factores que predisponen a trombosis. En la mayoría de los casos estudiados se ha observado que existe presencia de varias condiciones trombofílicas cuando se presenta un episodio vaso-oclusivo; dichos hallazgos también han sido informados por diversos investigadores en otros sitios del mundo.<sup>2-10</sup>

Una de las condiciones trombofílicas que ha sido ampliamente estudiada es la actividad de la enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), que participa en el metabolismo de la homocisteína, en la cual se han identificado la presencia de dos mutaciones, la C677T y A1298C, que originan disminución en su actividad enzimática.<sup>11-16</sup>

En la población caucásica, la incidencia de la mutación C677T en MTHFR es de aproximadamente 40% para los estados heterocigotos, y de 10% para los homocigotos.<sup>14</sup> Existen informes de que los pacientes trombofílicos mexicanos que son

portadores de estados hetero u homocigotos para la mutación C677T en MTHFR, no expresan un aumento de homocisteína plasmática; esta información no descarta la participación de la mutación C677T en MTHFR en la patogenia de la trombosis.<sup>16</sup> La presencia de la mutación A1298C en la enzima MTHFR es considerada también como un factor predisponente para trombosis, y en la literatura actual de nuestro país no existen informes sobre la investigación de esta mutación en pacientes con trombofilia.<sup>14</sup> La coexistencia en forma heterocigota de las mutaciones C677T/A1298C en la MTHFR se ha descrito en algunos estudios;<sup>14,15</sup> sin embargo, no existen informes de la coexistencia de dichas mutaciones en pacientes pediátricos con trombosis, por lo tanto el objetivo del presente trabajo es la presentación de un estudio en nueve pacientes pediátricos con diagnóstico de trombosis, a los cuales después de realizarles diversas pruebas para identificar los marcadores de trombofilia más frecuentes, se evidenció la coexistencia de las mutaciones C677T y A1298C en la MTHFR como único factor genético asociado.

## Métodos

Descripción de un estudio en nueve pacientes pediátricos con diagnóstico de trombofilia, siete del sexo masculino y dos del femenino, con un intervalo de edad de un mes a 13 años, seleccionados por personal médico del Servicio de Hematología del Hospital infantil de México Federico Gómez.

A todos los pacientes, previa autorización de sus padres o tutores, se les tomó una muestra de 3 a 5 mL de sangre periférica anticoagulada con EDTA, para la extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN). La extracción se realizó con los reactivos y el equipo *MagNA Pure Compact Roche Diagnostic*<sup>MR</sup>, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La investigación de las mutaciones C677T y A1298C en el gen que codifica para la enzima MTHFR, la G1691A en el gen que codifica para el factor V (Leiden) y G20210A en el gen de la protrombina, se realizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT), utilizando el equipo *LightCycler 2.0 Roche Diagnostic*<sup>MR</sup>. Se realizó la determinación de la resistencia a la proteína C activada (RPCa), la actividad de las proteínas C y S de la coagulación y la antitrombina (AT), para lo cual se tomó una muestra de sangre periférica anti-

coagulada con citrato de sodio al 3.8% y se utilizaron reactivos comerciales de la marca *Dade Behring Marburg GMBH*, siguiendo las instrucciones del fabricante, en un equipo *Sysmex CA 1500*<sup>MR</sup>.

## Resultados

En este estudio todos los pacientes presentaron la coexistencia de las mutaciones C677T y A1298C en la enzima MTHFR, solamente uno presentó un estado homocigoto para C677T y heterocigoto para A1298C; los ocho pacientes restantes presentaron estados heterocigotos para ambas mutaciones. En los nueve pacientes no se identificó la presencia de las mutaciones G1691A del factor V (Leiden) y la G20210A de la protrombina, y de igual forma no se evidenciaron alteraciones en la RPCa, AT y las proteínas C y S de la coagulación (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Información obtenida en nueve pacientes pediátricos estudiados en el Servicio de Hematología del Hospital Infantil de México Federico Gómez. 2008**

Sexo	Edad	Enfermedad de base	Sitio de la trombosis	Método diagnóstico	MTHFR C677T	MTHFR A1298C	FV G1691A	PT G20210A
M	11 años	Ninguna	Vena porta	Clínico	CT	AC	GG	GG
M	1 mes	Síndrome dismórfico	Aurícula, TEP	Ecocardiograma	CT	AC	GG	GG
M	13 años	Ninguna	Suprahepática	Ultrasonido	CT	AC	GG	GG
M	5 años	Ninguna	Vena porta	Ultrasonido	CT	AC	GG	GG
M	5 años	Ninguna	Evento vascular cerebral	Resonancia magnética	CT	AC	GG	GG
F	12 años	Malformación arteriovenosa	Aurícula derecha	Ecocardiograma	TT	AC	GG	GG
M	2 años	Alergia a la proteína de la leche	Aurícula	Ecocardiograma	CT	AC	GG	GG
M	12 años	Neuropatía crónica e hiperplasia pulmonar	Evento vascular cerebral	Resonancia magnética	CT	AC	GG	GG
F	10 años	Coartación aórtica	Evento vascular cerebral	Resonancia magnética	CT	AC	GG	GG

F: femenino; M: masculino; FV G1691A: mutación Leiden del factor V; PT G20210A: mutación G20210A en la protrombina; MTHFR C677T: mutación C677T en la metilentetrahidrofolato reductasa; MTHFR A1298C: mutación A1298C en la metilentetrahidrofolato reductasa; TEP: tromboembolismo pulmonar

## Discusión

En este estudio nos concentramos en la descripción de la coexistencia de las mutaciones C677T y A1298C en gen que codifica para la MTHFR, y consideramos que dichas mutaciones se deben investigar en todos los pacientes que presenten un estado de trombofilia, a los cuales no se les identificaron los factores predisponentes más frecuentes, ya sean hereditarios o adquiridos. Existen descritas diversas condiciones trombofílicas identificadas en los pacientes mexicanos. A lo largo de muchas investigaciones se ha postulado que los eventos trombóticos tienen una predisposición genética, y que dependiendo del número de mutaciones o alteraciones será la gravedad de los eventos vaso-occlusivos.<sup>4-10</sup>

En nuestro país, Ruiz-Argüelles y col.<sup>4-10</sup> han realizado diversas aportaciones que ayudan a comprender las alteraciones del sistema hemostático de los pacientes que cursan con trombofilia. En uno de sus informes, realizado con una serie de

100 pacientes, llegaron a demostrar que 94% de los pacientes estudiados presentaba al menos un marcador de trombofilia, y en 81% se presentaron dos o más alteraciones.<sup>10</sup> Basados en diversas conclusiones es recomendable realizar, a todos los pacientes con trombofilia, la investigación del mayor número de mutaciones o polimorfismos asociados a estos eventos.

El riesgo que se asocia con cada defecto genético cuando se presenta de manera aislada puede ser relativamente bajo, pero la presencia simultánea de varias mutaciones puede aumentar drásticamente la susceptibilidad a la enfermedad.<sup>17,18</sup> Por otro lado, tanto las condiciones de vida como los factores ambientales pueden interactuar con una o más mutaciones genéticas e incrementar la predisposición y gravedad del evento. El análisis de los factores de riesgo, tanto genéticos como adquiridos, junto con el estilo de vida y los factores ambientales, han contribuido de manera significativa a la comprensión de esta entidad.

---

## Referencias

1. De Veber G, Andrew M, Adams C. Cerebral sinovenous thrombosis in children. *N Engl J Med.* 2001; 345: 417-23.
2. Tuckuviene R, Johnsen SP, Helgestad J, Ingerslev J, Kristensen SR. Venous thromboembolism in children. *Ugeskr Laeger.* 2008; 170: 3424-9.
3. Schmidt B, Andrew M. Neonatal thrombosis: Report of a prospective Canadian and international registry. *Pediatrics.* 1995; 96: 939-43.
4. Ruiz-Argüelles GJ. Trombofilia. En: Ruiz-Argüelles GJ, editor. *Fundamentos de hematología.* 3ª ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2003. p. 424-36.
5. Ruiz-Argüelles GJ, González-Estrada S, Garcés-Eisele J, Ruiz-Argüelles A. Primary thrombophilia in México: A prospective study. *Am J Hematol.* 1999; 60: 1-5.
6. Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Reyes-Núñez V, Ramírez-Cisneros F. Primary thrombophilia in México. II: Factor V G1691A (Leiden), prothrombin G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in thrombophilic Mexican mestizos. *Am J Hematol.* 2001; 66: 28-31.
7. Ruiz-Argüelles GJ, López-Martínez B, Cruz-Cruz D, Reyes-Aulis MB. Primary thrombophilia in México. III: A prospective study of the sticky platelet syndrome. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2002; 8: 273-7.
8. Ruiz-Argüelles GJ, Poblete-Naredo I, Reyes-Núñez V, Garcés-Eisele J, López-Martínez B, Gómez-Rangel D. Primary thrombophilia in México. IV: Leiden, Cambridge, Hong Kong, Liverpool and HR2 haplotype polymorphisms in the factor V gene of a group of thrombophilic Mexican mestizos. *Rev Invest Clin Mex.* 2004; 56: 600-4.
9. Ruiz-Argüelles GJ, López-Martínez B, Valdés-Tapia P, Gómez-Rangel JD, Reyes-Núñez V, Garcés-Eisele J. Primary thrombophilia in México. V. A comprehensive prospective study indicates that most cases are multifactorial. *Am J Hematol.* 2005; 78: 21-6.
10. Ruiz-Argüelles GJ, González-Carrillo ML, Estrada-Gómez R, Valdés-Tapia P, Parra-Ortega I, Porras-Juárez A. Primary thrombophilia in México. VI. Falta de asociación estadística entre las condiciones trombofílicas heredadas. *Gac Med Mex.* 2007; 4: 317-22.
11. Sibani S, Christensen B, O'Ferrell E. Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. *Hum Mutat.* 2000; 15: 280-7.

12. Van der Put NJM, Gabreels F, Stevens EMB, Smeitink JAM, Trijbels FJM, Eskes TKAB, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: An additional risk factor for neural tube defects? *Am J Hum Genet.* 1998; 62: 1044-51.
13. Malinow MR, Nieto FJ, Kruger WD. The effects of folic acid supplementation on plasma total homocysteine are modulated by multivitamin use and methylenetetrahydrofolate reductase genotypes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 1157-62.
14. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in MTHFR associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab.* 1998; 64: 169-72.
15. Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: Association with plasma total homocysteine and folate concentrations. *J Nutr.* 1999; 129: 1656-61.
16. Parra-Ortega I, Estrada-Gómez RA, Guzmán-García MO. La mutación 677 C → T en la 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa y el aumento de homocisteína en pacientes mexicanos. *Med Intern Mex.* 2007; 23: 15-8.
17. Reyes-Engel A, Muñoz E, Gaitán MJ. Implications on human fertility of the 677C → T and 1298A → C polymorphisms of the MTHFR gene: Consequences of a possible genetic selection. *Mol Hum Reprod.* 2002; 8: 952-7.
18. Ozyurek E, Balta G, Degerliyurt A, Parlak H, Aysun S, Gürsey A. Significance of factor V, prothrombin, MTHFR, and PAI-I genotypes in childhood cerebral thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2007; 13: 154-60.