

## POLIMORFISMO C677T DEL GEN MTHFR EN NIÑOS CON TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA

María Fátima Garcés (1), Astrid Arroyo (2), Jorge Chakkal (2),  
Ana Cecilia Márquez (3), Clara Martínez (4), María Luisa Núñez (5), Celsy  
Hernández (6), Karolina López (7).

Recibido: 10-05-2018  
Aceptado: 15-07-2018

### Resumen

La etiología de los Trastornos del Espectro Autista (TEA), así como las bases neurobiológicas y la fisiopatología no están completamente definidas. Diversos estudios han revelado que genes implicados en la vía de la folato-homocisteína pueden ser considerados factores de riesgo en niños con TEA. **Objetivo:** Evaluar la relación entre el Polimorfismo C677T del gen MTHFR y los TEA. **Metodología:** Se estudiaron 62 niños y adolescentes con diagnóstico de TEA y 67 niños y adolescentes sin diagnóstico de TEA (grupo control). El polimorfismo se estudió mediante la reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP). La significación estadística se estimó mediante chi-cuadrado y tablas de contingencia de  $2 \times 2$ , se calculó odds ratios (OR) según la fórmula de Woolfs. **Resultados:** No existe diferencia significativa entre la distribución de los diferentes genotipos de MTHFR de los pacientes con respecto al grupo control. Los niños que presentaban TEA moderado + severo tienen un predominio del factor de riesgo (CT+TT) del 61,8 % con un OR de 2,497 (IC 95 % = 0,79 – 7,97;  $p \leq 0.05$ ), mientras que los niños que presentaban TEA leve presentaron un predominio del genotipo CC del 60,7 %. El polimorfismo C677T del gen MTHFR más que un factor de riesgo para la presencia del autismo en la población estudiada mostró una asociación estadísticamente significativa con la severidad del mismo. **Conclusión:** El polimorfismo C677T del gen MTHFR representa un posible factor de riesgo asociado a la severidad del TEA.

**Palabras clave:** Trastornos del espectro autista, TEA, MTHFR, polimorfismo.

### MTHFR GENE C677T POLYMORPHISM IN CHILDREN WITH AUTISTIC SPECTRUM DISORDER

#### Summary

**Introduction:** The etiology of Autistic Spectrum Disorders (ASD), as well as the neurobiological bases and pathophysiology are not completely defined. Several studies have revealed that genes involved in the folate-homocysteine pathway can be considered risk factors in children with ASD. **Objective:** To evaluate the possible relationship between the C677T polymorphism of the MTHFR gene and the Autistic Spectrum Disorder. **Methodology:** 62 children and adolescents with a diagnosis of ASD and 67 children and adolescents previously examined and without a diagnosis of ASD (control) were studied. The polymorphism was studied by using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP). The statistical significance was estimated using the chi-square test using  $2 \times 2$  contingency tables, odds ratios (OR) were calculated according to the Woolfs formula. **Results:** There is no significant difference between the distribution of the different MTHFR genotypes of the patients with respect to the control group. Children who presented moderate + severe ASD had a predominance of the risk factor (CT + TT) of 61.8 % with an OR of 2.497 (95 % CI = 0.79 - 7.97,  $p = 0.05$ ), whereas children with mild ASD presented a predominance of the CC genotype of 60.7 %. The C677T polymorphism of the MTHFR gene more than a risk factor for the presence of autism in the study population showed a statistically significant association with its severity. **Conclusion:** The C677T polymorphism of the MTHFR gene represents a possible risk factor associated with the severity of ASD.

**Key words:** Autism spectrum disorders, ASD, MTHFR, polymorphism

#### Primer Premio 64 Congreso Venezolano de Puericultura y Pediatría 2018

1. Licenciada en Bioanálisis. Dra. en Ciencias mención Bioquímica. Profesor Titular Cátedra de Bioquímica "A" Escuela de Bioanálisis. Coordinador Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas. Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
2. Licenciado en Bioanálisis. Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas, Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
3. Médico Psiquiatra. Coordinador de la Unidad de Autismo Maternidad Concepción Palacios, Anexo "Negra Matea" Caracas-Venezuela.
4. Licenciada en Biología. Dra. en Ciencias Biológicas. Profesor Asistente Cátedra de Bioquímica, Escuela de Nutrición y Dietética, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
5. Licenciada en Bioanálisis. MSc. en Ciencias mención Genética Humana y Esp. Estadística. Profesor Instructor Cátedra de Bioquímica "B" Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
6. Licenciada en Bioanálisis. MSc. en Aseguramiento de la Calidad. Profesor Agregado Cátedra de Bioquímica "B" Escuela de Bioanálisis, Investigador del Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
7. Médico Pediatra, Gastroenterólogo Unidad de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica Hospital General "Dr. Miguel Pérez Carreño", IVSS. Caracas-Venezuela.

#### Autor corresponsal:

Dra. María Fatima Garcés Da Silva.

Apartado 1040, Caracas, Venezuela, Teléfonos: 0212-6053308 / 0414-1363868, Fax 0212-6053312

Correo electrónico: mariafatimagarcés@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

Los trastornos del espectro autista (TEA) se componen de un grupo de individuos que se caracterizan por una alteración de gravedad variable en interacciones sociales, habilidades recíprocas de comunicación, habilidades simbólicas e imaginativas, y la presencia de estereotipos y comportamientos restringidos (1).

Hasta el momento no se ha identificado un marcador biológico totalmente confiable que permita un diagnóstico definitivo y certero. Sin embargo, con base en los diversos síntomas sugestivos de los TEA, diferentes especialistas han sugerido una estrategia comprensible, estructurada y sistemática empleada para el diagnóstico, basada en criterios específicos que derivan de tres dominios conductuales: afectación de la interacción social, alteraciones cualitativas en las habilidades de comunicación y la presencia de patrones restrictivos o repetitivos en el comportamiento (2).

Como un trastorno complejo del neurodesarrollo, el fenotipo y la gravedad de los TEA son extremadamente heterogéneos con diferencias de un paciente a otro. Esta heterogeneidad implica el hecho de que múltiples factores de riesgo puedan estar asociados con su etiología (3). No obstante, estudios muestran que los genes tienen un mayor rol en el riesgo de autismo que en cualquier otro trastorno neuropsiquiátrico en donde también se incluyen factores ambientales que implican perturbaciones a nivel molecular (4). De esta forma, las alteraciones genéticas, que suelen ser diversas, se encuentran entre las causas principales, y se postula que, a nivel molecular, pueden existir mutaciones en la secuencia de ADN que alteran genes o promotores y afectan así la expresión genómica; muchos de ellos relacionados con el desarrollo del sistema nervioso central (2).

La Metil N-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es una enzima reguladora del metabolismo de la homocisteína (Hcy), la cual es necesaria tanto para el metabolismo del tetrahidrofolato como en la síntesis de ADN y ARN. Esta enzima codificada por el gen MTHFR localizado en el brazo corto del cromosoma 1 en la posición 36.3 (1p36.3), cataliza la reacción de reducción del 5,10-metiltetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, la principal forma circulante de folato y el donante de grupo metilo para la remetilación de Hcy a metionina (5).

Se ha identificado una forma termolábil de MTHFR, causada por una mutación de sentido erróneo en su gen de codificación, que implica el cambio de la base nitrogenada citosina por timina (C677T MTHFR A222V, rs1801133), dando como resultado la sustitución del aminoácido valina por alanina en la enzima. Dicha mutación tiene un estado homocigoto y heterocigoto que se correlacionan con la actividad reducida de la enzima. De esta forma, el genotipo homocigoto 677TT genera una enzima variante, asociada con niveles elevados de Hcy y, particularmente con niveles bajos de folato (5).

Actualmente se conoce que defectos en la vía de la folato-homocisteína así como perturbaciones en la metilación del ADN pueden desempeñar un papel importante en la fisiopatología de los TEA y que el polimorfismo C677T del gen MTHFR puede ser considerado un factor de riesgo para este trastorno del neurodesarrollo (3,6). Es por ello, que el objetivo del presente estudio fue evaluar la posible relación entre el polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR y los Trastornos del Espectro Autista en niños que asisten al servicio de neuropediatría de la Unidad de Autismo “Negra Matea” de la Maternidad Concepción Palacios, Caracas, Distrito Capital, Venezuela

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Tipo y nivel de la investigación

El presente trabajo es un estudio de cohorte de casos y controles, descriptivo y correlacional, realizado en un grupo de niños diagnosticados con Trastornos del Espectro Autista para identificar el genotipo de la enzima MTHFR.

### Aspectos éticos y administrativos

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela (U.C.V), en cooperación con la Unidad de Autismo del Edificio “Negra Matea” de la Maternidad Concepción Palacios.

El protocolo del estudio se realizó bajo las normas de ética establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), para trabajos de investigación en humanos y la declaración de Helsinki ratificada por la 29ava Asamblea Médica Mundial, realizada en Tokio en 1995 (7). Adicionalmente, esta investigación contó con el aval del Comité de Bioética de la Maternidad Concepción Palacios, y con el consentimiento informado de los padres y/o representantes de los niños del estudio.

### Población de estudio

La muestra estuvo conformada por 62 niños y adolescentes con edades comprendidas entre los 3 a 17 años, atendidos entre mayo 2014 y mayo 2016 en la Unidad de Autismo del Edificio “Negra Matea” de la Maternidad Concepción Palacios, y por un grupo control de 67 niños aparentemente sanos sin TEA en edades comprendidas entre los 3 y 13 años que asisten a la escuela primaria del Colegio “La Patria de Bolívar”, ubicado en la Urbanización Santa Mónica, de Caracas.

Para formar parte de la muestra, los pacientes con TEA, debieron ser atendidos en el Servicio de Neuropediatría de la Unidad de Autismo de la Maternidad Concepción Palacios, haber sido clasificado según la evaluación clínica en niños con TEA y no estar recibiendo ningún tratamiento para el TEA (terapias conductuales y de comunicación, tratamientos nutricionales, farmacológicos, entre otros). Para formar parte del grupo control, los niños fueron evaluados clínicamente, excluyéndose todos aquellos niños que presentaron trastor-

nos del neurodesarrollo, alguna enfermedad de base y/o disfuncionalidad del sistema inmunológico.

#### **Clasificación de los niños según diagnóstico clínico**

Cada niño fue evaluado en el Servicio de alto riesgo neurológico, Unidad de Autismo de la Maternidad Concepción Palacios. Se utilizaron los criterios del Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder DSM V (8) y la escala de Observación para el Diagnóstico del Autismo (ADOS) (9) para realizar el diagnóstico de Trastorno del Espectro Autista.

En el manual DMS-V se describe: A. Deficiencias persistentes en la comunicación social y en la interacción social; B. Patrones restrictivos y repetitivos de comportamiento, intereses o actividades; C. Los síntomas deben de estar presentes en las primeras fases del período de desarrollo; D. Los síntomas causan un deterioro clínicamente significativo en lo social, laboral u otras áreas importantes del funcionamiento habitual; E. Estas alteraciones no se explican mejor por la discapacidad intelectual (trastorno del desarrollo intelectual) o por el retraso global del desarrollo (8).

A partir de las observaciones realizadas y de las notas tomadas durante la aplicación del ADOS-2, se asignan las puntuaciones o códigos. Estos se registran inmediatamente después de la sesión, de acuerdo con la aplicación en vivo. Posteriormente, en el momento de la corrección, los códigos se convierten en puntuaciones de algoritmo y se utilizan para completar el algoritmo diagnóstico que consiste en una selección de ítems que se suma y se compara con puntos de corte predeterminados. El resultado de este algoritmo puede utilizarse junto con otra información para formular un diagnóstico clínico (9).

#### **Recolección y procesamiento de muestras sanguíneas**

A cada niño se le extrajeron 8 ml de sangre total que se colocaron en un tubo con anticoagulante EDTA y un tubo sin anticoagulante. La muestra sin anticoagulante fue centrifugada en un lapso no mayor de 30 minutos a 3000 xg en una centrifuga refrigerada a 4 °C por 15 min y el suero congelado a -20 °C hasta su procesamiento. Las muestras con anticoagulante fueron conservadas en refrigerador a una temperatura no mayor de los 4 °C hasta realizar la extracción del ADN.

#### **Genotipificación**

Se realizó extracción de ADN de las muestras por el método de "Bunce" (10) modificado y almacenadas a -20 °C hasta la amplificación del ADN, la cual fue realizada por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en un termociclador (Lab Cycler de Senso Quest, Alemania). La amplificación del polimorfismo C677T del gen MTHFR se realizó por la técnica descrita por Frosst et al (11) que emplea los siguientes primers: Forward 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' y Reverse 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3' que abarcan una región de 198 pb. El volumen final de la PCR es de 25 µl, que contiene 0,4 µg de ADN genómico, 1,5 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mmol/L de DNTPs, 0,4 µmol de cada primer, 5 µl Buffer

5x green (PROMEGA) y 1,25 U de Taq Polimerasa (PROMEGA). Las condiciones de la PCR constan de los siguientes pasos: desnaturalización a 94°C por 5 minutos, alineamiento a 57°C por 3 minutos, extensión a 72 °C por 2 minutos seguido de 30 ciclos de desnaturalización de 94 °C por 50 segundos, alineamiento a 57 °C por 50 segundos, extensión a 72°C por 50 segundos y una extensión final a 72 °C por 5 minutos. La calidad del producto de amplificación fue verificada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%, en la cual se agregaron 8 µl del producto de PCR con 2 µl de buffer de carga, en búfer TAE 1x y coloreado con bromuro de etidio, además de un ADN ladder de 100 pb como marcador molecular y un control negativo. El polimorfismo C677T del gen MTHFR fue detectado a través de una RFLP (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción), utilizando la enzima de restricción HinfI. Las muestras digeridas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida y visualizadas por tinción con nitrato de plata y visualizadas en un sistema de fotodocumentación digital, equipo Uvitec (Gel Documentation Uvitec Limited, USA). Para la interpretación de los geles, se asignó el alelo C al producto de PCR que no es digerido y se observó como una banda de 198 bp, mientras que el alelo T es digerido y se observan dos fragmentos de 175 y 23 bp.

#### **Análisis estadístico**

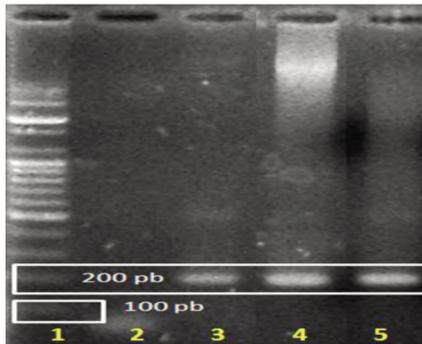
Para conocer la influencia de los genotipos obtenidos en los niños TEA para la variante C677T del gen MTHFR sobre la severidad de los TEA, se calculó la frecuencia alélica (FA) y frecuencia genotípica (FG) del gen en estudio, la cual fue obtenida por conteo directo a partir de los fenotipos asignados a cada individuo. Se usó el paquete estadístico SPSS versión y tablas de contingencia simple, evaluando la asociación entre las variables en estudio y los alelos de MTHFR por Chi<sup>2</sup> y odds ratio (OR). Para determinar las relaciones entre los alelos de la MTHFR estudiada y el trastorno se realizaron pruebas de ANOVA.

## **RESULTADOS**

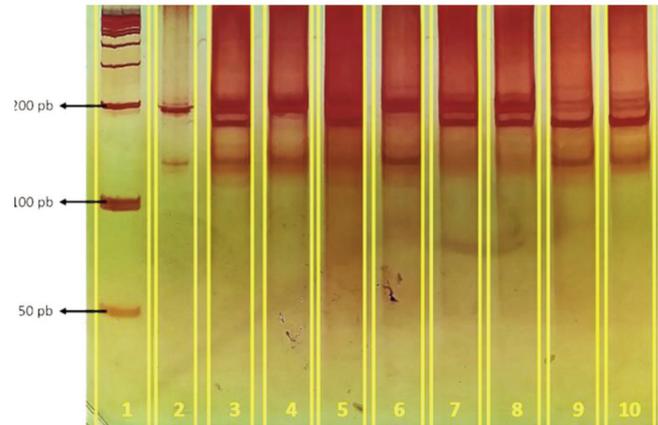
#### **Características de la población estudiada**

Se evaluaron 129 pacientes (62 con TEA y 67 controles), los cuales fueron clasificados según la edad en niños de 2-6 años), de 7-12 años y mayores de 12 años. La edad promedio de los niños con TEA fue 6,71 ± 3,05 años y en el grupo control 7,31 ± 2,60 años. El 79,03% de los pacientes con TEA pertenecían al sexo masculino, mientras que solo un 20,97% son de sexo femenino, obteniéndose una razón de 4,9:1,3. Igualmente, se observó un mayor porcentaje de pacientes 54,84 % dentro del grupo de 2 a 6 años, seguido del grupo de 7 a 12 años (38,71%) y en menor proporción el grupo de mayores de 12 años (6,45%).

Al clasificar a los niños según la severidad de los TEA, encontramos 46,8% de los niños con TEA leve, 45,1% TEA moderado y 8,1% severo.



**Figura 1. Amplificación del gen de la MTHFR por PCR.**  
En la posición: 1) Marcador de peso molecular de 100pb. 2) Control negativo. 3,4 y 5) Producto de amplificación del gen MTHFR de 198 pb.



**Figura 2. Producto de Digestión del fragmento amplificado por PCR.** Se empleó la enzima de restricción Hinf I. posición 1) Marcador de peso molecular de 100 pb; 2, 4, 6) portadores del genotipo CC. 3, 5, 7, 8) portadores del genotipo CT. 9 y 10) portadores del genotipo TT.

**Tabla 1. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C677T del gen de la MTHFR en pacientes con TEA y Controles.**

	TEA	Control	OR (IC 95%)	p
<b>Genotipo</b>				
TT	5 (8,06%)	7 (10,45%)	0,64 (0,18-2,27)	>0,05
CT	27 (43,55%)	33 (49,25%)	0,74 (0,36-1,52)	>0,05
CC	30 (48,39%)	27 (40,30%)	1,00	>0,05
<b>Alelo</b>				
C	87 (70,2%)	87 (64,9%)	1,00	
T	37 (29,8%)	47 (35,1%)	0,78 (0,45-1,37)	>0,05

OR, Odds ratio; IC, Intervalo de confianza.

Se muestran en paréntesis el número de veces que se repite el alelo o el número de individuos portadores del genotipo para el sitio polimórfico estudiado.

**Tabla 2. Frecuencias genotípicas del polimorfismo C677T del gen de la MTHFR y severidad del TEA en pacientes con TEA**

	Leve	Moderado +Severo	OR (IC 95%)	p
<b>Genotipo</b>				
CC	17 (60,7%)	13 (38,2%)	1,00	
CT+TT	11 (39,3%)	21 (61,8%)	2,497 (0,79-7,97)	0,044

OR, Odds ratio; IC, Intervalo de confianza.

Se muestran en paréntesis el número de veces que se repite el alelo o el número de individuos portadores del genotipo para el sitio polimórfico estudiado.

En la figura 1 se muestra el producto de amplificación del gen de la MTHFR obtenido por el método de PCR, con una longitud de 198 pb en gel de agarosa al 2% y teñido con bromuro de etidio; la migración electroforética se realizó a 100 mV por 30 minutos y fue visualizado y fotografiado con cámara digital, equipo Uvitec (Gel Documentation Uvitec Limited) BIORAD.

En la figura 2 se observan los fragmentos del producto de la digestión del gen de la MTHFR por el método de RFLP, con la enzima de restricción HinfI. La migración electroforética se realizó en un gel de poliacrilamida al 10% a 200 V por 40 minutos, coloreado con nitrato de plata y visualizado y fotografiado con equipo Uvitec (Gel Documentation Uvitec Limited) BIORAD.

**Frecuencia del polimorfismo C677T del gen MTHFR**

En el grupo estudiado la distribución genotípica del polimorfismo C677T del gen MTHFR, se encontró en equilibrio de Hardy Weinberg ( $X^2 = 0,136918$  y un  $p = 0,711364$ ).

En la tabla 1 se observa la frecuencia genotípica del polimorfismo C677T del gen de la MTHFR de los niños con TEA y los controles. En el grupo de niños estudiados se observó la presencia de los tres genotipos posibles C/C, C/T y T/T; en los niños con TEA, la mayor frecuencia se observó para el genotipo C/C (48,39%), seguido por el genotipo C/T (43,55%), el genotipo con la menor frecuencia fue el T/T (8,06%). Y en el grupo de niños control, la mayor frecuencia se observó para el genotipo C/T (49,25%), seguido por el genotipo C/C (40,30%), el genotipo con la menor frecuencia fue el T/T (10,45%).

Los análisis estadísticos muestran que no existe diferencia significativa ( $p = 0,64$ ) entre la distribución de los diferentes genotipos del gen de la MTHFR de los pacientes con respecto al grupo control. Tanto para el genotipo CT como para el genotipo TT el valor de OR es inferior a 1, por lo tanto, no se encontró asociación entre las variables.

Tomando en consideración la clasificación de los niños según la severidad de los TEA se encontró que los niños que presentaban TEA moderado + severo tienen un predominio del factor de riesgo (CT+TT) con 61,8% y con un OR de 2,497 (IC 95% = 0,79 - 7,97;  $p < 0,05$ ), mientras que los niños que presentaban TEA leve presentaron un predominio del genotipo CC con 60,7 %, evidenciando que existe una diferencia estadística significativa al comparar la severidad del TEA con los genotipos estudiados (tabla 2).

## DISCUSIÓN

Se acepta que el autismo tiene una etiología compleja y extremadamente heterogénea en donde existe un apoyo variable para un amplio espectro de hipótesis sobre sus causas, desde estudios que demuestran que los genes juegan un rol importante en el riesgo del TEA más que en cualquier otro trastorno neuropsiquiátrico común, hasta estudios que involucran factores ambientales con modificaciones epigenéticas (3,4,7).

Según los resultados del estudio, más de las dos terceras partes de los niños diagnosticados eran del sexo masculino, con una razón 5:1, es decir, por cada mujer hay aproximadamente 5 hombres con TEA. Este aumento de la prevalencia masculina ha sido frecuentemente reportado en varios trastornos del desarrollo neurológico, lo que sugiere el hecho de un modelo de protección femenina. A favor de esta conclusión se ha publicado en la revista "American Journal of Human Genetics" un estudio donde se analizaron muestras de ADN y un conjunto de datos de secuenciación de una cohorte formada por aproximadamente 16 mil personas con trastornos del desarrollo neurológico, encontrando que las mujeres que tienen TEA requieren mutaciones genéticas más extremas que los hombres para producir los síntomas, lo que sugiere que su umbral para la protección contra las mutaciones es mayor, respaldando así el hecho de que existe un "modelo de protección de las mujeres" en las enfermedades neurológicas (12).

En este estudio se investigó un gen clave en el metabolismo del folato, el cual se ha demostrado que forma parte de una diversidad de genes importantes que están involucrados en el autismo, el gen MTHFR (3). Algunos estudios han informado que este gen y sus polimorfismos están asociados con la susceptibilidad a desarrollar TEA así como estar implicado en otros trastornos del neurodesarrollo. Sin embargo, los mecanismos por los que los polimorfismos del gen de la MTHFR son considerados como factor de riesgo para el autismo aún no están claros. Muchos estudios sugirieron que el autismo puede estar asociado con anomalías metabólicas en la vía de folato / homocisteína, que está involucrado en la metilación del ADN, alterando así la expresión génica. Uno de los polimorfismos más importantes en esta ruta es el polimorfismo C677T del gen MTHFR, porque el alelo T está asociado con una disminución en la actividad enzimática (35-70%) (13).

En el presente estudio, los resultados del análisis del gen MTHFR muestran una distribución similar del polimorfismo C677T en niños con TEA y niños control, es decir, no existe diferencia significativa en la distribución de estos polimorfismos. Estos resultados estuvieron de acuerdo con el estudio de Dos Santos y col, los cuales demostraron que la distribución genotípica del polimorfismo C677T del gen MTHFR fue similar en ambos grupos (pacientes y controles). Del mismo modo estudiaron ciertos patrones conductuales y los asociaron con los genotipos CC, CT y TT; en donde tampoco observaron diferencias significativas. De esta forma, dicho estudio realizado en el sur de Brasil demostró que el polimorfismo C677T del

gen de la MTHFR no constituye un factor de riesgo para el padecimiento de TEA (13). Así mismo, Sener y col en su grupo de estudio de 98 pacientes con autismo y 70 controles no encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para este polimorfismo; y si bien, el genotipo heterocigoto se asoció con un riesgo de 1.3 veces para el autismo; este no fue estadísticamente significativo, por lo cual concluyeron que deben ser estudiados otros polimorfismos del gen de la MTHFR tales como el A1298C u otros en la vía del folato/homocisteína para mostrar su posible papel en el autismo (3).

Por otra parte, Delshadpour y col analizaron el polimorfismo C677T del gen MTHFR en pacientes autistas del norte de Irán. El estudio se llevó a cabo en 171 varones autistas (diagnosticados según criterios del DSM-4 y evaluados por la Escala de Puntuación de Autismo Infantil (CARS)) y 198 individuos sanos. Los análisis estadísticos arrojaron que tanto las frecuencias de los genotipos CC, CT y TT, como las frecuencias alélicas de C y T en los niños autistas con respecto al grupo control no fueron significativas y por ende concluyen que dicho polimorfismo no está asociado con el autismo en la población de estudio (14).

Paşca y col estudiaron el polimorfismo C677T del gen MTHFR en tres grupos de niños: los diagnosticados con autismo (n=15), síndrome de asperger (n=3) y trastornos generalizados del desarrollo no especificados (n=19) y sus respectivos controles de edad y sexo (n=25). Los resultados revelaron una distribución normal del polimorfismo C677T en niños con TEA sin diferencias estadísticas en la distribución de los genotipos (pacientes y controles); no obstante, la frecuencia del alelo T fue ligeramente mayor en pacientes autistas con respecto a los otros grupos, por lo que dichos investigadores reportaron que existía un posible papel de este polimorfismo en las alteraciones del metabolismo de carbono en la fisiopatología de los TEA (4).

En una población China, la frecuencia del genotipo TT del gen MTHFR para el polimorfismo C677T fue significativamente mayor en niños con autismo (16,1%) que en controles (8,6 %); mientras que el resto de la distribución alélica y genotípica no presentaba una diferencia significativa. De acuerdo con este hallazgo, Guo y col, sugirieron que el polimorfismo C677T del gen MTHFR es un factor de riesgo para pacientes autistas en su población (15). En otro estudio, el grupo de casos comprendió 100 pacientes con diferentes trastornos neurológicos tales como síndrome de Down, enfermedad de Alzheimer y Autismo y 100 individuos sanos. Mientras que la frecuencia de los alelos C y T era similar en el síndrome de Down y la enfermedad de Alzheimer sin diferencia estadística significativa, se encontró que la frecuencia del alelo T para el polimorfismo C677T del gen MTHFR era más alta en niños autistas en comparación con niños no autistas con un riesgo 4,47 veces mayor de autismo. De esta forma determinan que existe una asociación positiva entre el polimorfismo C677T y el riesgo de padecer autismo (16).

Park y colaboradores probaron las asociaciones de dos po-

limorfismos de un solo nucleótido en el gen MTHFR: C677T y A1298C con el Trastorno del Espectro Autista en una población coreana. Un total de 251 pacientes con TEA y 425 controles participaron en el estudio. Los genotipos heterocigotos 677CT / 1298AC, se asociaron con un aumento del riesgo de TEA en 2,1 veces en el grupo masculino en comparación con los genotipos 677CC y 1298AA del mismo grupo. Sin embargo, no se pudo encontrar ningún resultado significativo en el grupo de mujeres. Probablemente debido al pequeño número de muestras (17).

La asociación entre el polimorfismo C677T del gen de la MTHFR y el riesgo a padecer autismo sigue siendo controvertido y ambiguo. Una de las razones es que la distribución del alelo 677C>T mostró variaciones regionales y étnicas (18). Por ejemplo, en Venezuela, se encontró una alta proporción de las variantes 677CT y 677TT de la MTHFR (63,6%) con una frecuencia aproximada del genotipo homocigoto TT del 17% en dicho grupo (19). En las Américas, la frecuencia del genotipo homocigoto TT fue más alto en México (32%), intermedio en Atlanta (Estados Unidos) (11% entre los blancos), y algo menor en Alberta (Canadá) (6%). En Europa fue más alto en Italia (26%), mientras que en España, Francia y Hungría fue intermedio (10-12%), y una menor prevalencia se encontró en Finlandia, Helsinki y el norte de los Países Bajos (4 % y 6%, respectivamente). Una baja frecuencia también se encontró en África (3%), por lo que podemos concluir que este genotipo varía según la etnia y según la ubicación geográfica (18).

Este es el primer estudio que compara la severidad del TEA con el polimorfismo C677T del gen de la MTHFR y se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa al observar que los niños con diagnóstico moderado + severo presentaron una mayor frecuencia de los genotipos CT+TT vs la frecuencia observada en el grupo con diagnóstico de TEA leve, en donde en este último predominaba el genotipo CC. De esta forma, al emplear el modelo dominante se evidencia que existe una asociación entre el polimorfismo C677T del gen de la MTHFR y la severidad del TEA, la cual puede atribuirse a la incapacidad que presentan los portadores del genotipo de riesgo TT + CT de convertir eficazmente el 5,10 MTHF a 5-MTHF, los cuales a su vez presentarían más problemas de comportamiento y/o conductas más severas que los niños con la variante de tipo salvaje homocigota 677C (20).

## CONCLUSIÓN

El polimorfismo C677T del gen de la MTHFR representa un posible factor de riesgo asociado a la severidad del TEA.

## AGRADECIMIENTOS

El proyecto fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) Proyecto de Grupo N° 09-00-8202-2013, por el Ministerio del Poder Popular para

Ciencia, Tecnología e Innovación diciembre 2014, la Coordinación de Investigación de la Facultad de Medicina y AIVEPET. Agradecimiento especial a: AIVEPET, a los padres o representantes de los niños incluidos en el estudio, a la Unidad de Autismo de la Maternidad Concepción Palacios “Negra Matea” y al Colegio La Patria de Bolívar.

## REFERENCIAS

1. Baxter A, Brugha T, Erskine H, Scheurer R, Vos T, Scott J. The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. *Psychol Med* 2015; 45: 601–613.
2. Oviedo N, Manuel L, Chesnaye E, Guerra C. Aspectos genéticos y neuroendocrinos en el trastorno del espectro autista. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2015; 72 (1): 5-14.
3. Sener E, Didem B, Yusuf O. MTHFR Gene C677T Polymorphism in Autism Spectrum Disorders. *Genet Res Int* 2014;1-6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/698574> [citado 12 febrero 2017].
4. Paşca S, Dronca E, Kaucsár T, Crăciun E, Endreffy E, Ferencz B, et al. One carbon metabolism disturbances and the C677T MTHFR gene polymorphism in children with autism spectrum disorders. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 4229-4238
5. Nawal B, Abdellatif A, Houssine A, Abdenbi B, Abdelilah L, Amal E.J, et al. Thermolabile Methylene tetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism and Homocysteine Are Risk Factors for Coronary Artery Disease in Moroccan Population. *J Biomed Biotechnol* 2007; 1-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1852902/pdf/JBB2007-80687.pdf> [citado 12 febrero 2017].
6. Divyakolu S, Tejaswini Y, Thomas W, Thumaju S, Ramana V, Vasavi M, et al. Evaluation of C677T Polymorphism of the Methylene tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene in various Neurological Disorders. *J Neuro Disord* 2013; 2: 1-4. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/db23/9826e3c575547df5042a86ed9f50674cf607.pdf> [citado 21 enero 2017].
7. The World Medical Association Ethics Unit. Declaration of Helsinki. Disponible en: <http://www.wma.net/e/ethicsunit>. [citado 21 enero 2017].
8. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V)*. 5th Edition. Washington, DC: American Psychiatric Association; 2013.
9. Lord C, Rutter M, DiLavore P, Risi S, Gotham K, Bishop S. ADOS-2. Escala de Observación para el Diagnóstico del Autismo - 2. Manual (Parte I): Módulos 1-4. TEA Ediciones. Madrid 2015, pp. 11-216.
10. Welsh KI, Bunce M. Molecular typing for the MHC with PCR-SSP. *Rev Immunogenet* 1999;1:157-176.
11. Frosst P, Blom H.J, Milos R, Goyette P, Sheppard C.A, Matthews R.G, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylene tetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-113.
12. Jacquemont S, Coe B, Hersch M, Duyzend M, Krumm N, Bergmann S, et al. A Higher Mutational Burden in Females Supports a “Female Protective Model” in Neurodevelopmental Disorders. *Am J Hum Genet*. 2014; 94: 415-425.
13. Dos Santos P, Longo D, Carneiro A, Schüller L. MTHFR C677T is not a risk factor for autism spectrum disorders in South Brazil. *Psychiatr Genet* 2010; 20:187–189.
14. Delshadpour M, Mashayekhi F, Bidabadi E, Shahangian S, Salehi Z. MTHFR rs1801133 Gene Polymorphism and Autism Susceptibility. *Caspian J Neurol Sci* 2017; 3: 39-45.
15. Guo T, Chen H, Liu B, Ji W, Yang C. Methylene tetrahydrofolate

- Reductase Polymorphisms C677T and Risk of Autism in the Chinese Han Population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 2012; 16: 968-973.
16. Divyakolu S, Tejaswini Y, Thomas W, Thumoju S, Ramana V, Vasavi M, et al. Evaluation of C677T Polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene in various Neurological Disorders. *J Neurol Disord* 2013; 2: 1-4.
  17. Park J, Ro M, Pyun J, Kwack K, Chung J. MTHFR 1298A>C is a risk factor for autism spectrum disorder in the Korean population. *Psychiatry Res* 2014; 215: 258–259.
  18. Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, et al. Geographical and ethnic variation of the 677C > T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J Med Genet* 2003; 40:619–625.
  19. Vizcaíno G, Diez M, Herrmann F, Schuster G, Torres E, Arteaga M. La homocisteinemia y su relación con el polimorfismo de la metilentetrahidrofolato reductasa en varios grupos étnicos del occidente de Venezuela. *Invest. Clín* 2005; 46: 347-355.
  20. Goin-Kochel R, Porter A, Peters S, Shinawi M, Sahoo T, Beaudet A. The MTHFR 677C-T Polymorphism and Behaviors in Children with Autism: Exploratory Genotype-Phenotype Correlations. *Autism Research* 2009; 2: 98–108.