



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA
VARIANTE C677T DEL GEN *MTHFR* EN DIFERENTES
ESTADOS DE LA REPÚBLICA MEXICANA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

ERENDIRA ARGÜELLES OVIEDO

ASESOR: DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**
Frecuencia y distribución geográfica de la variante C677T del gen MTHFR en diferentes estados de la República Mexicana

Que presenta la pasante: **Erendira Argüelles Oviedo**
Con número de cuenta: **30229724-9** para obtener el Título de: **Química Farmacéutica Bióloga**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 27 de febrero de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Dr. Osvaldo M. Mutchinick Baringoltz	
SECRETARIO	Q. Arcadia Hernández Beltrán	
1er SUPLENTE	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
2do SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

El presente trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición “Salvador Zubirán” bajo la dirección del Dr. Osvaldo M. Mutchinick Baringoltz jefe del departamento de Genética.

DEDICATORIA

Hasta la mariposa al surgir de la crisálida necesita de un impulso para emprender el vuelo.

Así, este logro recibió toda la fuerza de personas muy importantes.

A mis padres Guadalupe y Porfirio por estar siempre a mi lado y a mi hermana Betty por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mis papas gracias por darme la vida, por saber que siempre estarán a mi lado para darme la fortaleza para cumplir mis sueños, por levantarme cuando me he caído, por creer en mí en todo momento, por ser mi ejemplo a seguir, estoy muy orgullosa de ustedes, gracias por amarme incondicionalmente yo también los amo.

Mamá gracias por amarme desde el día que supiste de mi existencia, por enseñarme que con amor se logran muchas cosas.

Papá gracias por enseñarme que la fuerza, el coraje pero sobre todo la perseverancia son los elementos para cumplir las metas.

A mi hermana Betty gracias por ayudarme cuando más lo he necesitado, por ser más que una hermana una amiga, por todo lo vivido, pero sobre todo por estar siempre a mi lado para cuidarme, te amo.

A mi sobrina Ximenita, gracias por llegar a mi vida para alegrarla, por todas las risas y felicidad que me has brindado, te adoro.

A mis abuelitos Nila y Cirenio, gracias por amarme y cuidarme desde el día que nací, por ser unos padres para mí, por apoyarme siempre, pero sobre todo por su ejemplo y sus enseñanzas, los amo.

A mi tía Tere gracias por ser como una madre para mí, por escucharme cada vez que lo necesito, por tu apoyo incondicional y por la fuerza que me das, te amo. A mi tío Carlos y a mi prima Yetzin gracias por ser como una segunda familia para mi, los quiero.

A Juan Carlos gracias por ayudarme a lograr mis sueños, por ser un motivo para ser mejor, por todo lo feliz que me haces, por llegar a mi vida en el momento indicado para darme tu amor, gracias por cuidarme y protegerme, amor te amo.

A mis tías Silvia y Adriana, gracias por estar a mi lado apoyándome, por su amor y a mis primos Rebe y Lalo gracias por todas esas experiencias y por estar en los momentos importantes, los quiero.

A mis abuelitos Conchita y Pedro, gracias porque no permitieron que la distancia nos alejara, por todos sus consejos y por el amor que me brindaron durante el tiempo que estuvimos juntos, los quiero.

A mi tía Josefa gracias por darme tu cariño y apoyo, a mis primos Sol, Estrella y Diego gracias por todas las aventuras que vivimos desde niños, por crecer juntos, por contar con ustedes y por todos mis sobrinos, los quiero.

A la UNAM por que en sus instalaciones he crecido en todos los aspectos, he aprendido todo lo que se y he conocido todo lo que me apasiona, mi carrera.

A mis profesores gracias por enseñarme y guiarme, principalmente a la Dra. Sandra, y a las profesoras Rosalba, Maritere y Arcadia por su tiempo en la revisión de este trabajo, y por su apoyo.

A los profesores Rene Miranda y Juan José Díaz por ayudarme a concluir mi carrera sin ustedes esto no sería posible, en verdad muchas gracias.

A Bertha gracias por tu amistad, te quiero.

Al Dr. Osvaldo Mutchinick gracias por creer en mi desde un principio, por su apoyo y por lo aprendido, por brindarme las herramientas necesarias para que esto fuera posible, por abrirme las puertas de su departamento para iniciar mi vida profesional.

A Betty gracias por tu paciencia para enseñarme y por tu ayuda para la revisión de este trabajo, pero aun mas importante gracias por brindarme tu amistad.

A Leo gracias por tu contribución a este trabajo y tus palabras.

A Yevgeniya y Luis gracias por enseñarme lo poco que se y por su amistad.

A todos los miembros del departamento de Genética, pero principalmente a Geno, Pili, Miguel, Cris y Miriam por su ayuda y consejos, por su cariño, pero aun más por preocuparse por mí.

A todos ustedes este logro también es suyo...

ÍNDICE

	PÁGINA
1. ABREVIATURAS	7
2. ÍNDICE DE FIGURAS	9
3. ÍNDICE DE TABLAS	10
4. RESUMEN	11
5. ANTECEDENTES	13
5.1. Metabolismo de un solo carbono	13
5.2. Metilendetetrahidrofolato reductasa (MTHFR)	16
5.2.1. Gen <i>MTHFR</i> y sus variantes	16
5.2.2. Frecuencia de la variante C677T del gen <i>MTHFR</i> en diversas poblaciones	18
5.3. Importancia clínica y epidemiológica de la variante C677T del gen <i>MTHFR</i>	19
5.3.1. Enfermedad cardiovascular	22
5.3.2. Defectos de cierre de tubo neural	23
5.3.3. Labio y paladar hendido	26
5.3.4. Hipertensión	27
5.3.5. Preeclampsia	27
5.3.6. Trombosis	28
5.3.7. Síndrome de Down	30
5.3.8. Cáncer	31
5.3.9. Esquizofrenia	32
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
7. JUSTIFICACIÓN	36
8. OBJETIVOS	37
9. HIPÓTESIS	38
10. MATERIAL Y MÉTODOS	38
10.1. Población de estudio	38
10.1.1. Recolección de la muestra	38
10.1.2. Criterios de selección	38
10.1.3. Tamaño de la muestra	39
10.2. Métodos de análisis de laboratorio	39
10.2.1. Extracción de ADN	39
10.2.2. Cuantificación de ADN	40
10.2.3. Amplificación mediante PCR y evaluación electroforética de los productos	40
10.2.4. Genotipificación por RFLPs y electroforesis	40
10.2.5. Análisis estadístico	41
11. RESULTADOS	42
11.1. Genotipificación de la variante C677T del gen <i>MTHFR</i>	42
11.2. Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante C677T del gen <i>MTHFR</i>	42
11.3. Equilibrio de Hardy-Weinberg	45
11.4. Comparación de la frecuencia alélica de la variante C677T del gen <i>MTHFR</i> entre diferentes regiones geográficas de la República Mexicana	46
12. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	50
13. CONCLUSIONES	53
14. ANEXOS	54
14.1. Cálculo de frecuencias alélicas y genotípicas	54
14.2. Cálculos del equilibrio de Hardy-Weinberg	55
14.3. Reactivos y soluciones	56
15. BIBLIOGRAFIA	59

1. ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ATP: Adenosin trifosfato

BCS: Baja California Sur

CBS: Cistationina β sintetasa

CC: Genotipo homocigoto para el alelo C del gen *MTHFR*

CCR: Cáncer colon rectal

CT: Genotipo heterocigoto para los alelos C y T del gen *MTHFR*

DHF: Dihidrofolato

DHFR: Dihidrofolato reductasa

dNTPs: Desoxiribonucleótidos trifosfato

dTMP: Timidilato

DTN: Defectos del tubo neural

dUMP : Deoxiuridilato

EDTA: Etilendiaminotetraacetato de sodio dihidratado

FAD: Flavin adenin dinucleótido

LL/PH: Labio leporino con o sin paladar hendido

LRT: Prueba de razón de verosimilitud

MSI: Microsatélites inestables

MSS: Microsatélites estables

MTHF: Metilenetetrahidrofolato

MTHFD1: Metilenetetrahidrofolato dehidrogenasa

MTHFR: Metilenetetrahidrofolato reductasa

MTR: Metionina sintetasa

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

PANSS: Escala de síndromes positivo y negativo

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RFLP's: Polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción

RM: Razón de momios

RNA: Ácido ribonucleico

RYVEMCE: Registro y Vigilancia Epidemiológica de Malformaciones Congénitas

SAM: S-adenosilmetionina

SHMT1: Serina citoplasmática hidroximetiltransferasa

SUMO: Pequeño modificador parecido a la ubiquitina

TBE: Solución de Tris-Boratos-EDTA

THF: Tetrahidrofolato

TT: Genotipo homocigoto para el alelo T del gen *MTHFR*

TYMS: Timidilato sintetasa

VV: Genotipo homocigoto para el alelo V del gen *ACE*

2. ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1: Metabolismo de un solo carbono mediado por folato.	15
Figura 2: A) Localización del gen <i>MTHFR</i> en el brazo corto del cromosoma 1 en la región 1p36.3. B) Estructura del gen <i>MTHFR</i> .	17
Figura 3: Fragmento de 142pb de <i>MTHFR</i> digerido con la enzima <i>Taq 1</i> .	41
Figura 4: Patrón electroforético de la digestión con <i>Taq 1</i> del amplificado de 142 pb.	42
Figura 5: Representación gráfica de las frecuencias genotípicas de la variante C677T del gen <i>MTHFR</i> en 12 estados de la República Mexicana.	44
Figura 6: Representación gráfica de la frecuencia del alelo T del gen <i>MTHFR</i> en 12 estados de la República Mexicana.	45
Figura 7: Distribución de la variante C677T del gen <i>MTHFR</i> en diferentes estados de la República Mexicana.	48

3. ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1: Frecuencias alélicas y genotípicas de la variante C677T del gen <i>MTHFR</i> en diversas poblaciones de diferente origen étnico.	19
Tabla 2: Frecuencias alélicas y genotípicas de la variante C677T del gen <i>MTHFR</i> en 12 estados de la República Mexicana.	43
Tabla 3: Determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg en los estados estudiados.	46
Tabla 4: Comparación de las frecuencias alélicas de la variante C677T del gen <i>MTHFR</i> entre estados que conforman las diferentes regiones geográficas.	47
Tabla 5: Comparación de las frecuencias del alelo T de la variante C677T del gen <i>MTHFR</i> entre las diferentes regiones geográficas.	49
Tabla 6: Reactivos para la preparación del gel de agarosa al 3%.	57
Tabla 7: Reactivos para la preparación de la solución de EDTA 0.5 M pH 8.0.	58
Tabla 8: Reactivos para la preparación de la solución de bromuro de etidio al 1%.	58
Tabla 9: Reactivos para la preparación de la solución amortiguadora Tris- Boratos-EDTA (TBE) 10X.	58

4. RESUMEN

La enzima 5,10-metilenetetrahidrofolato reductasa (MTHFR) participa en el metabolismo de los folatos y de la homocisteína, catalizando la reducción del 5,10-MTHF a 5-MTHFR, importante en la regulación de la síntesis de nucleótidos y de las reacciones de metilación. El gen *MTHFR* presenta una variante molecular frecuente, la sustitución C677T (Ala222Val) que en estado homocigoto resulta en una enzima termolábil con una actividad de tan solo el 30% comparada con el homocigoto CC. Diversos estudios han demostrado que el homocigoto TT tiene un riesgo aumentado para la ocurrencia de ciertas malformaciones congénitas, en especial defectos del tubo neural, cardiopatías y cáncer entre otros. En estudios previos realizados en diversos estados del país, se han observado diferencias en cuanto a la prevalencia del alelo T principalmente entre la zona norte y el resto del país. El objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia y variación geográfica de la variante C677T del gen *MTHFR* en 12 estados de la República Mexicana. Para ello, se analizaron muestras de ADN de recién nacidos de los estados de Aguascalientes, Baja California Sur, Campeche, Coahuila, Durango, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Quintana Roo y Sinaloa. Se seleccionaron 50 muestras de niños y 50 muestras de niñas por estado. El ADN se obtuvo a partir de gotas de sangre preservada en papel filtro. La identificación de la variante se realizó mediante PCR-RFLP. Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de la variante, así como el equilibrio de Hardy-Weinberg en cada una de las poblaciones. Se compararon las frecuencias observadas entre los diferentes estados y mediante el uso de estadística no paramétrica se identificaron diferencias estadísticamente significativas. Se observó que las frecuencias genotípicas de la variante C677T en los 12 estados estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg. La frecuencia del genotipo TT en el total de los estados analizados fue de 28% con una frecuencia alélica de 0.52. Con respecto a la distribución de los genotipos en las poblaciones estudiadas, el homocigoto TT fue más frecuente en Puebla (50%), y menos frecuente en Sinaloa (12%). Al hacer una comparación entre regiones, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la frecuencia del alelo T en la región norte y las frecuencias de las regiones

occidente ($\chi^2=9.817$; $p=0.002$), centro ($\chi^2=48.346$; $p<0.001$) y sureste ($\chi^2=17.570$; $p<0.001$) del país, debido a una menor frecuencia del alelo T en la zona norte. Por otro lado, se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre la frecuencia del alelo T de la región occidente y de la región centro ($\chi^2=6.247$; $p=0.012$) (Tabla 5) debido a una mayor frecuencia del alelo T en la zona centro. Los resultados de este estudio mostraron una marcada diferencia en la frecuencia del alelo T en la región norte del país, encontrándose disminuida comparada con el resto del país. Estas diferencias en la frecuencia del alelo T indican una heterogeneidad regional en la población de México. Este trabajo confirma los resultados de estudios previos donde se reporta una menor frecuencia del alelo T en los estados de la zona norte del país comparada con las demás regiones. Por otra parte, la frecuencia alta de la variante C677T en la población mexicana comparada con diversas poblaciones alrededor del mundo, hacen de éste un marcador importante en el estudio de los factores de riesgo genético para malformaciones congénitas y algunas enfermedades crónico-degenerativas con alta prevalencia en nuestro país y que se encuentran relacionadas con alteraciones en el metabolismo de los folatos.

5. ANTECEDENTES

5.1. Metabolismo de un solo carbono

El metabolismo de un solo carbono consiste en un sistema de rutas interdependientes que forman una red de reacciones bioquímicas que participan en la transferencia de moléculas de un solo carbono, importantes para el metabolismo de los folatos, la homocisteína, la síntesis de ADN, principalmente para la síntesis de timidilato y purina, los cuales son necesarios para el mantenimiento de la integridad genómica, así como para diversas reacciones de metilación (Hazra, 2009; Tibbets, 2010).

El folato es una vitamina soluble del complejo B que está presente en las células como un grupo de cofactores que participan en el metabolismo de un solo carbono. El folato activado por un carbono es necesario para la síntesis de novo de las purinas y timidilato, también para la remetilación de homocisteína a metionina. La metionina es un aminoácido esencial para la síntesis de proteínas y puede ser adenosilada a S-adenosilmetionina (AdoMet o SAM), necesaria en la síntesis de poliaminas y en numerosas reacciones de metilación dependientes de SAM como: las proteínas, incluyendo las histonas, las bases de citosina en el ADN, los neurotransmisores, los fosfolípidos y varias moléculas pequeñas (Stover, 2009).

Las rutas metabólicas dependientes del folato están compartimentalizadas en la célula y aproximadamente el 40% del folato total se encuentra en las mitocondrias. Una función principal del metabolismo de un solo carbono en las mitocondrias es generar unidades de un carbono en forma de formiato para el metabolismo de un carbono en el citoplasma. Los aminoácidos serina, glicina, dimetilglicina y sarcosina se catabolizan en la mitocondria para producir formaldehído, el cual es condensado con tetrahidrofolato (THF) generando metilene-THF. El formaldehído activado con metilene-THF es oxidado, formando 1-formil-THF, que sirve para formilar Met-tRNA para la síntesis de proteínas mitocondriales, o alternativamente, 10-formil-THF se hidroliza en THF y formiato, que entran en el citoplasma (Stover, 2009).

En el citoplasma, las unidades de folato activado de un carbono funcionan en una red anabólica interdependiente que comprende tres rutas biosintéticas: la síntesis de novo de purinas, que requiere 10-formil-THF para los carbonos C2 y C8 del anillo de purina, la biosíntesis de novo de timidilato, que necesita metilene-THF para la metilación reductora de deoxiuridilato (dUMP) para formar timidilato (dTMP) y la remetilación de la homocisteína a metionina, la cual requiere 5-metil-THF. El formiato entra a la mezcla del folato activado de un solo carbono a través de una conversión ATP dependiente de 10-formil-THF, catalizada por 10-formil-THF sintetasa, la cual es codificada por *MTHFD1*. La biosíntesis de purina dependiente de 10-formil-THF ocurre solo cuando los nucleótidos no están disponibles a través de la síntesis de purina mediante la ruta de recuperación. Recientemente se ha demostrado que las enzimas que participan en la biosíntesis de novo de las purinas están presentes en un complejo llamado purinosoma, formado solo cuando las purinas exógenas no están disponibles. El 10-formil-THF es también otra fuente de derivados de folatos de un solo carbono. La fracción formil del 10-formil-THF puede ser reducida a metilene-THF por la metililtetrahydrofolato dehidrogenasa (también codificada por *MTHFD1*) en una reacción NADPH dependiente. Alternativamente, el metilene-THF (y la glicina) pueden ser generados en el citoplasma a partir de serina y THF en una reacción catalizada por la serina hidroximetiltransferasa codificada por *SHMT1*. El metilene-THF es un cofactor para la metilación del dUMP a dTMP en una reacción catalizada por timidilato sintetasa que es codificada por *TYMS*. En esta reacción, metilene-THF sirve como donador de un carbono (en forma de formaldehído) y THF sirve como donador de dos electrones, lo que genera dihydrofolato (DHF). La dihydrofolato reductasa, codificada por *DHFR*, cataliza la conversión NADPH dependiente de DHF a THF y regenera la funcionalidad de THF como cofactor. Por otra parte, la fracción de un carbono de metilene-THF puede ser reducida a 5-metil-THF en una reacción NADPH dependiente, catalizada por metilene-tetrahydro reductasa, codificada por *MTHFR*. 5-metil-THF sirve como donador de un carbono para la conversión de homocisteína a metionina, vitamina B12 dependiente en una reacción catalizada por metionina sintetasa, la cual es codificada por *MTR* (Ho, 2010; Stover, 2009).

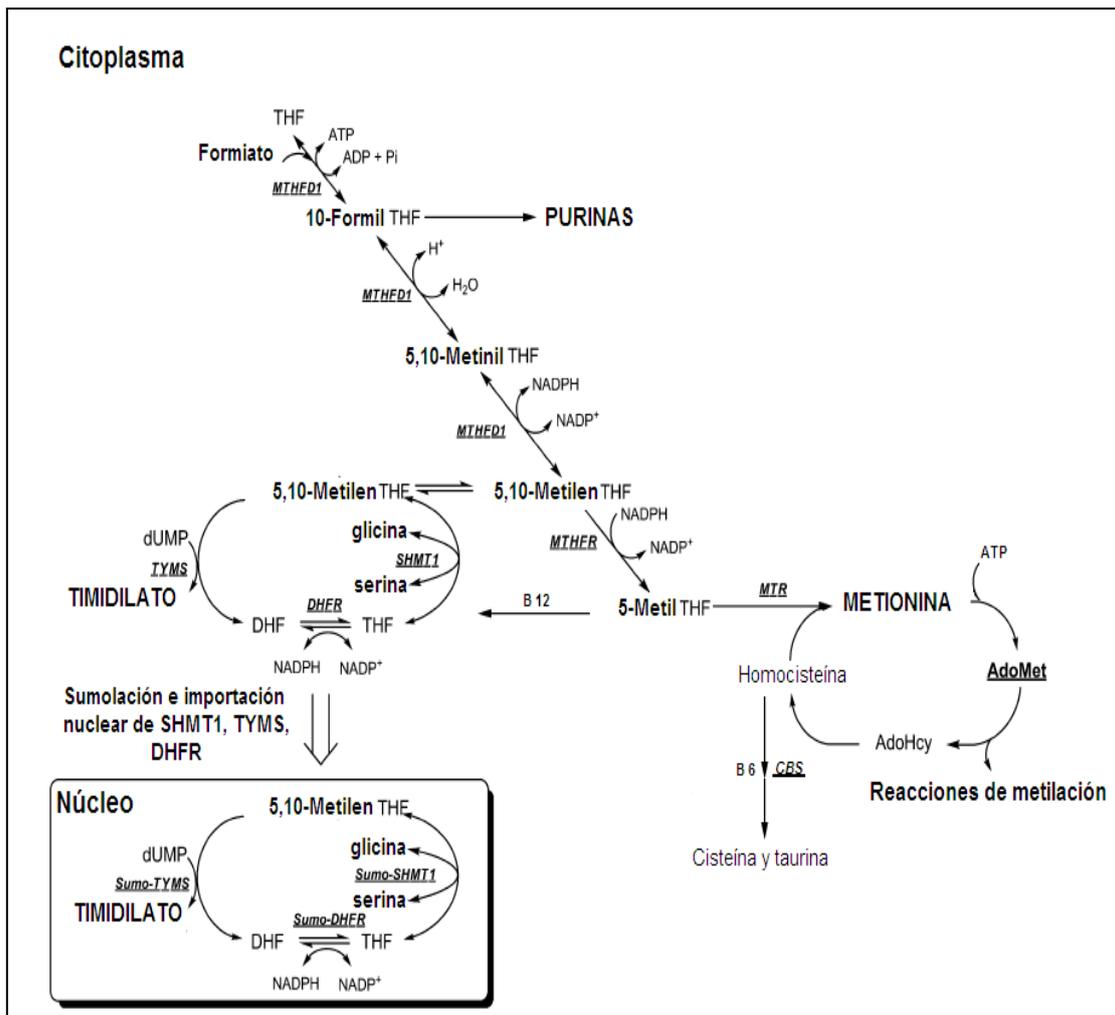


Figura 1. Metabolismo de un solo carbono mediado por folato. El folato activado de un solo carbono es utilizado en la síntesis de purinas y timidilato (dTMP) y en la metilación de homocisteína a metionina. **THF**: tetrahydrofolato; **MTHFD1**: metilene tetrahydrofolato dehidrogenasa; **MTR**: metionina sintetasa; **MTHFR**: metilene tetrahydrofolato reductasa; **SHMT1**: serina citoplasmática hidroximetiltransferasa; **TYMS**: timidilato sintetasa; **DHFR**: dihidrofolato reductasa; **CBS**: cistationina β sintetasa. Referencia: Stover P., 2009.

También existe evidencia de que la biosíntesis de novo del timidilato se produce por un complejo multienzimático. Además, las enzimas envueltas en esta ruta tienen función tanto en el citoplasma como en el núcleo. Aproximadamente 10% del folato celular se encuentra en el núcleo y recientemente se ha demostrado que el metabolismo de un solo carbono mediado por el folato ocurre en el núcleo. Durante la fase S del ciclo celular, las enzimas TYMS, SHMT1, SHMT2 y DHFR que constituyen la vía de novo dTMP, sufren modificaciones postranscripcionales por el pequeño modificador parecido a la ubiquitina (SUMO) para una posterior importación nuclear. Existe la evidencia que indica que la síntesis de dTMP ocurre en el núcleo durante la

síntesis del ADN y la posibilidad de que la síntesis de dTMP dependiente de folato no suceda en el citoplasma (Stover, 2009).

5.2. Metilendetrahydrofolato reductasa (MTHFR)

La enzima metilendetrahydrofolato reductasa (MTHFR) es una flavoproteína de 77kDa que está constituida por dímeros, cada uno de ellos están unidos por una unión no covalente a un dinucleótido adenosin-flavin (FAD). Cada monómero contiene un dominio catalítico N-terminal que se une al cofactor FAD y el dominio regulatorio C-terminal está unido a la enzima alostérica SAM con actividad regulatoria e inhibitoria en respuesta a los niveles de metionina en la célula. En cada monómero, el dominio catalítico se encuentra en la posición 677 y el dominio regulatorio en la 1298. (Langevin et al., 2009; Martínez-Frías et al., 2008; Molloy et al., 2009).

La homeostasis intracelular del folato depende de la MTHFR que cataliza la reducción irreversible de la 5,10-metilendetrahydrofolato (5,10-metileneTHF) a 5-metiltetrahydrofolato (5-metilTHF) (Figura 1), la principal forma circulante de folato. El sustrato 5,10-metileneTHF es el donador de metilos para la metilación no reversible de deoxiuridina-5-monofosfato a deoxitimidina-5-monofosfato (timidilato). El 5,10-metileneTHF puede ser oxidado a 10-formilTHF. Por lo tanto, 5,10-metileneTHF es crítico para el mantenimiento del balance de nucleótidos para la síntesis de ADN. El 5-metilTHF, producto de la MTHFR, provee los grupos metilo para la remetilación de la homocisteína a metionina, garantizando así el suministro de SAM (Figura 1) (Sohn et al., 2009).

5.2.1. Gen *MTHFR* y sus variantes

El gen que codifica para la enzima MTHFR está localizado al final del brazo corto del cromosoma 1 en la región 1p36.3 de la posición 11845787 a la posición 11866115. Tiene un tamaño de 13 kb y consta de 11 exones (Taioli et al., 2009).

La región reguladora del gen *MTHFR* humano, contiene regiones promotoras tipo caja CAAT y CG además de regiones para otros elementos asociados al promotor (SP1, AP1, AP2). A pesar de la presencia de estas regiones reguladoras carece de una secuencia consenso para caja TATA (Hombarger et

al, 2000). El análisis de la estructura genómica completa sugiere que ocurre una iniciación alternativa de corte y empalme, explicando lo que se ha reportado en análisis de Western blot donde pueden encontrarse dos isoformas: un polipéptido de 77 kDa en la mayoría de los tejidos y una de 70 kDa en el hígado. Homberger y colaboradores, han reportado que existen cuatro variantes del polipéptido: MTHFR1 (dos formas), MTHFR2 y MTHFR3. Todas las variantes son idénticas en 3', pero diferentes en la región 5' indicando la diferencia en el inicio alternativo. Las dos formas de MTHFR 1 parecen ser el resultado de un corte y empalme alternativo con la diferencia en la presencia o ausencia de tres nucleótidos (Homberger et al, 2000).

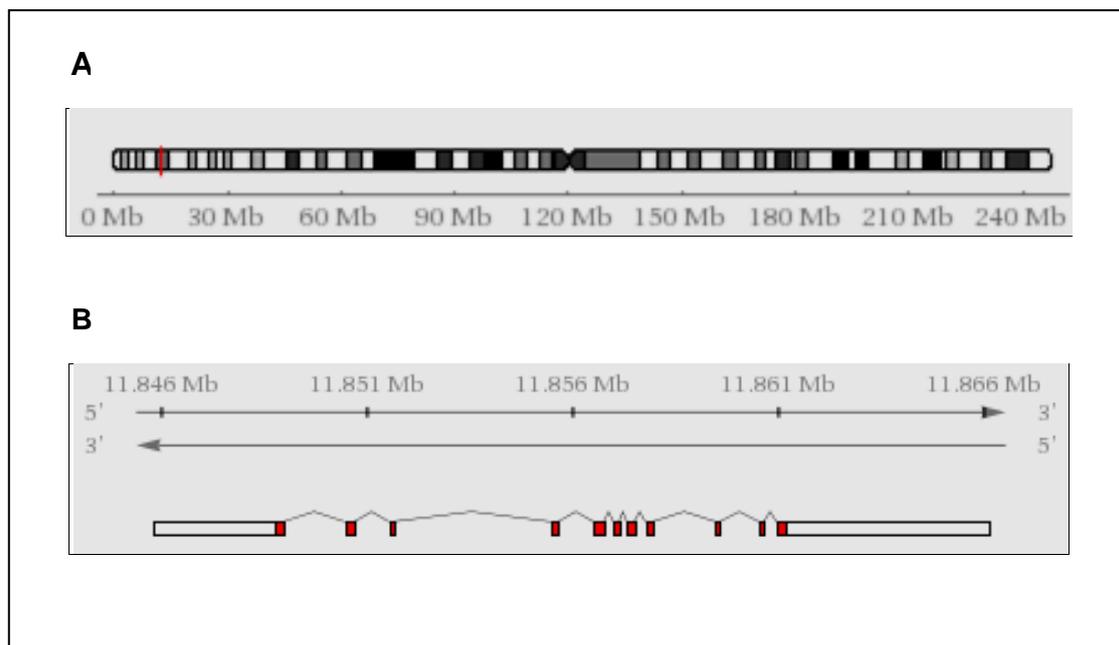


Figura 2. A) Localización del gen *MTHFR* en el brazo corto del cromosoma 1 en la región 1p36.3. B) Estructura del gen *MTHFR*.

Aproximadamente se han descrito 60 polimorfismos, así como 41 mutaciones poco frecuentes pero deletéreas para *MTHFR*. Frosst y colaboradores en 1995 fueron los primeros en clonar el gen de esta enzima y describir el polimorfismo C677T (rs1801133), que es la variante funcional más común y la más estudiada, e implica una transición de un citosina (C) por una timina (T) en el exón 4 del nucleótido 677 del gen *MTHFR*, resultando la conversión de una alanina por un valina en el codón 222 de la región catalítica

de la enzima (Frosst et al., 1995; Maruti et al., 2009; Langevin et al., 2009). La proteína Glu429Ala tiene propiedades desde el punto de vista bioquímico indistinguibles a la proteína silvestre; Ala222Val MTHFR es propensa a disociarse en monómeros y a perder el cofactor FAD en disolución, el resultado es la pérdida de actividad en presencia de metiltetrahidrofolato o S-adenosilmetionina. Este fenotipo es suficientemente adecuado para hacer predicciones en estudios donde se compara la forma silvestre de *Escherichia coli* con la mutante Ala177Val, homóloga a la mutante humana Ala222Val (Guenther et al., 1999).

Los heterocigotos (CT) y los homocigotos mutantes (TT) para la variante C677T tienen respectivamente 65% y 30% de actividad enzimática de MTHFR, con respecto a los homocigotos silvestres (CC) (Boccia et al., 2008; Boyles et al., 2008); como resultado los homocigotos TT se han correlacionado con el incremento de la termolabilidad y reducción de la actividad de MTHFR y por consecuencia con niveles plasmáticos elevados de homocisteína y niveles bajos de folato (Langevin et al., 2009).

5.2.2. Frecuencia de la variante C677T del gen *MTHFR* en diversas poblaciones

Es posible que el polimorfismo C677T sea producto de una mutación ancestral debido a que está fuertemente asociado a un haplotipo común del gen. Su distribución en todo el mundo es muy heterogénea, no obstante la frecuencia de la variante C677T varía de acuerdo al origen étnico, como se observa en la tabla 1.

Wilcken y colaboradores (2003) estudiaron la distribución geográfica y étnica del polimorfismo C677T en el gen MTHFR en más de 7,000 recién nacidos de 16 áreas de Europa, Asia, América, medio Oriente y Australia. El genotipo TT es particularmente común en el norte de China (20%), sur de Italia (26%) y México (32%). También hubo evidencia de gradientes geográficos en Europa (de norte a sur un incremento) y en China (de norte a sur un decremento). La frecuencia del genotipo TT fue baja en los recién nacidos de ascendencia africana, intermedia entre los recién nacidos de origen europeo y alta entre los recién nacidos de ascendencia hispanoamericana. Las áreas en

los extremos de la distribución de la frecuencia mostraron desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (Helsinki, sur de Italia y sur de China). Los resultados sugirieron la existencia de fuerzas selectivas que conducen a la variación marcada.

Tabla 1. Frecuencias alélicas y genotípicas de la variante C677T del gen *MTHFR* en diversas poblaciones de diferente origen étnico.

Población de estudio	n=	Frecuencias genotípicas			Frecuencia del alelo T
		CC	CT	TT	%
<i>Europa</i>					
Italia, Campania	500	172	196	132	46.0
Italia, Sicilia	468	138	236	94	45.3
Italia, Véneto	385	128	198	59	41.0
Francia, Estrasburgo	178	72	85	21	35.7
Espanoles, Blancos	601	265	265	71	33.9
Hungría	378	165	171	42	33.7
Países Bajos	188	97	79	12	27.4
Rusia	587	312	234	41	26.9
Finlandia, Helsinki	545	293	230	22	25.1
<i>Asia</i>					
China-Norte, etnia Han	643	201	315	127	44.2
China-Sur etnia Han	430	167	228	35	34.7
Israel	210	120	72	18	25.7
<i>Oceanía</i>					
Australia, Blancos	228	146	119	23	36.2
<i>América</i>					
México	500	91	248	161	57.0
USA, Hispánicos de Atlanta	62	22	29	11	41.1
USA, Blancos de Atlanta	300	142	126	32	31.7
Canadá-Blancos de Alberta	240	136	90	14	24.6
USA, Asiáticos de Atlanta	26	16	9	1	21.2
USA, Negros de Atlanta	298	231	59	8	12.6
<i>África</i>					
África del oeste*	465	385	76	4	9.0

Referencia: Wilcken et al., 2003 y *Gueant-Rodríguez et al., 2007.

5.3. Importancia clínica y epidemiológica de la variante C677T del gen *MTHFR*

La alteración del metabolismo de un solo carbono provoca la inadecuada disponibilidad del folato y por consecuencia la variación de las enzimas

implicadas en las rutas que comprometen la síntesis de precursores de ADN, la reparación y metilación de ADN.

Recientes estudios bioquímicos y estructurales de *E. coli* han puesto de manifiesto que el polimorfismo C677T permite una disociación más rápida del cofactor de estabilidad FAD, en comparación con el tipo silvestre, lo que provoca la modificación de la termolabilidad y actividad de la enzima. La adecuada concentración de folato protege a la MTHFR de la pérdida del cofactor FAD asegurando la actividad funcional de la enzima. Bajo altas concentraciones de folato la cinética de la variante C677T de *MTHFR* es similar al tipo silvestre, con lo cual se dedujo que sólo cantidades bajas de folato tienen un impacto funcional significativo en dicha variante. Cuando la ingesta de ácido fólico y los nutrientes asociados es baja, la reducción de la estabilidad de la variante C677T resulta en la desactivación de la enzima y la disminución del flujo de 5,10-metileneTHF hacía la metionina. La metilación del ADN podría verse afectada debido a la reducción de los niveles de 5-metilTHF como resultado de un suministro insuficiente de la dieta. De hecho el polimorfismo está asociado con el aumento de concentración de homocisteína en plasma (un indicador indirecto del estado de folato) de aproximadamente 25% (Jonge et al., 2009) e hipometilación de ADN genómico en linfocitos, únicamente en individuos con baja concentración de folato. Por lo tanto, con un consumo alto de folato y cofactores asociados, el flujo de 5,10-metilTHF a 5-metilTHF funcionaria apropiadamente, y los individuos con este polimorfismo tendrían niveles adecuados de SAM para la metilación óptima de ADN.

El daño en el ADN, la inestabilidad genómica y el deterioro en la reparación del ADN son resultado del desequilibrio en el metabolismo del folato, siendo importantes mecanismos de carcinogénesis. Tanto la hipometilación del ADN genómico como la hipermetilación de genes específicos para promotores de islas CpG son mecanismos epigenéticos relacionados a la carcinogénesis. Sin embargo, estos supuestos efectos funcionales de la variante C677T de *MTHFR* aún no han sido claramente demostrados en órganos diana (Sohn et al, 2008). Otra posibilidad es que el nivel bajo de folato o la redistribución de éste puedan también influir en el riesgo de cáncer a través de mecanismos de incorporación de uracilo en el

ADN, que puede dar lugar a roturas de doble cadena y daño cromosómico, debido al aumento de la actividad de la MTHFR que facilita la conversión de 5,10-metilene THF a 5-metil THF, disminuyendo los niveles citosólicos de 5,10-metilene THF que reduce la síntesis de deoxitimidilato monofosfato e incrementa la relación dUMP/dTMP (Langevin et al., 2009). Las variantes genéticas más estudiadas en el metabolismo del folato en relación a la leucemia son la C677T y la A1298C de *MTHFR*. Ambas variantes reducen la susceptibilidad en la edad adulta y la infancia a padecer leucemia linfocítica pero no mieloide. Actualmente por medio de un meta análisis se concluyó que la presencia de 677TT es un efecto protector en la leucemia linfoblástica en edad adulta pero no en la infancia. No obstante, Krajinovic y su grupo demostraron en un estudio de interacción gen-ambiente que los nacidos después de 1996, año en que se implementa la suplementación con ácido fólico en Canadá, pierden el efecto protector (Krajinovic et al., 2004). Asimismo, la variante C677T de *MTHFR* aumenta el riesgo de cáncer gástrico en sujetos con baja concentración de folato (Jonge et al, 2009). Se ha probado que el alcohol actúa como antagonista del folato provocando mala absorción, incremento en la excreción del folato o anomalías en su metabolismo, a través de la inhibición de la metionina sintetasa (MTR). La interacción entre C677T de *MTHFR* y el alcohol ha sido reportado en cáncer de estómago y de colon, el consumo de alcohol está asociado con el incremento del riesgo de cáncer gástrico en sujetos homocigotos TT para *MTHFR* (Langevin et al., 2009; Graziano et al., 2006). Este polimorfismo también está asociado con el riesgo a varios tipos de cáncer incluidos el de próstata, colon, mama y endometrio (Terry et al., 2009; Xu et al., 2007).

En diversos estudios se ha encontrado asociación entre la presencia del polimorfismo C677T y el riesgo de infarto al miocardio, hipertensión y enfermedades cerebrovasculares.

Así mismo la variante genéticas C677T se ha asociado a la fisiopatología de los defectos del tubo neural (DTN) en poblaciones de Polonia, Alemania, Italia y Brasil. En el noroeste de México un análisis de genotipos demostró alta proporción de homocigotos TT en madres que tienen hijos con DTN (39.6 vs 9.1 % en controles; $p < 0.05$). Algunos estudios sugieren la existencia de una

variación geográfica del efecto del polimorfismo en el riesgo de DTN (Candito et al., 2008; Shang et al., 2008). Debido al rol que juega la enzima MTHFR en el metabolismo del folato es muy probable que éste sea un factor de riesgo para DTN, pues mantiene concentraciones bajas de folato y concentraciones elevadas de homocisteína en plasma (Molloy et al., 2009). En México, de acuerdo con los datos del programa de Registro y Vigilancia Epidemiológica de Malformaciones Congénitas (RYVEMCE) la prevalencia de DTN es de 3.5 por 1,000 nacimientos (Mutchinick et al., 1888).

5.3.1. Enfermedad cardiovascular

A partir de estudios de la mutación C677T en pacientes con enfermedades cardiovasculares y controles, Kluijtmans y colaboradores (1996) concluyeron que esta mutación en el gen *MTHFR* en estado homocigoto se asocia con un aumento de tres veces en el riesgo a padecer enfermedad cardiovascular temprana.

Morita y colaboradores (1997) estudiaron 362 pacientes japoneses varones con enfermedad de arteria coronaria confirmada mediante angiograma y 778 controles. En ellos reportaron una frecuencia significativamente elevada del genotipo C677T, correspondiente a la sustitución de una valina, en el grupo con la enfermedad. La asociación fue mayor en los homocigotos que en los heterocigotos, por lo que, Morita y colaboradores concluyeron que el polimorfismo C677T, tal vez sea un factor de riesgo para la enfermedad arterial coronaria, sin embargo, Van Bockxmeer y su grupo (1997) no encontraron relación en un estudio de 555 australianos blancos occidentales con enfermedad de arteria coronaria documentada en angiogramas y 143 controles no relacionados. Schwartz y colaboradores (1997) estudiaron la frecuencia alélica del polimorfismo C677T de *MTHFR* en 69 mujeres blancas no hispanas con antecedentes de infarto al miocardio y 338 controles, encontrando una distribución similar de los alelos en ambos grupos, por lo que concluyeron que este polimorfismo no es un factor de riesgo en el infarto al miocardio en esta población.

Kelly y su grupo (2002) realizaron un meta-análisis para determinar el riesgo a sufrir un accidente cerebrovascular isquémico asociado con

hiperhomocisteinemia y el polimorfismo C677T de *MTHFR*; llegando a la conclusión de que los datos apoyan una asociación entre hiperhomocisteinemia moderada y accidente cerebrovascular isquémico. El genotipo TT tal vez influye mínimamente en determinar la susceptibilidad a presentar accidente cerebrovascular isquémico. De igual forma Klerk y colaboradores (2002) efectuaron un meta-análisis del riesgo a presentar enfermedades coronarias en relación al polimorfismo C677T. En el concluyen que los individuos con el genotipo 677TT tienen un riesgo significativamente mayor para enfermedades coronarias, particularmente en aquellos que se encuentran valores de folato bajos. Estos resultados respaldan la hipótesis de que el metabolismo del folato deficiente resulta en niveles elevados de homocisteína, la cual está relacionada con un riesgo aumentado de enfermedades coronarias.

5.3.2. Defectos de cierre de tubo neural

Motulsky (1996) revisó el posible papel de la homocisteína elevada y los polimorfismos de *MTHFR* específicamente en enfermedades vasculares y defectos del tubo neural. Citó datos de los Centros para el Control de Enfermedades que indican que la administración de ácido fólico antes y durante las primeras cuatro semanas del embarazo puede prevenir 50% o más de los defectos de tubo neural. Mills y su grupo (1995) demostraron que las madres de hijos con defectos del tubo neural tienen elevados los niveles de homocisteína. Además, Van der Put y sus colaboradores (1995) encontraron que la frecuencia de los homocigotos para el polimorfismo de *MTHFR* es de 2 a 3 veces mayor entre las madres holandesas, padres y pacientes con defectos del tubo neural. La baja frecuencia (aproximadamente 1% de homocigotos) para el polimorfismo de *MTHFR* entre la población afroamericana es de cierto interés, pues sugiere una menor incidencia de defectos del tubo neural entre la raza negra. Stevenson y su grupo (1997) citaron observaciones no publicadas indicando que la prevalencia de los DTN en el sur de Carolina es de 16 por cada 10,000 embarazos en blancos y de 10 por cada 10,000 embarazos en negros.

Ou y sus colaboradores (1996) estudiaron cultivos de fibroblastos procedentes de 41 fetos con DTN y compararon estos genotipos con 109

muestras de sangre de la población en general. En ellos demostraron que la homocigocidad para C677T se asocia con un riesgo 7.2 veces mayor de DTN ($p=0.001$). Ellos concluyeron que este polimorfismo puede proporcionar una explicación biológica parcial para la prevención de DTN con ácido fólico. En un estudio de pacientes franceses con diagnóstico prenatal de DTN, Mornet y su grupo (1997) no encontraron una frecuencia más elevada de la mutación C677T en los casos que en los controles. Del mismo modo, Speer (1997) investigó la variante termolábil de *MTHFR* en 65 pacientes americanos caucásicos con DTN lumbosacro y sus padres no afectados, usando tanto un estudio caso-control como el análisis de desequilibrio de ligamiento. No encontró evidencia que apoye que una variación en *MTHFR* es un factor de riesgo significativo para DTN en esta población. De Franchis y colaboradores (1998) estudiaron 203 individuos vivos con espina bífida y 583 controles en Italia. Ellos encontraron asociación entre espina bífida e individuos homocigotos para la mutación C677T ($RM=1.73$) y no hubo incremento del riesgo para pacientes heterocigotos.

Christensen y su grupo (1999) propusieron que el polimorfismo C677T del gen *MTHFR* era el primer factor de riesgo genético para DTN identificado a nivel molecular. El genotipo TT se ha observado con mayor frecuencia en casos con DTN y en sus padres en comparación con los controles (Van der Put et al, 1995, 1997; Whitehead et al, 1995; Ou et al, 1996). Christensen genotipificó y evaluó los niveles de folato en 56 pacientes con espina bífida, 62 madres de los pacientes, 97 niños sin DTN (controles) y 90 madres de los controles para determinar el impacto de estos factores sobre el riesgo de DTN. En 20% de los casos y en el 18% de las madres de casos eran homocigotas para el polimorfismo de *MTHFR*, en comparación con 11% de los controles y 11% de las madres del grupo control, lo que indica que el genotipo mutante confiere un mayor riesgo para DTN. El riesgo se incrementó aun más si tanto la madre como el niño tenían este genotipo. Los niveles de folato fueron menores en los casos y en sus madres, que en los respectivos controles. La combinación del genotipo homocigoto mutante y el nivel bajo de folato en el cuartil mas bajo de la RM confiere una probabilidad de ser un caso de DTN de 13.43, y la probabilidad de 3.28 para tener un hijo con DTN. Christensen

propuso que la interacción genética-nutrición, es decir, el polimorfismo de *MTHFR* y niveles bajos de folato, se asocian con un mayor riesgo para DTN que la variante por sí sola.

Muñoz-Moran y su grupo (1998) estudiaron la evolución de las frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación A222V con la edad, a la que llamaron A225V; en una población sana de 695 individuos del sur de España. Se excluyeron las personas mayores de 40 años para prevenir cambios en la frecuencia debido a la posible implicación de este gen en diferentes patologías y hábitos nutricionales. Todos los individuos fueron genotipificados para el polimorfismo inserción/delección del gen *ACE* para evaluar la homogeneidad en las poblaciones de adultos y jóvenes. Las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo en *ACE* no difirió significativamente entre las dos poblaciones. Inesperadamente ellos encontraron un aumento sustancial en la frecuencia del genotipo homocigoto VV en individuos menores de 20 años. Encontraron un cambio en la frecuencia del genotipo VV de 13% a 26%, que se inició en las personas nacidas entre 1977 y 1982 y que permaneció en este alto porcentaje. También encontraron que la población de la cual se obtuvieron estos individuos estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg. En 1982 el tratamiento temprano con folato para las mujeres embarazadas fue recomendado por el servicio de salud nacional española para prevenir DTN. Muñoz-Moran y su equipo, formularon una hipótesis sobre una asociación entre la suplementación temprana con folato durante el embarazo y el incremento en el número de recién nacidos con el genotipo VV, especialmente en madres VV.

Reyes-Engel y su grupo (2002) evaluaron los polimorfismos C677T y A1298C en el gen *MTHFR* para determinar una posible selección para estos polimorfismos. Con base en pares elegidos al azar y desequilibrio de ligamiento de los dos polimorfismos, se estimó que la tasa de fetos no viables de acuerdo con las combinaciones de estos dos polimorfismos es de 4.63% en el grupo de más de 24 años de edad y 6.31% para el grupo menor de 24 años de edad. Se ha detectado un incremento en la frecuencia de los alelos mutantes en el grupo de edad más joven, coincidiendo con un incremento generalizado de la ingesta de folato en mujeres embarazadas en España. La selección genética detectada conduciría a un aumento en los individuos mutados. El número que

según los autores podría incrementarse 4 veces dentro de 75 años; aunque disminuye en general en los grupos más jóvenes. Los niveles de homocisteína en plasma se muestran incrementados en los individuos de acuerdo al número de mutaciones, especialmente los de alelo T.

5.3.3. Labio y paladar hendido

Shaw y colaboradores (1998) formularon la hipótesis de que los niños homocigotos para el genotipo C677T pueden tener mayor riesgo de presentar labio leporino con o sin paladar hendido (LL/PH) debido a la actividad enzimática disminuida de MTHFR. En su estudio de 310 niños con LL/PH aislados y 383 controles sin anomalías congénitas, el análisis de ADN (el cual se efectuó en muestras de sangre de los recién nacidos) no indicó aumento en el riesgo para LL/PH entre los homocigotos TT, ni tampoco los resultados indicaron una interacción entre el genotipo TT y el uso materno de multivitamínicos en la ocurrencia de LL/PH.

Mills y su grupo (1999) examinaron la prevalencia de la mutación C677T en sujetos con fisura oral de un grupo de apoyo nacional irlandés y en un grupo de controles anónimos seleccionado al azar de un programa de detección neonatal que cubre todos los nacimientos en Irlanda. De los 848 controles, 83 (9.8%) resultaron ser homocigotos TT, este genotipo fue casi 3 veces más común en 27 sujetos (25.9%) con paladar hendido aislado y un poco más común en 66 sujetos con labio leporino con o sin paladar hendido. Cuando los dos grupos con diferentes etiologías se combinaron, la RM fue de 2.06. Así, en la población irlandesa el genotipo homocigoto para el polimorfismo común relacionado con el folato y una MTHFR termolábil, es considerablemente más frecuente en aquellos con paladar hendido aislado y podría ser etiológicamente importante.

Zhu y colaboradores (2006) estudiaron el polimorfismo C677T en 170 tríos (formado por el caso y sus padres) chinos y observaron una moderada asociación entre el polimorfismo y labio/paladar hendido no sindrómico en familias del norte de China pero no en los del sur de China. Los padres heterocigotos en el norte tenían dos veces más probabilidades de transmitir el

alelo T de alto riesgo que los del sur ($RM = 2.24$). Por lo cual sugirieron que puede haber heterogeneidad genética en el desarrollo de labio/paladar hendido no sindrómico entre las poblaciones del Norte y del sur de China.

Mostowska y su equipo (2006) no encontraron asociación significativa entre el polimorfismo C677T y labio/paladar hendido entre 122 mujeres polacas con hijos afectados. En un estudio caso-control de familias brasileñas con LL/PH, Gaspar y su grupo (2004) observaron que con la presencia de un alelo T materno de *MTHFR* había una mayor probabilidad de tener descendencia que tenga el alelo menos común de BCL3 ($RM = 2.3$, IC 95% = 1.1-4.8, $p = 0.03$). Ellos sugirieron que el genotipo de *MTHFR* materno juega un papel importante en la susceptibilidad a presentar LL/PH, pero su efecto teratogénico depende del genotipo de la descendencia.

5.3.4. Hipertensión

Nishio y colaboradores (1996) proporcionaron información de la frecuencia del polimorfismo C677T en la población japonesa. No pudieron encontrar una relación significativa entre el polimorfismo y la hipertensión.

Qian y su grupo (2007) realizaron un meta-análisis de 25 estudios publicados que involucran al polimorfismo C677T de *MTHFR* y más de 2,800 individuos hipertensos de las poblaciones caucásicas y asiáticas, hallando evidencia de una asociación significativa en ambas poblaciones. Los autores sugirieron que dicho polimorfismo es un factor de riesgo independiente para la hipertensión.

5.3.5. Preeclampsia

Sohda y su equipo (1997) encontraron que el alelo T y el homocigoto TT se incrementaron significativamente en un grupo de pacientes con preeclampsia. Ellos concluyeron que la variante C677T del gen *MTHFR* es un factor genético de riesgo para la preeclampsia.

En un estudio de 101 mujeres japonesas, incluidos 73 casos de preeclampsia y 215 controles (embarazo normal), Kobashi y su grupo (2000) no encontraron asociación entre la variante C677T de *MTHFR* y preeclampsia. Estos autores plantearon la hipótesis de que la falta de asociación de la

variante en su población puede ser secundaria a las diferencias en la ingesta de folato y sugieren que los factores dietéticos y/o los niveles de folato deben ser analizados en estudios futuros de la variante C677T de *MTHFR* y la preeclampsia.

5.3.6. Trombosis

Tonetti y su grupo (2002) describieron dos hermanas que eran homocigotas para la mutación C677T y heterocigotas para otras tres mutaciones: dos mutaciones sin sentido heredadas del padre y una mutación en el sitio de corte y empalme (causando salto del exón 6), heredada por la madre. Las anomalías del gen *MTHFR* se hicieron evidentes cuando una de las hermanas, una mujer obesa de 27 años, desarrolló una embolia pulmonar ocho meses después de tomar anticonceptivos orales. Ella tuvo problemas para caminar desde la infancia y había tenido dificultades en la escuela. El examen neurológico reveló signo de Babinski bilateral; la tomografía computarizada reveló una embolia pulmonar bilateral y la ecografía dúplex una trombosis de la vena iliaca izquierda. El tratamiento con fibrinólisis restauró la capacidad cardiopulmonar. Sin embargo, se encontró hiperhomocisteinemia masiva y homocistinuria asociada con hipometioninemia. Ella perdió la orientación progresivamente y tuvo dificultades para caminar. Se diagnosticó una deficiencia de *MTHFR* grave, por lo que fue tratada con ácido fólico, hidroxicobalamina, betaína y fluindiona. Su estado clínico mejoró gradualmente, recuperando las funciones intelectuales superiores. Su hermana de 26 años tenía retraso mental y paso lento. A la edad de 5 años, presentó convulsiones, dificultades para caminar, retraso mental y mostró síndrome piramidal bilateral de las extremidades inferiores. La hiperhomocisteinemia se trató como en su hermana pero sus síntomas no respondieron al tratamiento con ácido fólico. En sus padres, ambos de 54 años de edad, la evaluación neurológica fue normal. El padre había presentado un infarto al miocardio a los 48 años; fue tratado con ácido fólico debido a hiperhomocisteinemia moderada. La madre nunca había experimentado trombosis venosa o arterial, pero fue tratada con ácido fólico por una hiperhomocisteinemia leve.

Queffeulou y colaboradores (2002) reportaron el caso de una trombosis de la arteria renal en un hombre de 42 años, quien era homocigoto para la

mutación C677T y tenía niveles bajos de folato. Ellos sugirieron que el fumar contribuye a la patogénesis de dicha enfermedad.

En un estudio en Grecia de la enfermedad tromboembólica venosa, Zalavras y su grupo (2002) encontraron que el genotipo TT de la variante C677T del gen *MTHFR* era significativamente más frecuente en los pacientes que en los controles, no obstante; ellos no pudieron establecer una asociación con esta enfermedad.

Quere y su equipo (2002) encontraron una fuerte asociación entre las concentraciones del metilfolato en glóbulos rojos y el riesgo para tromboembolia venosa que varía de acuerdo al genotipo de C677T. Su método para medir metilfolato en glóbulos rojos fue criticado.

Lu y su grupo (2002) no lograron encontrar evidencia de que el polimorfismo C677T fuera un factor de riesgo para tromboembolia pulmonar en población china.

Keijzer y colaboradores (2002) concluyeron que tanto la hiperhomocisteinemia debida al polimorfismo C677T como el factor V de Leiden son factores de riesgo para trombosis venosa recurrente. Ellos encontraron que el riesgo de que se presente la trombosis es mayor en individuos que tienen ambos factores de riesgo.

En un estudio en China, Li y su equipo (2002) investigaron el papel de la hiperhomocisteinemia y la variante C677T en pacientes con síndrome Budd-Chiari. Ellos compararon 41 pacientes afectados con 80 controles sanos. Los niveles de homocisteína en el plasma de los hombres fueron significativamente más altos en los pacientes afectados comparados con los controles normales. La frecuencia de los homocigotos TT estaba significativamente incrementada mientras que la frecuencia de los heterocigotos CT no lo estaba, en relación con los controles.

En un meta-análisis de 22 estudios caso-control donde incluyeron 3,387 pacientes adultos blancos; Casas y su grupo (2004) encontraron una asociación estadísticamente significativa entre choque isquémico y la sustitución 677CT ($RM = 1.24$).

5.3.7. Síndrome de Down

Hobbs y colaboradores (2000) encontraron que el polimorfismo C677T para *MTHFR* es más frecuente entre madres de hijos con síndrome de Down que entre madres de controles, con una RM de 1.91. Conjuntamente, los homocigotos para el polimorfismo 66A-G del *MTRR* están independientemente asociados con un incremento de 2.57 veces el riesgo. La presencia de ambos polimorfismos combinados está asociada con un riesgo elevado para síndrome de Down, más que la presencia de uno solo. Los dos polimorfismos aparecen fuera de la actividad multiplicativa. O'Leary y su grupo (2002) examinaron la prevalencia de la variante C677T de *MTHFR* entre 48 madres que tenían un hijo con síndrome de Down y 192 madres controles. La frecuencia del genotipo C677T de *MTHFR* no estaba significativamente elevada en las madres de niños con síndrome de Down ($p=0.74$). Sin embargo, las madres que eran heterocigotas u homocigotas para la variante de *MTHFR* y homocigotas para la variantes 66A-G en *MTRR* tenían 2.98 veces más riesgo de tener un hijo con síndrome de Down ($p = 0.02$).

Stuppia y su equipo (2002) estudiaron la presencia del polimorfismo C677T en 64 madres de hijos con trisomía 21 y 112 madres controles del centro de Italia. La frecuencia del alelo T fue más elevada en las madres controles (48%) que en las madres de niños con trisomía 21 (44%). Los resultados no sustentan la presencia de un riesgo elevado para síndrome de Down entre las portadoras del alelo T en la población italiana.

Hobbs y colaboradores (2002) examinaron la frecuencia de la transmisión de los alelos C y T para *MTHFR* en padres heterocigotos de niños con síndrome de Down en 202 familias caucásicas. Los resultados indicaron que el alelo T fue transmitido a los niños que presentaban síndrome de Down con una tasa significativamente más elevada de lo esperado, basándose en la herencia mendeliana, y la tasa de transmisión del alelo C fue significativamente más baja ($p<0.009$). Los autores también analizaron de forma independiente las frecuencias de transmisión por vía materna y paterna de los alelos, para evaluar el potencial de los efectos relacionados con el origen. Debido a que la gran mayoría de las concepciones con trisomía 21 terminan en la pérdida del

embarazo, Hobbs y su equipo, se preguntaron si la transmisión preferencial observada del alelo T en esta población de nacidos vivos con síndrome de Down podría reflejar una ventaja de supervivencia. Ellos presentaron una interpretación bioquímica de estos resultados en base a una interacción materno-fetal del alelo T de *MTHFR* en el contexto de una sobreexpresión constitutiva de tres copias del gen *CBS* (cistationina beta-sintetasa) en fetos con trisomía 21.

Yanamandra y su grupo (2003) analizaron 22 pacientes caucásicas embarazadas de cariotipo fetal con trisomía 21 y 375 niños caucásicos controles para polimorfismo C677T de *MTHFR*. La frecuencia del homocigoto TT en madres de niños con síndrome de Down fue de 13.6% comparado con 13.3% en madres de los niños controles, y la frecuencia del alelo T mutante fue de 0.364 en madres con hijos con síndrome de Down comparado con 0.356 en los controles ($RM=1$ para ambos). Los autores no encontraron correlación de la frecuencia de los homocigotos TT o del alelo T con los casos prenatales con síndrome de Down.

Entre mujeres turcas; Boduroglu y colaboradores (2004) no logró encontrar una relación estadísticamente significativa entre los polimorfismos 677CT y 1298AC en el gen *MTHFR* y el riesgo de tener hijos con síndrome de Down.

5.3.8. Cáncer

La metilación aberrante del ADN es un rasgo común de las neoplasias humanas. Paz y su grupo (2002) estudiaron la herencia interindividual de la susceptibilidad de los procesos epigenéticos de la hipermetilación de las islas CpG y la hipometilación genómica global, las cuales se observaron simultáneamente en células cancerígenas. Ellos genotipificaron 233 pacientes con tumores colonrectales, de pecho o de pulmones para 4 variantes de líneas germinales en 3 genes involucrados en el metabolismo del grupo metilo. Se encontró una asociación positiva entre la metilación aberrante y el alelo T. La segunda asociación fue la metilación aberrante con el genotipo homocigoto para el alelo 2756G de la metionina sintetasa.

Castro y colaboradores (2004) investigaron el efecto de los polimorfismos 677CT y 1298AC en el estado de la metilación del ADN genómico de leucocitos en 96 sujetos blancos portugueses no relacionados. Los autores encontraron que ambas mutaciones cuando son homocigotas están asociadas con la disminución de la metilación de ADN, sí bien, el efecto está menos marcado para la tranversión 1298AC. El análisis de regresión corroboró que la actividad de *MTHFR* mutante está mediada por el uso de folato. Castro y su grupo sugirieron que el genotipo 1298CC de *MTHFR*, independientemente del uso de folato, y el genotipo 677TT con niveles bajos concomitantes de folato, tal vez sean un factor de riesgo potencial para el estado de las enfermedades asociadas con la hipometilación del ADN.

Hubner y su equipo (2007) analizaron el fenotipo para inestabilidad de microsatélites (MSI) en 1,685 muestras de cáncer colonrectal (CCR) y genotipificaron la variante C677T de la *MTHFR* en el ADN de la línea germinal de todos los casos y 2,692 controles sin cáncer. En comparación con los individuos homocigotos silvestres, aquellos con el genotipo 677TT eran más propensos a tener MSI de microsatélites estables (MSS) en CCR con una *RM* de 1.90. Cuando las frecuencias del genotipo 677CT en casos de CCR con MSS fueron comparadas con los controles, los individuos con un genotipo TT tenían un menor riesgo para cáncer (19%) en comparación con los silvestres CC (*RM* = 0.81). Por el contrario cuando los casos de CRC con MSI fueron comparados con los controles, los pacientes con uno o dos alelos T tenían un riesgo mayor para cáncer (42%; *RM*=1.42). Hubner y su grupo, concluyeron que los individuos homocigotos TT para *MTHFR* tienen mayor probabilidad de desarrollar CRC con MSI que aquellos con el genotipo silvestre, y que éste polimorfismo común tiene influencia diferencial sobre el riesgo para CCR MSS y MSI.

5.3.9. Esquizofrenia

Lewis y su grupo (2005) realizaron un meta-análisis de 6 estudios (1,119 casos y 1,308 controles) que involucran el polimorfismo C677T de *MTHFR* y el riesgo para esquizofrenia. Ellos encontraron que los homocigotos TT tienen un riesgo significativamente elevado (*RM* = 1.48: IC 95% = 1.18-1.86), apoyando

el papel de este gen y del metabolismo del folato como factor de riesgo para esquizofrenia.

Muntjewerff y colaboradores (2005) efectuaron un estudio caso-control donde cuantificaron el riesgo para esquizofrenia en presencia de concentraciones elevadas de homocisteína y del haplotipo 677TT de *MTHFR* en 254 pacientes con esquizofrenia y 414 controles sanos de ascendencia holandesa. Las concentraciones de homocisteína fueron estratificadas en cuartiles, encontrando que el riesgo para esquizofrenia estaba incrementado en el cuarto y tercer cuartil, comparado con el cuartil más bajo ($RM = 3.3$, $IC_{95\%} = 1.2-9.2$; $RM = 3.1$, $IC_{95\%} = 1.2-8.0$ respectivamente). Se observó una relación significativa dosis-respuesta del incremento de los niveles de homocisteína y del incremento del riesgo para esquizofrenia ($p = 0.036$). El genotipo TT está asociado con tener esquizofrenia (RM de 1.6 e $IC_{95\%}$ de 0.96-2.8). El genotipo homocigoto TT comparado con el homocigoto para el alelo C confiere con una RM de 1.3 $IC_{95\%}$ (0.91-1.8). Los niveles elevados de homocisteína y el genotipo TT están asociados con el incremento del riesgo para esquizofrenia. Muntjewerff y su grupo (2006) reportaron en un meta-análisis de estudios retrospectivos de las concentraciones de homocisteína (812 casos y 2,113 controles) para examinar la asociación de la homocisteína y la esquizofrenia. Además, el meta-análisis de 10 estudios (2,265 casos y 2,721 controles) sobre el polimorfismo C677T de *MTHFR* se llevó a cabo para evaluar si esta asociación era causal. El incremento de los niveles de homocisteína (5 micromol/L) está asociado en un 70% $IC_{95\%}$ (27-129) con un riesgo aumentado para esquizofrenia. El genotipo TT está asociado en un 36% $IC_{95\%}$ (7-72) con un riesgo elevado para esquizofrenia comparado con el genotipo CC. Las evidencias de la asociación de la homocisteína con la esquizofrenia y la asociación entre la esquizofrenia y el genotipo homocigoto TT del gen *MTHFR*, apoya la causalidad entre un metabolismo alterado de la homocisteína y el riesgo para esquizofrenia.

En un meta-análisis de la base de datos SzGene (1,211 pacientes y 1,729 controles), Allen y su grupo (2008) encontraron una asociación entre la susceptibilidad para presentar esquizofrenia y dos variantes de *MTHFR*, 677CT

y 2298CT. Los autores notaron que ambas sustituciones reducían la actividad de la enzima MTHFR.

En un estudio de 200 pacientes externos con esquizofrenia, quienes fueron evaluados con la escala de síndromes positivo y negativo (PANSS), Roffman y su equipo (2008) encontraron que las puntuaciones de los síntomas negativos se relacionaron significativamente con la dosis del alelo T, con sujetos T/T que presentaron los síntomas más pronunciados (Prueba de razón de verosimilitud $LRT = 4.18$, $p = 0.041$); la protección contra los síntomas positivos se relaciona con una mayor carga del alelo 677T ($LRT = 5.07$, $p = 0.024$). El efecto del alelo T en la gravedad de los síntomas negativos está correlacionado con los niveles de folato sérico.

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La metilendetrahidrofolato reductasa es una enzima clave en el metabolismo de los folatos y en la síntesis de ADN; el polimorfismo C677T, ocasiona una disminución en su actividad de hasta un 70%. El genotipo homocigoto (677TT) ha sido relacionado con niveles bajos de folato en plasma, homocisteína elevada en plasma, distribución alterada de distintos tipos de folato en las células y aumento del riesgo de tener hijos con defectos de cierre del tubo neural, susceptibilidad a algunos tipos de cáncer, problemas obstétricos en mujeres gestantes y riesgo de padecer enfermedad coronaria, entre otros. Debido a la implicación de dicha enzima en diversas enfermedades se han determinado las frecuencias de la variante C677T en distintas poblaciones para establecer si la presencia de este polimorfismo es un factor de riesgo, no obstante, las investigaciones efectuadas han sido en poblaciones al azar, en el caso de México, se han analizado solo algunas regiones, y solo un trabajo abarca varias regiones geográficas del país, por lo cual es importante analizar todas las áreas geográficas.

7. JUSTIFICACIÓN

Las concentraciones elevadas de homocisteína se han considerado un factor de riesgo para neoplasias, malformaciones congénitas, como los defectos del tubo neural, afecciones cardiovasculares y patologías neuro-psiquiátricas. Actualmente se conoce que las mutaciones en los genes que codifican para las enzimas de las vías metabólicas de la homocisteína pueden ocasionar hiperhomocisteinemia, por lo que diversos estudios se han enfocado en analizar la asociación entre los cambios en la secuencia del genoma como causa de hiperhomocisteinemia. Entre ellos se encuentran las variantes en la secuencia del gen que codifica la enzima metileno-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Hasta el año 2006 se habían descrito 29 variantes o polimorfismos, cuya funcionalidad varía de 13 a 149% de actividad enzimática. El primer polimorfismo identificado fue el cambio de citosina (C) por timina (T) en el nucleótido 677 del gen. Este polimorfismo cambia el aminoácido alanina por valina, con lo que se genera una variante enzimática termolábil cuya actividad está disminuida en más del 50% en estado homocigoto, con la consecuente disminución de los niveles de 5-metiltetrahidrofolato en plasma y un aumento de la homocisteína. La actividad también está disminuida aunque en mucho menor grado, en los individuos heterocigotos. Se ha reportado que la población mexicana es una de las de mayor prevalencia de la variante T y del genotipo TT en diversos grupos étnicos. La heterogeneidad en la frecuencia poblacional de nuestro país y la importancia que esta variante tiene como factor de riesgo en enfermedades de alta morbilidad y mortalidad, nos lleva a analizar su prevalencia en diferentes estados de la República Mexicana.

8. OBJETIVOS

8.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de la variante C677T del gen *MTHFR* en muestras de recién nacidos vivos originarios de 12 estados de la República Mexicana, mediante la técnica de PCR-RFLPs, para conocer su distribución geográfica.

8.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar la determinación genotípica de la variante C677T del gen *MTHFR* por medio de la técnica de PCR-RFLPS en muestras de recién nacidos vivos originarios de los estados de Aguascalientes, Baja California Sur, Campeche, Coahuila, Durango, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Quintana Roo y Sinaloa, para calcular su frecuencia.
- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas para la variante C677T del gen *MTHFR* por el cálculo del porcentaje de individuos de cada genotipo que están presentes en los estados analizados.
- Determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg de las frecuencias genotípicas obtenidas en cada uno de los estados estudiados, utilizando la prueba de chi cuadrada de bondad de ajuste para evaluar si la población cumple con este criterio.
- Identificar diferencias estadísticamente significativas en la distribución geográfica de la variante C677T del gen *MTHFR*, entre los estados analizados y las zonas geográficas a las que pertenecen, a través el uso de estadística no paramétrica para conocer la heterogeneidad de la población analizada.

9. HIPÓTESIS

Sí existe heterogeneidad regional en la población mexicana, habrá diferencia en las frecuencias de la variante C677T del gen *MTHFR* en los estados analizados, por lo que será posible encontrar diferencias entre la población de los estados y las zonas geográficas estudiadas.

10. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente es un estudio descriptivo de tipo transversal retrospectivo.

10.1. Población de estudio

Recién nacidos vivos de ambos sexos originarios de diferentes estados de la República Mexicana.

10.1.1. Recolección de la muestra

Personal especializado en tamiz neonatal tomó muestras de sangre periférica del talón de recién nacidos vivos de 12 estados de la República Mexicana: Aguascalientes, Baja California Sur (BCS), Campeche, Coahuila, Durango, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Quintana Roo y Sinaloa.

10.1.2. Criterios de selección

a) Inclusión: se incluyeron recién nacidos vivos originarios de diversas zonas de la República Mexicana que participaron en el “Programa de detección de hipotiroidismo congénito” y de quienes se obtuvieron los siguientes datos en su ficha de identificación:

- Número de identificación de la muestra
- Estado de la República Mexicana
- Jurisdicción o zona geográfica a la que pertenece el hospital de donde provino la muestra
- Datos del recién nacido:
 - Sexo
 - Peso al nacer
 - Edad gestacional

- Estado de salud al nacimiento
- Presencia de malformaciones congénitas
- Signos de hipotiroidismo
- Datos de la madre:
 - Edad
 - Presencia de enfermedad tiroidea

b) Exclusión: se excluyeron aquellas muestras de recién nacidos que no cumplieron con todos los datos demográficos y clínicos.

10.1.3. Tamaño de la muestra

Se recolectaron 1200 muestras de recién nacidos vivos (50 de sexo masculino y 50 de sexo femenino por cada estado).

10.2. Métodos de análisis de laboratorio

10.2.1. Extracción de ADN

Se recortaron dos discos de 3 mm del papel filtro en donde se encontraban preservadas las muestras. Los discos fueron colocados en un microtubo de 600µL y se adicionaron 400 µL de solución de purificación (DNA Purification Solution, QIAGEN®) dejando incubar la muestra durante 15 minutos a temperatura ambiente; al término de este tiempo se retiró la solución con una micropipeta. Se efectuó un lavado más con la misma solución de purificación. Posteriormente se añadieron 400µL de isopropanol, incubando 1 minuto a temperatura ambiente y lavando por pipeteo para eliminar la solución. El lavado con isopropanol se repitió 2 veces más. Los discos se secaron en un concentrador al vacío (Speed Vac, Eppendorf®) durante 25 minutos, una vez secos fueron transferidos a un microtubo limpio. Se hizo otro lavado con 300 µL de una solución de elusión (Elution Buffer AE, QIAGEN®) que además permitió preservar el ADN evitando la hidrólisis del mismo, se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y con una micropipeta se desechó el buffer AE sucio. Finalmente los discos se incubaron a 99°C por 15 minutos con 200 µL de solución de elusión AE. El eluido se recuperó en un microtubo limpio.

10.2.2. Cuantificación de ADN

Para determinar la concentración y calidad del ADN extraído se realizó una cuantificación por espectrofotometría en el NANODROP® a una longitud de onda de $\lambda=260\text{nm}$. La determinación se realizó utilizando como blanco la solución de elusión AE.

10.2.3. Amplificación mediante PCR y evaluación electroforética de los productos

Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó un fragmento de 142 pb del exón 5 del gen *MTHFR* que abarca el nucleótido de interés en la posición 677. Para la mezcla de reacción se utilizaron 20 ng de ADN, en una reacción que contenía 1.5 mM de MgCl_2 , 1X de buffer para la Taq polimerasa, 0.2 mM de dNTPs, 0.1 mM de cada primer (sentido 142F 5'-GAAGCAGGGAGCTTTGAGGCTGACCT-3' y antisentido 142R 5'-TGATGCCCATGTCTGGTGCATGCCT-3'), 1U de la enzima Taq polimerasa en un volumen final de 20 μL . La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador BIORAD® bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos con desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineamiento a 63°C por 1 minuto y elongación a 72°C por 1 minuto además de un paso de elongación final a 72°C por 8 minutos.

La calidad de los productos de amplificación se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

10.2.4. Genotipificación por RFLPs y electroforesis

La variante C677T de *MTHFR* genera un sitio de restricción para la enzima *Taq I*, de tal manera que el genotipo de cada muestra se determinó mediante el análisis de polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) (Figura 3). La genotipificación del polimorfismo se realizó mediante una digestión enzimática a 65°C por 4 horas donde se emplearon 10 μL de ADN amplificado, buffer para la enzima a una concentración 1X, albúmina sérica bovina al 1% y 10 unidades de la enzima de restricción *Taq I* en un volumen final de 20 μL . Los productos de digestión se separaron por

electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio que se visualizó en un transiluminador.

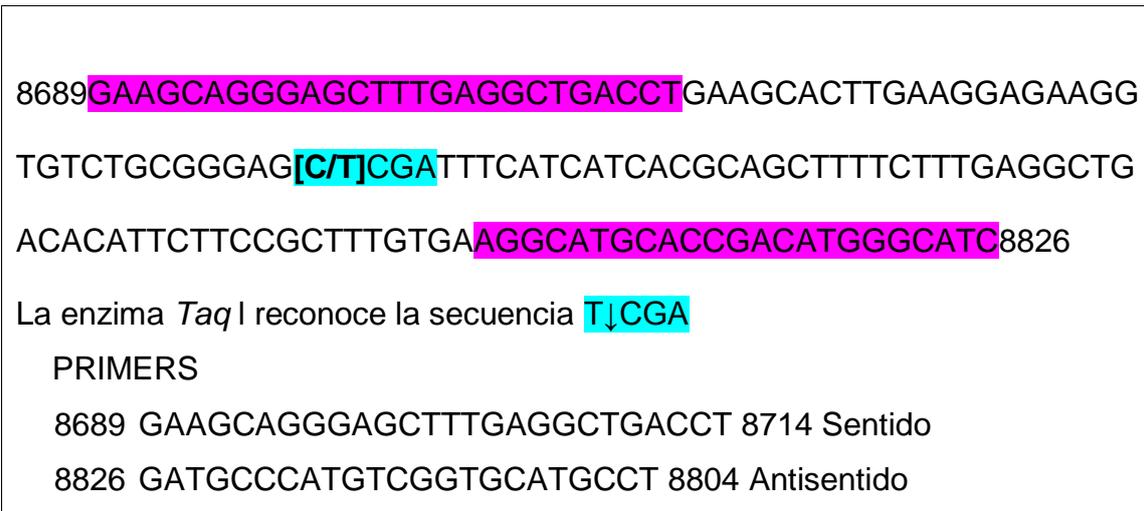


Figura. 3 Fragmento de 142pb de *MTHFR* digerido con la enzima *Taq I*

El cambio C→T de la variante C677T de *MTHFR* genera un sitio de restricción para la enzima *TaqI* que reconoce la secuencia T↓CGA y genera dos fragmentos de restricción, uno de 84 y uno de 58 pb, así se pudieron identificar dos bandas correspondientes al genotipo homocigoto mutante (TT), una sola banda de 142pb correspondiente al homocigoto silvestre (CC) y tres bandas de 142pb, 84pb y 58pb que definieron al genotipo heterocigoto (CT).

10.2.5. Análisis estadístico

Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas para la variante C677T de *MTHFR* en cada estado analizado. Se realizó la determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba de Chi cuadrada de bondad de ajuste comparando las frecuencias genotípicas observadas con las frecuencias genotípicas teóricas esperadas de cada uno de los estados. Se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas de la variante C677T entre cada uno de los estados estudiados y las zonas geográficas a las que pertenecen a través de una prueba de Chi cuadrada.

11. RESULTADOS

11.1. Genotipificación de la variante C677T del gen *MTHFR*

La genotipificación de la variante C677T de *MTHFR* se realizó a partir de la digestión de un amplificado de 142 pb con la enzima *Taq I*. La identificación de los diferentes genotipos para *MTHFR* se pudieron observar mediante la electroforesis, como se muestra en la figura 4. En el caso del genotipo silvestre (CC), éste se puede identificar en el gel como una banda de 142pb la cual no fue digerida por la enzima, mientras que para el genotipo mutante (TT), la enzima generó fragmentos de 84pb y 58pb. Para el genotipo heterocigoto (CT) se observaron bandas de 142pb, 84pb y 58pb.

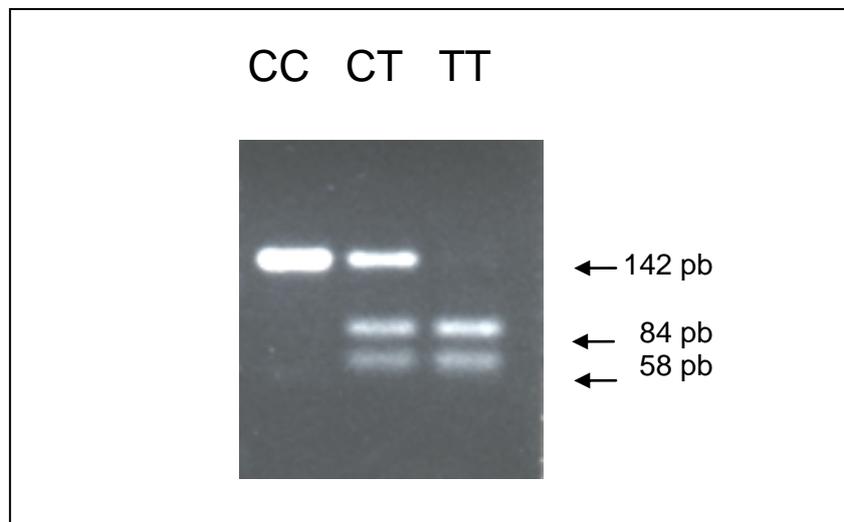


Figura. 4. Patrón electroforético de la digestión con *TaqI* del amplificado de 142 pb

11.2. Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante C677T del gen *MTHFR*

La genotipificación de la variante se efectuó en 1200 muestras, 600 niños y 600 niñas de 12 estados de la República Mexicana correspondientes a las zonas norte, occidente, centro y sureste del país.

Una vez genotipificada la variante C677T del gen *MTHFR*, se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de cada estado, como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas de la variante C677T del gen *MTHFR* en 12 estados de la República Mexicana.

Región geográfica	Estado	Frecuencia Genotipos			Frecuencia Alelo T	IC 95%
		CC	CT	TT		
Norte	Sinaloa	0.43	0.45	0.12	0.35	0.28-0.42
	Durango	0.30	0.55	0.15	0.43	0.36-0.50
	Baja California Sur	0.31	0.46	0.23	0.46	0.39-0.53
	Coahuila	0.26	0.52	0.22	0.48	0.41-0.55
Occidente	Aguascalientes	0.26	0.47	0.27	0.51	0.44-0.58
	Guanajuato	0.17	0.57	0.26	0.55	0.48-0.62
Centro	Querétaro	0.22	0.48	0.30	0.54	0.47-0.61
	Estado de México	0.16	0.56	0.28	0.56	0.49-0.63
	Hidalgo	0.11	0.52	0.37	0.63	0.56-0.70
	Puebla	0.14	0.36	0.50	0.68	0.62-0.74
Sureste	Quintana Roo	0.19	0.54	0.27	0.54	0.47-0.61
	Campeche	0.20	0.45	0.35	0.58	0.51-0.65
TOTAL		0.23	0.49	0.28	0.52	0.46-0.60

n = 100 individuos por estado

La frecuencia promedio del genotipo TT en los 12 estados analizados fue de 28% con una frecuencia alélica promedio de 0.52. En la figura 5 se muestra gráficamente que el genotipo TT fue más frecuente que el genotipo CC en la mayoría de los estados analizados, observándose la mayor frecuencia en Puebla (0.50); sin embargo, en los estados de la zona norte fue menos frecuente, particularmente en Sinaloa (0.12). Con respecto a la distribución de los alelos en las poblaciones estudiadas, el alelo T fue más frecuente en Puebla (0.68) y menos frecuente en Sinaloa (0.35), comparado con el resto de los estados (Figura 6).

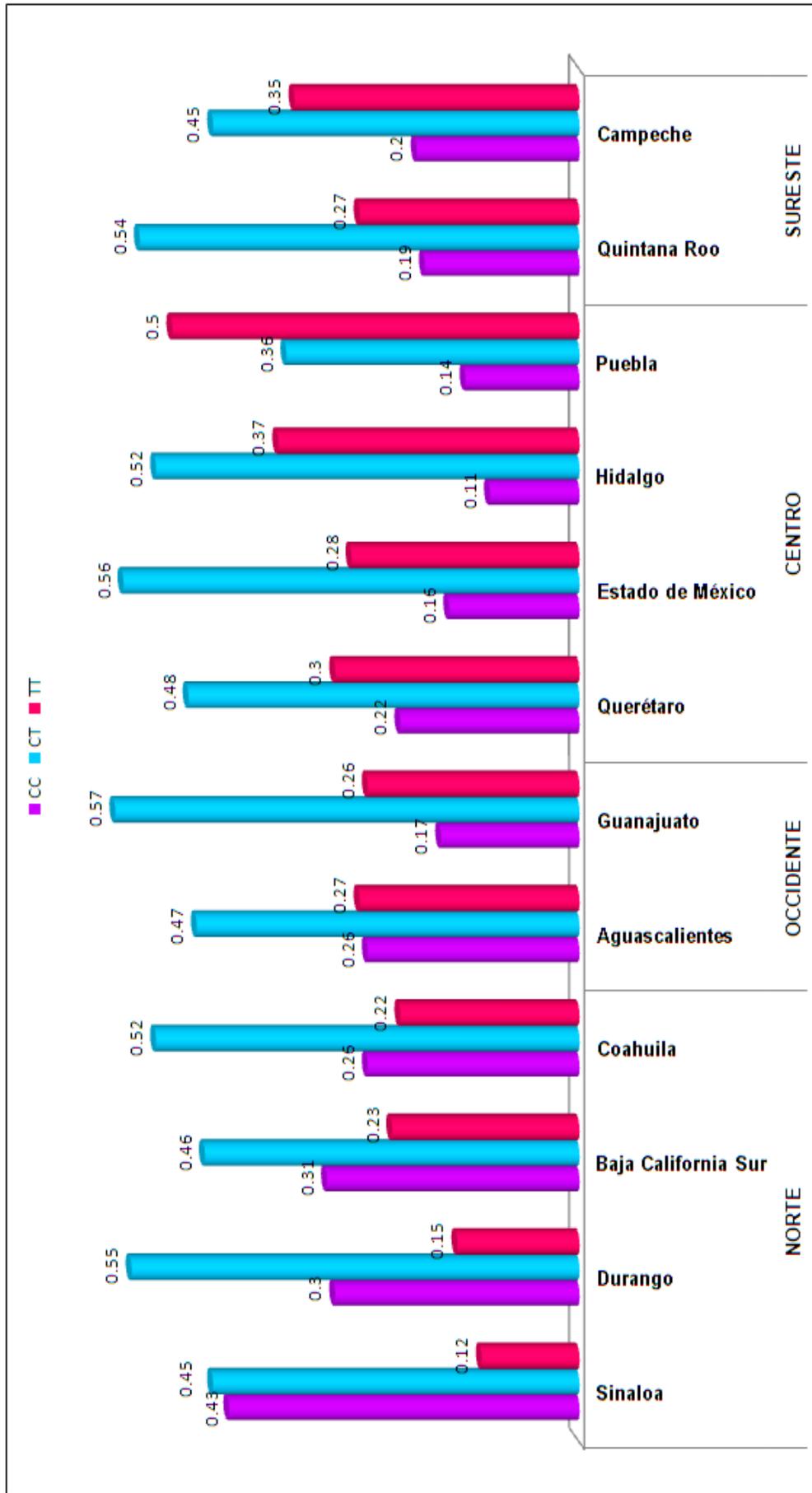


Figura. 5 Representación gráfica de las frecuencias genotípicas de la variante C677T del gen *MTHFR* en 12 estados de la República Mexicana.

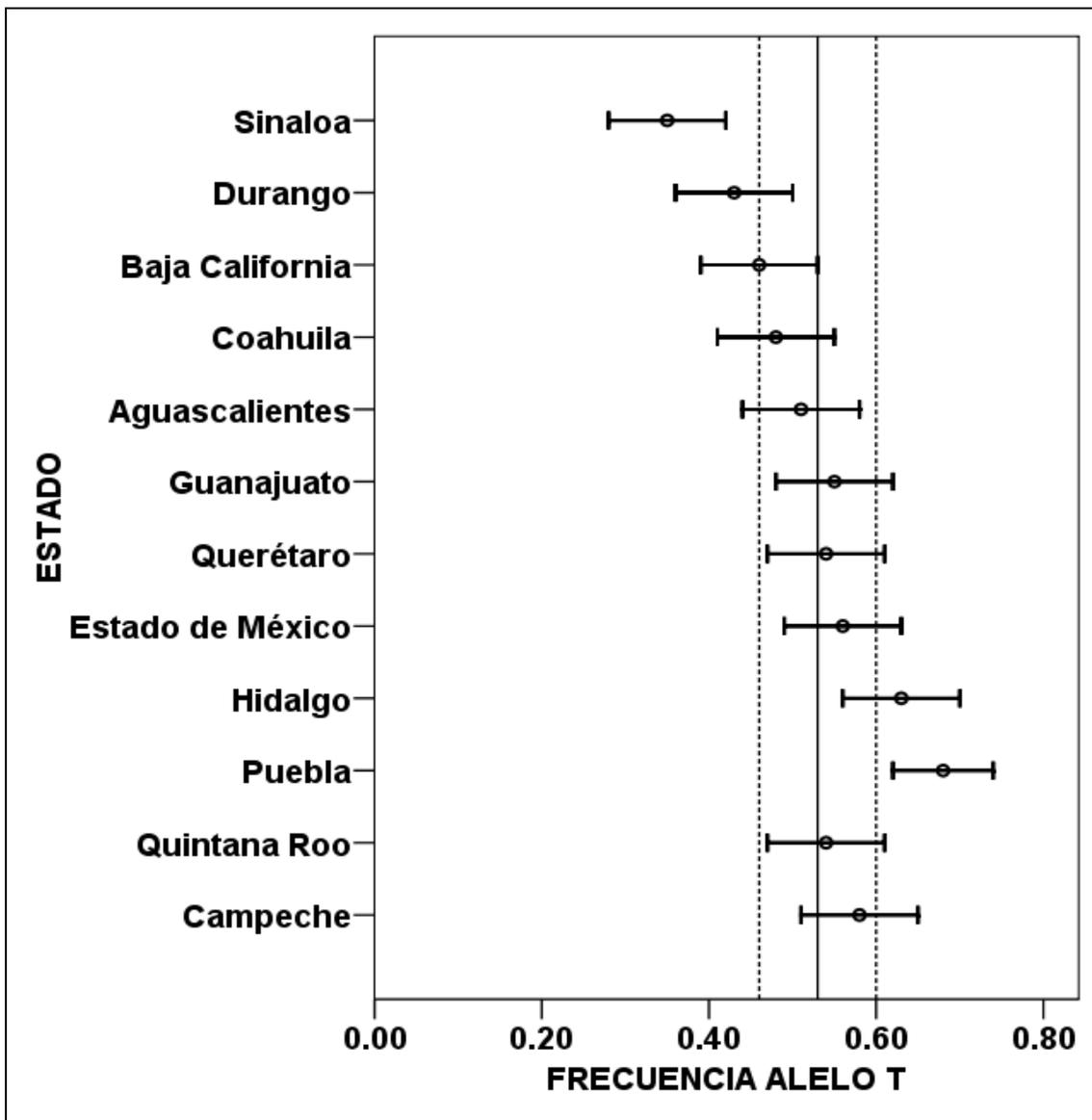


Figura 6. Representación gráfica de la frecuencia del alelo T del gen *MTHFR* en 12 estados de la República Mexicana.

11.3. Equilibrio de Hardy-Weinberg

Mediante el uso de la prueba de Chi cuadrada de bondad de ajuste, se determinó si la distribución de los genotipos para la variante en las poblaciones estudiadas se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg. En todos los estados estudiados, el valor de p obtenido en la prueba de Chi cuadrada fue superior a 0.05 (Tabla 3), lo que indicó que no existen diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas teóricas esperadas y las genotípicas observadas por lo cual se estableció que todas las poblaciones estudiadas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 3. Determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg en los estados estudiados.

Región	Estado	χ^2	P
Norte	Sinaloa	0.0018	> 0.05
	Durango	1.5705	> 0.05
	Baja California Sur	0.5486	> 0.05
	Coahuila	0.1736	> 0.05
Occidente	Aguascalientes	0.3588	> 0.05
	Guanajuato	2.2293	> 0.05
Centro	Querétaro	0.1143	> 0.05
	Estado de México	1.8595	> 0.05
	Hidalgo	1.3317	> 0.05
	Puebla	2.9857	> 0.05
Sureste	Quintana Roo	0.7561	> 0.05
	Campeche	0.6285	> 0.05

n= 100 individuos por estado

11.4. Comparación de la frecuencia alélica de la variante C677T del gen *MTHFR* entre diferentes regiones geográficas de la República Mexicana.

Al comparar la frecuencia del alelo T entre los estados de cada una de las regiones estudiadas, sólo en la región centro y la región norte se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las frecuencias de la variante C677T del gen *MTHFR*. De los 4 estados de la zona norte analizados Sinaloa tuvo una menor frecuencia del alelo T ($\chi^2=8.683$; $p=0.034$) comparado con Durango, BCS y Coahuila. De los estados del centro, la frecuencia del alelo T fue mayor en el estado de Puebla comparado con el estado de Querétaro, Hidalgo y el Estado de México ($\chi^2=10.418$; $p=0.015$). Entre los estados de las regiones occidente ($\chi^2=0.491$; $p=0.483$) y sureste ($\chi^2=0.365$; $p=0.546$) no se observaron diferencias en la frecuencia del alelo T (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de las frecuencias alélicas de la variante C677T del gen *MTHFR* entre estados que conforman las diferentes regiones geográficas.

Región	Estado	Alelo C n=	Alelo T n=	Frecuencia del alelo C	Frecuencia del alelo T	χ^2	p
Norte	Sinaloa	131	69	0.66	0.35	8.683	0.034
	Durango	115	85	0.58	0.43		
	BCS	108	92	0.54	0.46		
	Coahuila	104	96	0.52	0.48		
Occidente	Aguascalientes	99	101	0.50	0.51	0.491	0.483
	Guanajuato	91	109	0.46	0.55		
Centro	Querétaro	92	108	0.46	0.54	10.418	0.015
	Edo de México	88	112	0.44	0.56		
	Hidalgo	74	126	0.37	0.63		
	Puebla	64	136	0.32	0.68		
Sureste	Quintana Roo	92	108	0.46	0.54	0.365	0.546
	Campeche	85	115	0.43	0.58		

n = 100 individuos por estado

En la figura 7 se muestra la distribución geográfica de la variante C677T de *MTHFR*. Mediante el uso de estadística no paramétrica, se comparó la distribución geográfica de la variante genética en la República Mexicana analizando las frecuencias obtenidas en cada una de las regiones estudiadas.

Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la frecuencia del alelo T en la región norte y las frecuencias de las regiones occidente ($\chi^2=9.817$; $p=0.002$), centro ($\chi^2=48.346$; $p<0.001$) y sureste ($\chi^2=17.570$; $p<0.001$) del país, debido a una menor frecuencia del alelo T en la zona norte. Por otro lado, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la frecuencia de la región occidente y de la región centro ($\chi^2=6.247$; $p=0.012$) del alelo T (Tabla 5), por una mayor frecuencia del alelo T en la zona centro.

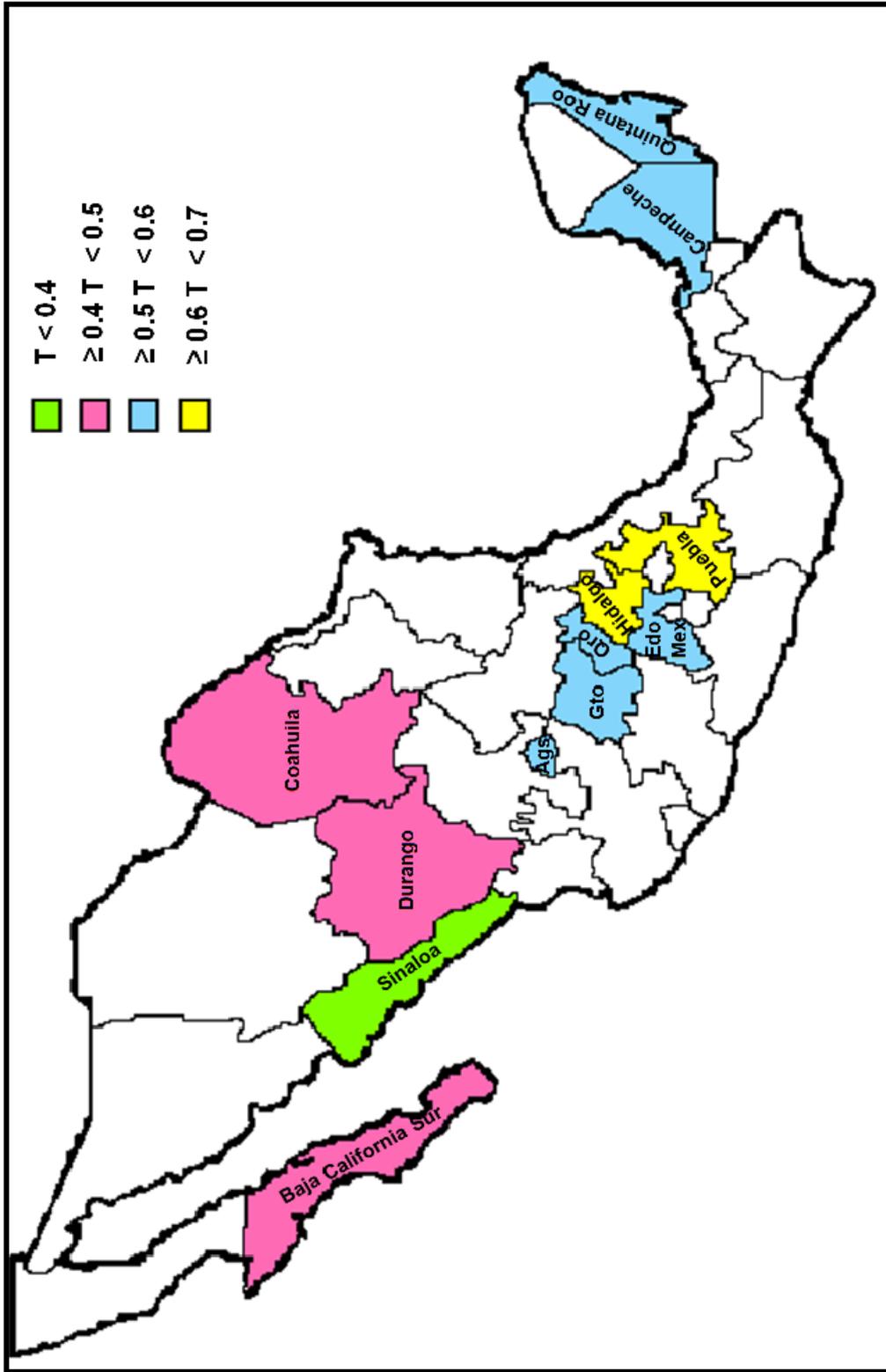


Figura. 7 Distribución de la variante C677T del gen *MTHFR* en diferentes estados de la República Mexicana.

Tabla 5. Comparación de las frecuencias del alelo T de la variante C677T del gen *MTHFR* entre las diferentes regiones geográficas.

Regiones geográficas a comparar	Frecuencia del alelo T	X ²	p
Norte	0.427		
Occidente	0.525	9.817	0.002
Norte	0.427		
Centro	0.602	48.346	< 0.001
Norte	0.427		
Sureste	0.557	17.570	<0.001
Occidente	0.525		
Centro	0.602	6.247	0.012
Occidente	0.525		
Sureste	0.557	0.725	0.395
Centro	0.602		
Sureste	0.557	2.0464	0.153

n = 100 individuos por estado

12. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La relación de la variante C677T del gen *MTHFR* con diversas patologías ha quedado evidenciada en varios estudios realizados por investigadores de todo el mundo, despertando el interés sobre ésta y su frecuencia en las distintas poblaciones. En este estudio se caracterizó dicha variante con la finalidad de establecer la frecuencia con la que este polimorfismo se encuentra presente en la población mexicana, sin embargo, dado que existe alta heterogeneidad en nuestra población, los estados se separaron por regiones geográficas.

La información sobre la distribución geográfica del polimorfismo C677T de *MTHFR* puede relacionarse con la presencia de enfermedades específicas en la población, apoyando la implementación de medidas de prevención.

La frecuencia del polimorfismo es multifactorial y depende de factores étnicos y geográficos que pueden estar asociados a procesos evolutivos (Guéant et al, 2006). Según Boccia y colaboradores (2008) la frecuencia mundial reportada del polimorfismo C677T de *MTHFR* es muy variada entre las áreas geográficas y grupos étnicos diferentes (Tabla 2) donde México ocupa el primer lugar con 32.2%, coincidiendo con lo reportado por Wilcken y su grupo (2003) 32.2% y Guéant (2006) 35.7% en sus investigaciones, este último muy cercano a lo reportado por Mutchinick y sus colaboradores (34.8 %) en 1999.

Al igual que en México la población italiana y la del norte de China presentan frecuencias elevadas notables, 26.4 % y 19.8 %, respectivamente. En China la proporción de defectos de tubo neural es alta (donde el genotipo homocigoto TT es más común) más que en el sur. Sin embargo existen importantes excepciones, en Italia por ejemplo, el genotipo TT es común pero la proporción de defectos de tubo neural no es particularmente alta. Estas excepciones no son del todo inesperadas, puesto que los factores ambientales y nutricionales logran modular considerablemente el factor de riesgo genético para DTN. De hecho, estas excepciones podrían resultar especialmente útiles cuando se investiga la heterogeneidad etiológica y el papel de las interacciones en la aparición de DTN (Wilcken et al, 2010).

En un estudio realizado en el 2000 en mestizos originarios de Guadalajara, Dávalos y su grupo (2000) encontraron que la prevalencia de nacimientos con la variante C677T es de 2.65/1000. Si la frecuencia alélica de este polimorfismo está relacionada con la prevalencia de nacimientos de niños con DTN la relación no es tan fuerte para establecer una frecuencia más alta en los padres, aunque el genotipo parental no puede ser excluido como factor de riesgo. De otra manera, si el genotipo de la variante C677T es relevante para DTN, aproximadamente el 38% de las parejas tendría un riesgo $\geq 25\%$ de tener un producto homocigoto para la C677T, con el impacto consiguiente sobre la salud pública de un gen o genotipo particular.

Se analizaron mil doscientas muestras de recién nacidos vivos y se encontró una frecuencia genotípica más elevada en el estado de Puebla (0.5) respecto al resto de los estados, no obstante, el Estado de México, Querétaro e Hidalgo, que se localizan en la misma zona geográfica, presentaron valores altos (0.28, 0.3 y 0.37, respectivamente), igual a lo reportado por González Herrera (2002). Las frecuencias genotípicas menores se obtuvieron en los estados del norte del país; Sinaloa con 0.12 y Durango con 0.15, observándose un comportamiento muy similar. El resto de los estados se mantuvo dentro de este rango existiendo variaciones mínimas (Tabla 2).

En base a estos resultados se observó que existe una variación geográfica y étnica en la frecuencia del alelo T (Figuras 7 y Tabla 4) en México. En Puebla por ejemplo, la frecuencia es mayor que en el resto de los estados (0.68) y también respecto a los estados que pertenecen a la misma región ($\chi^2=10.418$; $p=0.015$). Mutchinick y colaboradores (1999) informaron en un estudio donde analizaron varias regiones geográficas de la República Mexicana que la transición 677 C \rightarrow T en el gen *MTHFR* y aquellos homocigotos para esta mutación tienen un alto predominio en la población normal mexicana con una frecuencia para el alelo mutante de 0.586. De acuerdo con estas cifras, el diseño multicéntrico del estudio y la distribución amplia y uniforme de los homocigotos para la mutación, casi 1 de 3 personas en la población mexicana tiene la variante termolábil de la enzima y por lo tanto la deficiencia más popular en el metabolismo del folato.

En Sinaloa la frecuencia del alelo mutante es mucho menor (0.35) que en el resto de los estados analizados y aun menor que en los estados del norte ($\chi^2=8.683$; $p=0.034$), no obstante, los estados que conforman dicha región (Durango, Baja California Sur y Coahuila) también presentan frecuencias bajas (Tabla 4). En su investigación González-Herrera (2002) encontró que en la población mestiza de Nuevo León la frecuencia del alelo T es baja (36 %), igual que en la población Tarahumara originaria del estado de Chihuahua (36 %), lo que indica que en la región norte de México la frecuencia del polimorfismo C677T es baja.

Las diferencias marcadas en Puebla y Sinaloa llevaron a una comparación entre regiones, arrojando una diferencia estadísticamente significativa entre la frecuencia del alelo T en la región norte y las frecuencias de las regiones occidente ($\chi^2=9.8165$; $p=0.0017$), centro ($\chi^2=48.3460$; $p<0.001$) y sureste ($\chi^2=17.5702$; $p<0.001$) del país. De igual forma se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre la frecuencia de la región occidente y de la región centro ($\chi^2=6.2472$; $p=0.0124$) del alelo T (Tabla 5), lo cual indica que la variante C677T de *MTHFR* tiene una distribución regional heterogénea. Esto concuerda con lo reportado por Mutchinick y colaboradores (1999) quienes obtuvieron una diferencia estadísticamente significativa entre el centro, este y oeste respecto al norte (RM 1.65; IC 95% 1.06–2.56) y otra entre el centro y norte del país (RM , 2.22; IC 95% 1.20–4.12). Todos estos resultados indican que los sujetos de la región norte tienen una menor frecuencia del alelo mutante y el genotipo TT que los sujetos de las otras regiones. Contrariamente González-Herrera (2002) al efectuar una comparación inter población en la población mestiza originaria del oeste, este y centro de México con población nativa Purépecha y Huichol no encontró diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$).

La distribución observada de los tres genotipos (CC, CT y TT) fue similar a la esperada en el equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 3).

13. CONCLUSIONES

1.- Se observaron diferencias en cuanto la frecuencia del alelo T entre las diferentes regiones geográficas estudiadas y dentro de los estados que conformaron las regiones norte y centro, lo cual es indicativo de una heterogeneidad genética regional en la población de México.

2.- Los resultados confirman una baja prevalencia del alelo T en la región del norte comparada con el resto del país.

3.- Este estudio confirma lo previamente reportado en la literatura en cuanto a la alta frecuencia del alelo T, así como del genotipo TT en la población mexicana. Los resultados obtenidos podrían complementarse con el estudio de otros factores genéticos y ambientales que sugieran alguna posible presión evolutiva que influencié la alta frecuencia del alelo T en las diferentes regiones, principalmente en los estados del centro y sureste.

4.-La alta frecuencia de la variante C677T en la población mexicana, comparada con diversas poblaciones alrededor del mundo, hacen de éste, un marcador importante en el estudio de factores de riesgo genético y ambientales asociados a ciertas enfermedades biológicamente relacionadas al metabolismo de los folatos, como son las malformaciones congénitas en especial los defectos de cierre de tubo neural y ciertas enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer, la enfermedad cardiovascular, así como algunos desórdenes psiquiátricos que representan un importante problema de salud pública en México.

5. El efecto de la mutación C677T en estado homocigoto se refleja en una disminución de hasta el 70% de la actividad enzimática, efecto que puede ser modificado con un incremento en el consumo de folatos en la dieta. El estudio de esta variante, podría ser un indicador de las zonas o regiones del país que requieren una vigilancia epidemiológica en cuanto a los requerimientos de una dieta fortificada con vitaminas del grupo B principalmente con ácido fólico.

14. ANEXOS

14.1. Cálculo de frecuencias alélicas y genotípicas

- **Frecuencia alélica**

Se determina a partir de la ecuación $p + q = 1$, donde $p = C$ y $q = T$

- **Alelo C**

$$\left[\frac{2 (\text{Individuos con genotipo CC}) + \text{Individuos con genotipo CT}}{2 (\text{número de individuos de la muestra})} \right] = \text{Frecuencia alelo C}$$

$$p = 2 (CC) + CT / 2 (n)$$

- **Alelo T**

$$\left[\frac{2 (\text{Individuos con genotipo TT}) + \text{Individuos con genotipo CT}}{2 (\text{número de individuos de la muestra})} \right] = \text{Frecuencia alelo T}$$

$$q = 2(TT) + CT / 2 (n)$$

- **Genotipos esperados**

Se determinan mediante la ecuación $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, donde p^2 , $2pq$ y q^2 , corresponden a los genotipos CC, CT y TT respectivamente.

- **Genotipo CC**

(Frecuencia del alelo C)² * total de individuos de la muestra

$$CC = p^2 (n)$$

- **Genotipo CT**

2 (Frecuencia del alelo C) (Frecuencia del alelo T) * total de individuos de la muestra

$$CT = 2pq (n)$$

- **Genotipo TT**

(Frecuencia del alelo T)² * total de individuos de la muestra

$$TT = q^2 (n)$$

- **Frecuencia genotípica**

- **Genotipo CC**

CC = Individuos con genotipo CC observados / total de individuos analizados

- **Genotipo CT**

CT = Individuos con genotipo CT observados / total de individuos analizados

- **Genotipo TT**

TT = Individuos con genotipo TT observados / total de individuos analizados

Ejemplo de cálculo para las frecuencias alélica y genotípica de la variante C677T de *MTHFR*

- **Genotipos observados**

Genotipo CC = 26

Genotipo CT = 47

Genotipo TT = 27

- **Frecuencia alélica**

$$p = 2(26) + 47 / 2(100) = 0.495$$

$$q = 2(27) + 47 / 2(100) = 0.505$$

- **Genotipos esperados**

$$CC = (0.495)^2 100 = 24.50$$

$$CT = 2(0.495)(0.505) 100 = 50$$

$$TT = (0.505)^2 100 = 25.50$$

- **Frecuencia genotípica**

$$CC = 26 / 100 = 0.26$$

$$CT = 47 / 100 = 0.47$$

$$TT = 27 / 100 = 0.27$$

14.2. Cálculos del equilibrio de Hardy-Weinberg

Determinación de χ^2 de bondad de ajuste

$$\chi^2 = \sum (\text{Frecuencias genotípicas observadas} - \text{Frecuencias genotípicas esperadas})^2 / \text{Frecuencias genotípicas esperadas}$$

Frecuencias genotípicas esperadas

$$(p + q)^2 = 1$$

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Donde

p= Frecuencia del alelo silvestre

q= Frecuencia del alelo mutante

p²*N= # esperado de homocigotos silvestres

2pq*N= # esperado de heterocigotos

q²*N= # esperado de homocigotos mutantes

N= número de individuos de la muestra

- **Ejemplo de cálculo para de frecuencias genotípicas esperadas en MTHFR**

p= Frecuencia del alelo silvestre (C) = **0.3783**

q= Frecuencia del alelo mutante (T) = **0.6217**

$$p^2 = (0.3783)^2 = 0.1431$$

$$2pq = 2 (0.3783) (0.6217) = 0.4704$$

$$q^2 = (0.6217)^2 = 0.3865$$

$$p^2 (300) = (0.3783)^2 (300) = 42.94 \text{ (genotipo C/C)}$$

$$2pq (300) = 2 (0.3783) (0.6217) (300) = 141.12 \text{ (genotipo C/T)}$$

$$q^2 = (0.6217)^2 (300) = 115.94 \text{ (genotipo T/T)}$$

- **Ejemplo de cálculo para la determinación χ^2 por bondad de ajuste**

$$\chi^2 = \sum \{ (\text{Observados} - \text{Esperados})^2 / \text{Esperados} \}$$

$$\chi^2 = ((39 - 42.94)^2 / 42.94) + ((149 - 141.12)^2 / 141.12) + ((112 - 115.94)^2 / 115.94)$$

$$\chi^2 = 0.9358$$

$$\chi^2 \text{ de tablas} = 3.84 \text{ con un valor de } p=0.05$$

14.3. Reactivos y soluciones

- **Reactivos**
- DNA Purification Solution, QIAGEN®. No. de catálogo 1045547.
- Elution Buffer AE, QIAGEN®. No. de catálogo 1016812.
- GoTaq Flexi DNA Polymerase. PROMEGA. No. de catálogo M8295. 5 U/ μ L.500 U.
- Oligonucleótidos *MTHFR* sintetizados por IDT (*Integrated DNA Technologies*). Sentido (F) 142 F y Antisentido (R) 142 R.

- Nucleótidos. PCR nucleotide Mix. PROMEGA. No. de catálogo C1141.
- Enzima de restricción *Taq I*. ROCHE. No de catálogo 10567671001 presentación de 2500 U (10 U/μL)
- Marcador de peso molecular DNA-Molecular Weight Marker VIII (0.019 – 1.11 kbp). 50 μg (200 μL). ROCHE. Número de catálogo 1336045.
- Agarosa grado analítico. PROMEGA. No de catálogo V3125. 500 g.

Gel de agarosa al 3%

Precauciones:

Preparar el gel con uso de guantes todo el tiempo

Tabla 6: Reactivos para la preparación del gel de agarosa al 3%.

Reactivo	Cantidad
Agarosa	3 g
Bromuro de Etidio 1%	3 μL
TBE 1x	c.b.p. 100 mL

- 1.- Pesar 3 g de agarosa por cada 100 mL de volumen de gel que se desee preparar.
- 2.- Añadir a 100 mL de TBE 1X (ver modo de preparación).
- 3.- Calentar a ebullición en microondas cuidando de no derramar la solución hasta que toda la agarosa esté disuelta.
- 4.- Agregar 3 μL de bromuro de etidio al 1% y homogeneizar cuidadosamente.
- 5.- Verter la solución en el molde para geles.
- 6.- Eliminar las burbujas que se hayan formado.
- 7.- Dejar a temperatura ambiente hasta que haya gelificado por completo.
- 8.- Una vez solidificado, mantener en una bolsa de plástico a 4° para evitar la deshidratación si no se emplea en el momento de preparación.

- **Soluciones**

Tabla 7: Reactivos para la preparación de la solución de EDTA 0.5 M pH 8.0

Reactivo	Cantidad
Etilendiaminotetraacetato de sodio dihidratado (EDTA)	186.1 g
H ₂ O destilada	c.b.p 1000 mL

Añadir 186.1 g de EDTA a 800 mL de agua destilada. Homogeneizar vigorosamente en un agitador magnético. Ajustar el pH a 8.0 si es necesario con aproximadamente 20 g de NaOH en lenteja y llevar a un volumen de 1 L.

Tabla 8: Reactivos para la preparación de la solución de bromuro de etidio al 1 %.

Reactivo	Cantidad
Bromuro de Etidio	1 g
H ₂ O destilada	c.b.p 100 mL

Añadir 1g de bromuro de etidio en 100 mL de agua destilada. Mantener en agitación magnética durante varias horas hasta que el colorante se disuelva. Almacenar en un contenedor opaco o cubrir con papel aluminio a temperatura ambiente.

Precauciones:

El bromuro de etidio es un potente mutágeno moderadamente tóxico. Su manipulación requiere el uso de guantes. Las soluciones con bromuro de etidio deben ser descontaminadas para poder ser desechadas.

Tabla 9: Reactivos para la preparación de la solución amortiguadora Tris-Boratos-EDTA (TBE) 10X

Reactivo	Cantidad
Trizma Base	108 g
Acido Bórico	55 g
Solución EDTA 0.5M pH 8.0	40 mL
Agua destilada	c.b.p 1000 mL

Las soluciones concentradas de TBE forman precipitado después de largo tiempo, estas deben ser desechadas. Almacenar en frascos de vidrio o plástico a temperatura ambiente.

15. BIBLIOGRAFÍA

1. **ALLEN, N. C.**, Bagade, S., McQueen, M. B., et al. 2008. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nature Genet.* 40: 827-834.
2. **BOCCIA S.**, Hung R., Ricciardi G. et al. 2008. Meta- and Pooled Analyses of the Methylene tetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Polymorphisms and Gastric Cancer Risk: A HUGO-GSEC Review. *American Journal of Epidemiology.* 167:505–516.
3. **BODUROGLU, K.**, Alanay, Y., Koldan, B., Tuncbilek, E. 2004. Methylene tetrahydrofolate reductase enzyme polymorphisms as maternal risk for Down syndrome among Turkish women. *Am. J. Med. Genet.* 127A: 5-10.
4. **BOYLES A.**, Wilcox A., Taylor J, et al. 2008. Folate and One-Carbon Metabolism Gene Polymorphisms and Their Associations With Oral Facial Clefts. *American Journal of Medical Genetics.* 146A:440–449.
5. **CANDITO M.**, Rivet R., Herbeth B., et al. 2008. Nutritional and Genetic Determinants of Vitamin B and Homocysteine Metabolisms in Neural Tube Defects: A Multicenter Case–Control Study. *American Journal of Medical Genetics.* 146A:1128–1133.
6. **CASAS, J. P.**, Hingorani, A. D., Bautista, L. E., Sharma, P. 2004. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18000 cases and 58000 controls. *Arch. Neurol.* 61: 1652-1662.
7. **CASTRO, R.**, Rivera, I., Ravasco, P., et al. 2004. 5,10-Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C-T and 1298A-C mutations are associated with DNA hypomethylation (Letter). *J. Med. Genet.* 41: 454-458.
8. **CHRISTENSEN, B.**, Arbour, L., Tran, P., et al. 1999. Genetic polymorphisms in methylene tetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am. J. Med. Genet.* 84: 151-157.
9. **DE FRANCHIS, R.**, Buoninconti, A., Mandato, C., et al. 1998. The C677T mutation of the 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase gene is a moderate risk factor for spina bifida in Italy. *J. Med. Genet.* 35: 1009-1013.
10. **FROSST P.**, Blom HJ, Milos R, et al. 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylene tetrahydrofolate reductase. *Nature Genet.* 10:111-113.
11. **GASPAR, D. A.**, Matioli, S. R., de Cassia Pavanello, R., et al. 2004. Maternal MTHFR interacts with the offspring's BCL3 genotypes, but not with TGFA, in increasing risk to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Europ. J. Hum. Genet.* 12: 521-526.
12. **GRAZIANO F.**, Kawakami K., Ruzzo A., et al. 2006. Methylene tetrahydrofolate reductase 677C/T gene polymorphism, gastric cancer susceptibility and genomic DNA hypomethylation in an at-risk Italian population. *Int. J. Cancer.* 118: 628–632.

13. **GUÉANT-RODRIGUEZ RM**, Guéant JL, Debard R, Thirion S, Lu Xiao Hong, Bronowicki JP, et al. 2006. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African and European populations. *Am. J. Clinical Nutrition*. 83: 701 - 707.
14. **HAZRA A.**, Kraft P., Lazarus R., et al. 2009. Genome-wide significant predictors of metabolites in the one-carbon metabolism pathway. *Human Molecular Genetics*. 18: 4677–4687.
15. **HO V.**, Massey T., King W., et al. 2010. Influence of thymidylate synthase gene polymorphisms on total plasma homocysteine concentrations. *Molecular Genetics and Metabolism*. 101:18-24.
16. **HOBBS, C. A.**, Cleves, M. A., Lauer, R. M., et al. 2002. Preferential transmission of the MTHFR 677T allele to infants with Down syndrome: implications for a survival advantage. *Am. J. Med. Genet*. 113: 9-14.
17. **HOBBS, C. A.**, Sherman, S. L., Yi, P., et al. 2000. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am. J. Hum. Genet*. 67: 623-630.
18. **HUBNER, R. A.**, Lubbe, S., Chandler, I., Houlston, R. S. 2007. MTHFR C677T has differential influence on risk of MSI and MSS colorectal cancer. *Hum. Molec. Genet*. 16: 1072-1077.
19. **JONGE R.**, Tissing W., Hooijberg J-H., et al. 2009. Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood Journal*. 113: 2284-2289.
20. **KEIJZER, M. B. A. J.**, Den Heijer, M., Blom, H. J., et al. 2002. Interaction between hyperhomocysteinemia, mutated methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and inherited thrombophilic factors in recurrent venous thrombosis. *Thromb. Hemost.* 88: 723-728.
21. **KELLY, P. J.**, Rosand, J., Kistler, J. P., et al. 2002. Homocysteine, MTHFR 677C-T polymorphism, and risk of ischemic stroke: results of a meta-analysis. *Neurology*. 59: 529-536.
22. **KLERK, M.**, Verhoef, P., Clarke, R., Blom, H. J., Kok, F. J., Schouten, E. G., MTHFR Studies Collaboration Group. 2002. MTHFR 677C-T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA*. 288: 2023-2031.
23. **KLUIJTMANS, L. A. J.**, Van den Heuvel, L. P. W. J., Boers, G. H. J., et al. 1996. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am. J. Hum. Genet*. 58: 35-41.
24. **KLUIJTMANS, L.A;** J., Wendel, U., Stevens, et al. 1998. Identification of four novel mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Europ. J. Hum. Genet*. 6: 257-265.
25. **KOBASHI, G.**, Yamada, H., Asano, T., et al. 2000. Absence of association between a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and preeclampsia in Japanese women. *Am. J. Med. Genet*. 93: 122-125.
26. **KRAJINOVIC M.**, Lamothe S, Labuda D, Lemieux-Blanchard E, Theoret Y, Moghrabi A, Sinnott D. 2004. Role of MTHFR genetic polymorphisms

- in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 103:252-7.
27. **LANGEVIN S.M.**, Lin D., Matsuo K., et al. 2009. Review and pooled analysis of studies on MTHFR C677T polymorphism and esophageal cancer. *Toxicology Letters*. 184:73-80.
 28. **LEWIS, S. J.**, Zammit, S., Gunnell, D., Smith, G. D. 2005. A meta-analysis of the MTHFR C677T polymorphism and schizophrenia risk. *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiat. Genet.)*. 135B: 2-4.
 29. **LI, X.-M.**, Wei, Y.-F., Hao, H.-L., et al. 2002. Hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T mutation in Budd-Chiari syndrome. *Am. J. Hemat.* 71: 11-14.
 30. **LU, Y.**, Zhao, Y., Liu, G., et al. 2002. Factor V gene G1691A mutation, prothrombin gene G20210A mutation, and MTHFR gene C677T mutation are not risk factors for pulmonary thromboembolism in Chinese population. *Thromb. Res.* 106: 7-12.
 31. **LUCOCK, M.**, Yates, Z. 2002. Measurement of red blood cell methylfolate (Letter). *Lancet*. 360: 1021-1022.
 32. **MARTINEZ-FRIAS ML.** 2008. The Biochemical Structure and Function of Methylenetetrahydrofolate Reductase Provide the Rationale to Interpret the Epidemiological Results on the Risk for Infants With Down Syndrome. *American Journal of Medical Genetics* 146A:1477–1482.
 33. **MARUTI S.**, Ulrich C., Jupe E. et al. 2009. MTHFR C677T and postmenopausal breast cancer risk by intakes of one-carbon metabolism nutrients: a nested case-control study. *Breast Cancer Research*. 11: 1-9.
 34. **MILLS, J. L.**, Kirke, P. N., Molloy, A. M., et al. 1999. Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. *Am. J. Med. Genet.* 86: 71-74.
 35. **MILLS, J. L.**, McPartlin, J. M., Kirke, P. N., et al. 1995. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet*. 345: 149-151.
 36. **MOLLOY A.** Brody L., Mills J., et al. 2009. The Search for Genetic Polymorphisms in the Homocysteine/Folate Pathway That Contribute to the Etiology of Human Neural Tube Defects. *Birth Defects Research* 85A:285–294.
 37. **MORITA, H.**, Taguchi, J., Kurihara, H., et al. 1997. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation*. 95: 2032-2036.
 38. **MORNET, E.**, Muller, F., Lenvoise-Furet, A., et al. 1997. Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects. *Hum. Genet.* 100: 512-514.
 39. **MOSTOWSKA, A.**, Hozyasz, K. K., Jagodzinski, P. P. 2006. Maternal MTR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population. *Clin. Genet.* 69: 512-517.
 40. **MOTULSKY, A. G.** 1996. Nutritional ecogenetics: homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defects, and folic acid. *Am. J. Hum. Genet.* 58: 17-20.

41. **MUNOZ-MORAN, E.**, Dieguez-Lucena, J. L., Fernández-Arcas, N., et al. 1998. Genetic selection and folate intake during pregnancy. *Lancet*. 352: 1120-1121.
42. **MUNTJEWERFF, J. W.**, Kahn, R. S., Blom, H. J., den Heijer, M. 2006. Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase and risk of schizophrenia: a meta-analysis. *Molec. Psychiat.* 11: 143-149.
43. **MUNTJEWERFF, J.-W.**, Hoogendoorn, M. L. C., Kahn, R. S., et al. 2005. Hyperhomocysteinemia, methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype, and the risk for schizophrenia: a Dutch population based case-control study. *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiat. Genet.)*. 135B: 69-72.
44. **MUTCHINICK OM.**, Lisker R, y Babinski V. 1988. Programa Mexicano de Registro y Vigilancia Epidemiológica de Malformaciones Congénitas Externas (RYVEMCE). *Salud Publica Mex* 30 (1):88-100.
45. **MUTCHINICK OM.**, Lopez M., Luna L. et al. 1999. High Prevalence of the Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase Variant in Mexico: A Country with a Very High Prevalence of Neural Tube Defects . *Molecular Genetics and Metabolism*. 68:461-467.
46. **NISHIO, H.**, Lee, M. J., Fujii, M., et al. 1996. A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene among the Japanese population. *Jpn. J. Hum. Genet.* 41: 247-251.
47. **O'LEARY, V. B.**, Parle-McDermott, A., Molloy, A. M., et al. 2002. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome?. *Am. J. Med. Genet.* 107: 151-155.
48. **OU, C. Y.**, Stevenson, R. E., Brown, V. K., et al. 1996. 5,10 Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. *Am. J. Med. Genet.* 63: 610-614.
49. **PAZ, M. F.**, Ávila, S., Fraga, M. F., et al. 2002. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res.* 62: 4519-4524.
50. **QIAN, X.**, Lu, Z., Tan, M., et al. 2007. A meta-analysis of association between C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and hypertension. *Europ. J. Hum. Genet.* 15: 1239-1245.
51. **QUEFFEULOU, G.**, Michel, C., Vrtovsnik, F., et al. 2002. Hyperhomocysteinemia, low folate status, homozygous C677T mutation of the methylene tetrahydrofolate reductase and renal arterial thrombosis. *Clin. Nephrol.* 57: 158-162.
52. **QUERE, I.**, Perneger, T. V., Zittoun, J., et al. 2002. Red blood cell methylfolate and plasma homocysteine as risk factors for venous thromboembolism: a matched case-control study. *Lancet*. 359: 747-752.
53. **REYES-ENGEL, A.**, Muñoz, E., Gaitán, M. J., et al. 2002. Implications on human fertility of the 677C-T and 1298A-C polymorphisms of the MTHFR gene: consequences of a possible genetic selection. *Molec. Hum. Reprod.* 8: 952-957.
54. **ROFFMAN, J. L.**, Weiss, A. P., Purcell, S., et al. 2008. Contribution of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms to negative symptoms in schizophrenia. *Biol. Psychiat.* 63: 42-48.
55. **SCHWARTZ, S. M.**, Siscovick, D. S., Malinow, M. R., et al. 1997. Myocardial infarction in young women in relation to plasma total homocysteine, folate, and a common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Circulation*. 96: 412-417.

56. **SHANG Y.**, Zhao H., Niu B., et al. 2008. Correlation of Polymorphism of MTHFRs and RFC-1 Genes with Neural Tube Defects in China. *Birth Defects Research*. 82A: 3–7.
57. **SHAW, G. M.**, Rozen, R., Finnell, R. H., et al. 1998. Infant C677T mutation in MTHFR, maternal periconceptional vitamin use, and cleft lip. *Am. J. Med. Genet*. 80: 196-198.
58. **SOHDA, S.**, Arinami, T., Hamada, H., et al. 1997. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and pre-eclampsia. *J. Med. Genet*. 34: 525-526.
59. **SOHN K-J.**, Jang H., Campan M. et al. 2009. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation induces cell-specific changes in genomic DNA methylation and uracil incorporation: A possible molecular basis for the site-specific cancer risk modification. *Int. J. Cancer*: 124: 1999–2005.
60. **SPEER, M. C.**, Worley, G., Mackey, J. F., Melvin, E., Oakes, W. J., George, T. M., NTD Collaborative Group. 1997. The thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is not a major risk factor for neural tube defect in American Caucasians. *Neurogenetics*. 1: 149-150.
61. **STEVENSON, R. E.**, Schwartz, C. E., Du, Y.-Z., Adams, M. J., Jr. 1997. Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between whites and blacks (Letter). *Am. J. Hum. Genet*. 60: 229-230.
62. **STOVER P.** 2009. One-Carbon Metabolism–Genome Interactions in Folate- Associated Pathologies. *The Journal of Nutrition*. 139: 2402–2405.
63. **STUPPIA, L.**, Gatta, V., Gaspari, A. R., et al. 2002. C677T mutation in the 5,10-MTHFR gene and risk of Down syndrome in Italy. *Europ. J. Hum. Genet*. 10: 388-390.
64. **TAIOLI E.**, Garza M. A., Ahn Y. O. 2009. Meta- and Pooled Analyses of the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T Polymorphism and Colorectal Cancer: A HuGE-GSEC Review. *American Journal of Epidemiology*. 170:1207–1221.
65. **TERRY K.**, Tworoger S., Goode E., et al. 2010. MTHFR polymorphisms in relation to ovarian cancer risk. *Gynecologic Oncology* 119: 319–324.
66. **TIBBETS.** Appling DR. 2010. Compartmentalization of Mammalian folate-mediated one-carbon metabolism. *Annu Rev Nutr*. 30:57-81.
67. **TONETTI, C.**, Ruivard, M., Rieu, V., et al. 2002. Severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency revealed by a pulmonary embolism in a young adult. *Brit. J. Haemat*. 119: 397-399.
68. **VAN BOCKXMEER, F. M.**, Mamotte, C. D. S., Vasikaran, S. D., Taylor, R. R. 1997. Methylenetetrahydrofolate reductase gene and coronary artery disease. *Circulation*. 95: 21-23.
69. **VAN DER PUT, N. M. J.**, Eskes, T. K. A. B., Blom, H. J. 1997. Is the common 677C-to-T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. *Quart. J. Med*. 90: 111-115.
70. **VAN DER PUT, N. M. J.**, Steegers-Theunissen, R. P. M., Frosst, P., et al. 1995. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet*. 346: 1070-1071.

71. **WHITEHEAD, A. S.**, Gallagher, P., Mills, J. L., et al. 1995. A genetic defect in 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. *Quart. J. Med.* 88: 763-766.
72. **WILCKEN B.**, Bamforth F., Li Z., et al. 2003. Geographical and ethnic variation of the 677C-T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas worldwide. *J. Med. Genet.* 40: 619-625.
73. **XU W-H.**, Shrubsole M., Xiang Y-B., et al. 2007. Dietary Folate Intake, MTHFR Genetic Polymorphisms, and the Risk of Endometrial Cancer among Chinese Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16:281-287.
74. **YANAMANDRA, K.**, Bocchini, J. A., Jr., Thurmon, T. F. 2003. Absence of association of fetal MTHFR C677T polymorphism with prenatal Down syndrome pregnancies (Letter). *Europ. J. Hum. Genet.* 11: 5 only.
75. **ZALAVRAS, C. G.**, Giotopoulou, S., Dokou, E., et al. 2002. Lack of association between the C677T mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene and venous thromboembolism in Northwestern Greece. *Int. Angiol.* 21: 268-271.
76. **ZHU, J.**, Ren, A., Hao, L., et al. 2006. Variable contribution of the MTHFR C677T polymorphism to non-syndromic cleft lip and palate risk in China. *Am. J. Med. Genet.* 140A: 551-557.