



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MEXICO**  
**DIVISION DE POSGRADO E INVESTIGACION**  
**HOSPITAL REGIONAL N°1**  
**“DR. CARLOS MAC GREGOR SANCHEZ NAVARRO”**

**“INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO C677T DE LA**  
**METILTETRAHIDROFOLATO-REDUCTASA EN LA ENFERMEDAD VASCULAR**  
**CEREBRAL”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA**

**PRESENTA**

**DR.PAZ ARAGON EMMANUEL**

**TUTOR**

**DR.JORGE ESCOBEDO DE LA PEÑA**

**NUMERO DE REGISTRO INSTITUCIONAL: R-2013-3609-25**

**MEXICO D,F.**

**JUNIO 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **I. TÍTULO:**

**Influencia del polimorfismo C677T de la metiltetrahidrofolato-reductasa en la enfermedad vascular cerebral**

## **II. AUTORES:**

**Dr. Jorge Escobedo De la Peña**

**Dr. Emmanuel Paz Aragón, residente 3 año de medicina interna.**

**Marco teórico:** El evento vascular cerebral isquémico tiene una etiología multifactorial en donde intervienen factores genéticos y factores ambientales. El aumento leve de la concentración de homocisteína se considera, de forma general aunque no universal, como un factor de riesgo independiente tanto de enfermedad oclusiva arterial como de trombosis venosa. El problema iniciaría con la formación de radicales libres de oxígeno que producen daño vascular oxidativo, proliferación de músculo liso, alteración estructural y funcional endotelial y aumento de la trombogenicidad que finalmente conduce a aterotrombosis. El polimorfismo C677T de la MTHFR podría ser un factor de riesgo independiente para la enfermedad vascular. En el polimorfismo C677T, la nueva variante enzimática de la MTHFR se caracteriza por la sustitución de valina por alanina en la cadena polipeptídica, dando lugar a una forma termolábil de ésta, cuya actividad enzimática es menor. Los individuos homocigotos para este polimorfismo parecen asociarse a niveles moderadamente elevados de Homocisteína en plasma sobre todo en presencia de niveles bajos de folatos y algunos estudios han evidenciado un aumento en la prevalencia de estos homocigotos en pacientes con enfermedad cardiovascular mientras que otros no han confirmado dicha relación. Los estudios sobre el impacto en el riesgo de enfermedad de las variantes genéticas que afectan las concentraciones de homocisteína ayudará a determinar si la homocisteína es causal relacionados con la enfermedad vascular.

**Objetivo:** Determinar que la expresión del polimorfismo C677T de la MTHFR se asocia con un incremento de la incidencia de EVC isquémico.

**Hipótesis:** *La expresión del polimorfismo C677T de la MTHFR se asocia con un incremento en la incidencia de EVC isquémico.* **Material y métodos:** Estudio No experimental. Casos y controles. Una vez reunidos los criterios para ingresar al estudio, informados y con carta de aceptación firmada, Se incluirán pacientes hospitalizados en HGR 1, con diagnóstico de ingreso al servicio de urgencias de Evento vascular cerebral isquémico, definido como afección caracterizada por un rápido desarrollo de signos clínicos focales (en ocasiones globales) de la alteración en las funciones cerebrales, con una duración mayor de 24 horas o de curso fatal, sin otra causa aparente distinta de la vascular, ya sea con criterio clínico o tomográfico. A los cuales se aplicara cuestionario y se tomaran muestras sanguíneas para análisis de ADN 3 tubos, las muestras serán centrifugadas y separadas en sus diferentes componentes para su posterior traslado y almacenamiento en refrigeración, bajo los parámetros establecidos en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional Siglo XXI, donde se llevarán a cabo los estudios referentes al análisis genético, comparado con un grupo control de pacientes sin EVC ,ni enfermedad aterotrombótica reciente , con características basales similares, de hospitalización de cirugía general del HGR 1. Se realizará la determinación del polimorfismo de 677 de la MTHFR en ambos grupos. Las variables cuantitativas se expresaran como media  $\pm$  desviación estándar y las cualitativas como porcentajes. Se evaluará la distribución de las variables continuas mediante pruebas de normalidad. Se realizará un análisis descriptivo de la información mediante frecuencias simples, porcentajes, medidas de tendencia central y de dispersión. La comparación de diferencias entre las variables cualitativas se realizará mediante el test de la  $\chi^2$  o el test exacto de Fischer. Se llevará a cabo un análisis multivariado con finalidad de obtener la razón de momios de prevalencia ajustada entre el polimorfismo C677T MTHFR y la enfermedad vascular cerebral tipo isquémico.

#### **IV. Marco teórico**

El evento vascular cerebral isquémico tiene una etiología multifactorial en donde intervienen factores genéticos y factores ambientales.

Se considera en la actualidad que los factores de riesgo mayores de enfermedad cardiovascular son: Dislipidemia, hipertensión arterial (HTA), tabaquismo y diabetes mellitus 2(DM2).

Se han descrito otros factores de riesgo como: Sedentarismo, obesidad, historia familiar de enfermedad cardiovascular, edad, sexo, hiperhomocisteinemia, consumo de alcohol, factores psicológicos y de personalidad.

El aumento leve de la concentración de homocisteína se considera, de forma general aunque no universal , como un factor de riesgo independiente tanto de enfermedad oclusiva arterial como de trombosis venosa. <sup>[1]</sup>

El daño producido por Homocisteina involucra diversos factores del sistema de coagulación y se apoya en la teoría clásica de la aterotrombosis:

El problema iniciaría con la formación de radicales libres de oxígeno que producen daño vascular oxidativo, proliferación de músculo liso, alteración estructural y funcional endotelial y aumento de la trombogenicidad que finalmente conduce a aterotrombosis. (Figura 1) <sup>[1,2]</sup>

**Patogénesis del daño vascular inducido por Hcy.**

**1. Disfunción endotelial**  
 Producción disminuida de óxido nítrico (ON)  
 Aumento en la producción de especies de oxígeno reactivas  
 Aumento del factor von Willebrand y trombomodulina  
 Aumento en la producción de factor tisular  
 Disminución en la producción de antitrombina (AT)  
 Engrosamiento de la íntima

**2. Estrés oxidativo**  
 Producción aumentada de EOR  
 Disminución de la actividad antioxidante del plasma.  
 Aumento en la peroxidación de los lípidos

**3. Células del músculo liso vascular**  
 Aumento en la proliferación  
 Aumento en la formación de células espumosas

**4. Lipoproteínas de baja densidad**  
 Tiolación  
 Aumento en la peroxidación de los lípidos  
 Aumento en la captación de LDL por los macrófagos

**5. Vías hemostáticas**  
 Aumento en la producción de tromboxano A<sub>2</sub> por las plaquetas  
 Aumento en la actividad de los factores V y X  
 Aumento en el fibrinógeno plasmático  
 Inhibición de la activación de la PC

**Figura. 1 Patogénesis del daño vascular por homocistina.** <sup>[2]</sup>

La homocisteína (Hcy) es un aminoácido sulfidrílico derivado de la desmetilación de la metionina.

En el plasma se encuentra presente de las siguientes formas moleculares:

- 1. Aproximadamente un 1% circula en forma libre, como monosulfato.
- 2. 70-80% se encuentra unida a las proteínas del plasma, predominantemente a la albúmina, en forma de disulfato.
- 3. El 20-30% restante se combina con ella misma o con otros tioles incluida la cisteína a través de puentes disulfuro.

El término “Hcy plasmática total” u “Hcy sérica” hace referencia al “pool” combinado de estas 4 formas. <sup>[3,4]</sup>

Tras una sobrecarga de metionina, se define la hiperhomocisteinemia como una Hcy superior a 2 desviaciones estándar (DE) sobre la media. <sup>[4]</sup> En individuos en ayunas los valores normales de Hcy oscilan entre 5 y 15  $\mu\text{mol/l}$ . <sup>[4,5]</sup>

- 1. Hiperhomocisteinemia moderada: 16-30  $\mu\text{mol/l}$ .
- 2. Hiperhomocisteinemia grave: 31-100  $\mu\text{mol/l}$ .
- 3. Hiperhomocisteinemia severa: > 100  $\mu\text{mol/l}$ .

La Hcy se forma durante el metabolismo de la metionina. El exceso de metionina procedente de la dieta o del catabolismo proteico es transformado en Hcy mediante dos reacciones químicas. En la primera se produce S-adenosil-metionina mediante una reacción catalizada por la L-metionina adenosil transferasa; tras la desmetilación ésta se transforma en S-adenosil homocisteína, que posteriormente será hidrolizada a homocisteína y adenosina por una hidrolasa, constituyendo la única fuente de homocisteína en los vertebrados. Una vez formada la Hcy se inician dos rutas metabólicas: Transulfuración y remetilación. El que la Hcy siga una ruta u otra viene determinado por la concentración plasmática de metionina. Si ésta aumenta, hay un aumento de la transulfuración y disminución de la remetilación. Cuando aumenta la síntesis de Hcy o disminuye su catabolismo aumenta su flujo hacia el espacio extracelular. Por tanto la concentración plasmática de Hcy es un indicador de la actividad de las enzimas y de la disponibilidad de coenzimas involucradas en su metabolismo.<sup>[5,6,7]</sup>

#### Remetilacion.

Se forma metionina mediante dos rutas metabólicas independientes en las que participan las enzimas 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína-S-metiltransferasa: metionina sintetasa (MS) y la betaína-homocisteína metiltransferasa (BHMT); la primera requiere de metilcobalamina (vitamina B12 como coenzima y de 5-metiltetrahidrofolato como cosubstrato). La segunda, que se encuentra en hígado, riñones y en glándulas suprarrenales, utiliza betaína como fuente de grupos metilo.

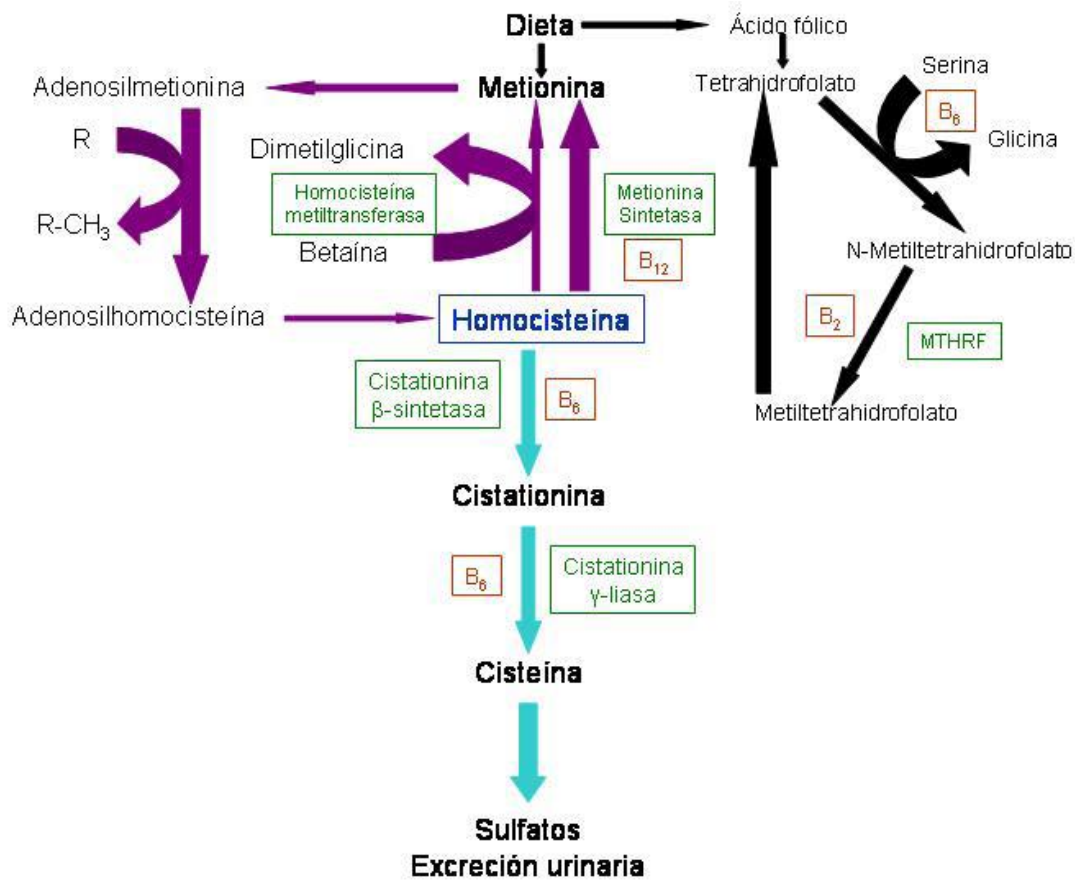
Aproximadamente el 50% de la Hcy es convertida en metionina mediante remetilación. La reacción en la que participa la MS es muy importante para el metabolismo del ácido fólico, permitiendo su ingreso en el depósito intracelular, imprescindible para la síntesis de ADN y la proliferación celular. En el hígado una gran cantidad de Hcy es remetilada por la BHMT. En otros tejidos la reacción es catalizada por la MS. <sup>[6,7]</sup>

#### Transulfuración

Cuando la vía de la remetilación se satura o cuando se precisa cisteína, la Hcy se transforma en cistationina (y después en cisteína) por la cistationina  $\beta$ -sintetasa (CBS) y la cistationina  $\gamma$ -liala. La vitamina B6 (piridoxina) es un cofactor esencial para las dos reacciones. La cisteína puede ser metabolizada posteriormente en sulfatos, que son excretados en la orina. <sup>[8,9]</sup>

La remetilación y la transulfuración son responsables cada una del 50% de la eliminación de la Hcy. La remetilación es la principal responsable de las concentraciones de Hcy en ayunas mientras que las alteraciones de la transulfuración aumentan las concentraciones de Hcy cuando los valores de metionina son elevados (como ocurre postprandialmente). <sup>[8,9,10]</sup>





**Figura 2. Metabolismo de la metionina.** [6]

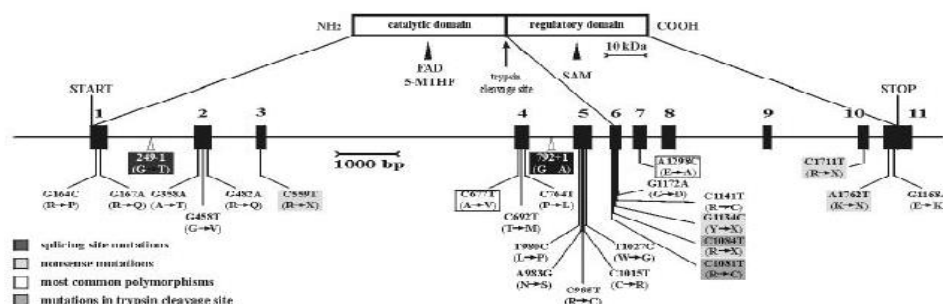
Las deficiencias heredadas en el metabolismo de la Hcy dan lugar a hiperhomocisteinemia; las dos más frecuentes son las que afectan a la CBS y la metiltetrahydrofolato reductasa (MTHFR)(9,10).

El déficit de CBS es la causa más frecuente de hiperhomocisteinemia severa y de la homocistinuria clásica. [11,12]

#### Polimorfismos de MTHFR

El gen que codifica para la enzima MTHFR, se localiza en el brazo corto del cromosoma 1 brazo p banda 36.3, entre los pares de base (pb) 11, 769,246-11, 788,568. La región codificadora abarca

1,980 bp con una masa molecular 74.6 kDa. El cDNA tiene una longitud de 2.2 kb integrado por 11 exones que oscilan entre 102 - 432 bp y 10 intrones que abarcan desde 250 - 1.5 kb, excepto del intrón 4 que tiene una longitud de 4,2 kb (Figura 4). [13,14]



**Figura 3. Estructura del gen MTHFR.** [15]

Se han descrito más de 20 polimorfismos en el gen *MTHFR*, pero uno de los más estudiados es el polimorfismo **C677T**. Kang y cols., [15] describen una variante de la enzima MTHFR con actividad disminuida, originada en el exón 4 del gen por el cambio de citosina (C) por timina (T) en la posición 677 del gen, este cambio genera una alanina por valina en el codón 222 de la proteína, que corresponde al sitio de unión de folatos, del cofactor MTHFR y Flavina-adeninaducleótido. Como consecuencia existen 3 genotipos: C/C (genotipo silvestre), C/T (genotipo heterocigoto) y TT (genotipo polimórfico) con el 100 %, 60% y 30% de actividad enzimática respectivamente. [49-52] La disminución de la actividad MTHFR provoca una reducción en la formación de 5-MTHF. Se ha observado que el alelo T produce alteración en la concentración de folatos en los eritrocitos, con acumulación de poliglutamatos, derivados metilados y homocisteinemia. [15,16]

La prevalencia de este polimorfismo varía entre las poblaciones estudiadas por lo que se ha reportado una frecuencia de 8.5% en daneses, 12% en canadienses, 38% en francocanadienses, 10% en afronorteamericanos, 44% al 47% en italianos, 36% en franceses y 34% en japoneses. En la

población mexicana se han descrito frecuencias que van de 50% al 58.5 % en mestizos; de 44% en la población de Guadalajara y del 34% en tarahumaras. <sup>[16,24-30]</sup>

Se ha observado que los portadores del genotipo 677TT presentan hiperhomocisteinemia moderada o intermedia, por lo que se plantea una posible relación con diferentes patologías como: defectos del tubo neural, síndrome de Down, enfermedades cardiovasculares, preeclampsia, leucemias y cáncer. <sup>[15,16,28,29,32]</sup> Así como, la resistencia a fármacos (metotrexate, 5-fluorouracilo, entre otros), en donde el metabolismo, efectos bioquímicos o de estructuras diana requieren reacciones de metilación. <sup>[31]</sup>

El polimorfismo **A1298C**, ha sido centro de múltiples estudios de asociación. Se caracteriza por el cambio de adenina (A) por C en el exón 7 del gen *MTHFR*, lo que produce un cambio de ácido glutámico por alanina en la posición 429 de la proteína, como consecuencia se disminuye (30 al 40%) la actividad catalítica de la enzima, sin alterar los niveles plasmáticos de homocisteína, por lo que se han observado efectos menos severos de este polimorfismo 1298CC. <sup>[36]</sup> Sin embargo, cuando se combina con el polimorfismo *C677T* ambos en estado heterocigoto, se ha observado reducción en la actividad enzimática. Esta combinación se ha descrito en el 28 % de los recién nacidos con defectos del tubo neural; estos y otros posibles polimorfismos del gen de la enzima *MTHFR* pueden combinarse con factores ambientales y producir un carácter patogénicos. <sup>[40]</sup> La frecuencia descrita para el polimorfismo *A1298C* en México es de 2.3% (CC), y para la población francesa de 11.5%. <sup>[41,42]</sup> Los estudios de asociación con cáncer de mama y el polimorfismo *A1298C* han sido controversiales unos carecen de asociación, <sup>[43]</sup> mientras que otros han observado su asociación con la sobrevida del cáncer de mama. <sup>[44]</sup>

El polimorfismo **T1317C** ubicada en el exón 7 del gen *MTHFR* que resulta de un cambio silente de una *T* por una *C*, sin cambio del aminoácido fenilalanina. Su frecuencia alélica en población

canadiense es relativamente baja (5%), seguida de la norteamericana (10%). Sin embargo, la africana es común (39%). Este polimorfismo no se ha relacionado con alguna patología. <sup>[44]</sup>

El polimorfismo **G1793A** se origina en el exón 11 del gen, por un cambio de base de G (guanina) por A en la posición 1793, que produce sustitución de arginina por glutamina (R594Q) en la proteína. <sup>[45]</sup> La frecuencia alélica descrita en población general en caucásicos de 6.9%, hispanos de 5.8%, afroamericanos de 3.1% y judíos Ashkenazi de 1.3%. <sup>[45]</sup> Se ha sugerido que este polimorfismo puede participar en la susceptibilidad a desarrollar cáncer de cabeza y cuello. <sup>[46]</sup>

Se han realizado diferentes estudios de asociación entre haplotipos del gen *MTHFR* con diferentes patologías. <sup>[46]</sup>

El defecto enzimático más frecuentemente asociado con elevación moderada de Hcy es la sustitución de cisteína por timina a nivel del nucleótido 677 (C677T) del gen codificante de la MTHFR, que da lugar a una variante termolábil de ésta, con una actividad del 50% respecto a la variante normal. <sup>[47,48]</sup>

La frecuencia alélica de la mutación es del 35% con una frecuencia homocigótica (TT) del 12% y en presencia de una carencia nutricional de ácido fólico pueden presentar elevaciones moderadas (50%) de la Hcy. <sup>[47,48]</sup>

Las concentraciones plasmáticas de vitaminas B12 y B6 así como las de ácido fólico se relacionan inversamente con las de Hcy y cualquier persona con un déficit de dichos cofactores presenta un riesgo elevado de hiperhomocisteinemia. <sup>[49]</sup>

A principios de los años sesenta, Carson y Neill describieron las Homocistinurias: Una serie de enfermedades causadas por mutaciones de los genes que codifican diferentes enzimas involucradas en el metabolismo intracelular de la Hcy y caracterizadas por una importante

elevación en su concentración plasmática y en la excreción urinaria de su homodímero, la homocistina. <sup>[50]</sup>

Clínicamente se expresaban como luxación del cristalino, signos y síntomas provocados por afectación neurológica y ósea, así como tendencia a fenómenos trombóticos arteriales y venosos en etapas tempranas de la vida, constituyendo éstos últimos la causa más importante de mortalidad en estos pacientes <sup>[51,52]</sup>

En 1969 McCully refirió 2 casos de homocistinuria asociados a arteriosclerosis prematura (a los 2 meses y 8 años de edad). <sup>[53]</sup>

En 1976 un estudio controlado demostró una asociación clara entre la elevación moderada de la Hcy en plasma y la arteriosclerosis. <sup>[54]</sup>

Algunos estudios, aunque no todos, han encontrado que el polimorfismo C677T en el gen de la MTHFR es un factor de riesgo de enfermedad vascular. <sup>[55]</sup>

En 1988, Kang y colaboradores; describieron que más del 5% de la población presenta una variante heredada termolábil de la enzima MTHFR, que se asociaba a una actividad reducida de dicha enzima. <sup>[56,57]</sup> Posteriormente, en 1995, Frost y colaboradores establecieron que el polimorfismo C677T de la MTHFR era el responsable de dicha variante enzimática mutada y que era un factor de riesgo independiente para la enfermedad vascular. <sup>[58,59]</sup> El polimorfismo C677T, la nueva variante enzimática de la MTHFR se caracteriza por la sustitución de valina por alanina en la cadena polipeptídica, dando lugar a una forma termolábil de ésta, cuya actividad enzimática es menor. <sup>[60,61]</sup> Los individuos homocigotos para este polimorfismo parecen asociarse a niveles moderadamente elevados de Hcy en plasma sobre todo en presencia de niveles bajos de folatos y algunos estudios han evidenciado un aumento en la prevalencia de estos homocigotos en

pacientes con enfermedad cardiovascular mientras que otros no han confirmado dicha relación.

<sup>[62,63]</sup> Un metaanálisis basado en ocho estudios demostró que la mutación homocigota C677T de la MTHFR estaba presente en 299 de 2476 pacientes con enfermedad cardiovascular (12,1%) y en 257 de 2481 controles sanos (10,4%) con una odds ratio de 1,22 (IC 95% 1,01-1,47). <sup>[29,30]</sup> Otro metaanálisis realizado sobre 13 estudios no encontró una diferencia significativa entre pacientes (3281) y controles (3218) en la frecuencia de mutación homocigótica (12,2% vs. 13,2%) ni en la prevalencia de heterocigotos (33,7% vs. 35,6%). El estudio de Meisel y colaboradores no encontró diferencias entre las distintas variantes alélicas de tres polimorfismos de la MTHFR y la presencia de niveles elevados de Hcy plasmática ni tampoco relación con la aparición de enfermedad coronaria. <sup>[64,65]</sup> Estos resultados contradictorios podrían deberse a diferentes criterios de selección de los pacientes o también a la inclusión de individuos procedentes de diferentes áreas geográficas o pertenecientes a grupos étnicos distintos: tres de los trabajos que encontraron relación directa entre la presencia de la variante polimórfica mutada y el desarrollo de arteriosclerosis coronaria se realizaron sobre población japonesa, mientras que los que obtuvieron resultados contradictorios se realizaron en otras áreas geográficas. <sup>[65,66]</sup> Otra posibilidad es que sea preciso que se produzcan alteraciones moleculares en varias enzimas relacionadas con el metabolismo de la Hcy para que ésta aumente en el plasma. También es de destacar que los estudios que han encontrado una relación entre las variantes alélicas del polimorfismo C677T de la MTHFR han incluido con frecuencia a pacientes jóvenes. <sup>[66]</sup>

Estos resultados discrepantes de diferentes estudios sugieren que hay interacciones complejas genético-medioambientales en la etiología de la enfermedad coronaria en relación con la hiperhomocisteinemia. <sup>[66]</sup>

Un metaanálisis de 8 estudios casos-controles sugiere que el genotipo TT es un modesto aunque significativo factor de riesgo para presentar enfermedad coronaria. El que el genotipo TT (un fuerte predictor de hiperhomocisteinemia en la población general).<sup>[67]</sup>

El metaanálisis más reciente llevado a cabo a este respecto parece confirmar que el genotipo TT presenta un mayor riesgo de enfermedad coronaria, sobre todo en presencia de niveles bajos de folatos.<sup>[68]</sup>

Un metaanálisis de 27 estudios observacionales, con aproximadamente 4000 pacientes mostró que la hiperhomocisteinemia se asociaba con un incremento del riesgo en eventos coronarios fatales y no fatales (odds ratio: 1,7; intervalo de confianza 95%: 1,5-1,9), enfermedad cerebrovascular (odds ratio: 2,5; intervalo de confianza 95%: 2-3), y enfermedad vascular periférica (odds ratio: 6,8; intervalo de confianza 95%: 2,9-15,8), La magnitud del riesgo era similar a la de otros factores de riesgo coronario como la hipercolesterolemia o el tabaquismo, estimándose que aproximadamente el 10% de la enfermedad coronaria en la población general podía atribuirse a la hiperhomocisteinemia.<sup>[66, 67,68]</sup> Asumiendo una relación lineal entre los niveles de Hcy y el riesgo cardiovascular, una elevación de 5  $\mu\text{mol/L}$  de los niveles de Hcy total conllevaría un aumento de riesgo cardiovascular de 0,33 (similar a una elevación de la concentración plasmática de colesterol total de 0,5  $\mu\text{mol/L}$ ).<sup>[66, 67,68]</sup>

El European Collaborative Study concluyó que la Hcy total era un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la arteriosclerosis, calculando un aumento del riesgo relativo de enfermedad vascular arteriosclerótica de 1,35 en hombres y 1,42 en mujeres por cada 0,5  $\mu\text{mol/L}$  de aumento de los niveles basales de Hcy total.<sup>[69]</sup>

Este meta-análisis de estudios observacionales sugieren que la homocisteína elevada es un modesto predictor independiente de riesgo de cardiopatía isquémica y los accidentes cerebrovasculares en personas sanas las poblaciones.

Konrad , Müller en el 2004 estudiaron la asociación entre la elevación de las concentraciones plasmáticas de homocisteína en la fase aguda de disecciones espontáneas de las arterias cervicales y la presencia de polimorfismo MTHFR 677 genotipo TT , demostrando que los niveles de homocisteína fueron influenciados por el género, el tabaquismo, la aparición de la hipertensión, los niveles vitamina B12 y folato, y por el genotipo MTHFR TT. El polimorfismo MTHFR 677 genotipo TT, no se asocio de forma independiente con la aparición de la disección espontánea de las arterias cervicales. Estos datos sugieren que niveles elevados de homocisteína se asocia con la aparición de la disección espontánea de las arterias cervicales. El polimorfismo C677T MTHFR se asocia con el nivel de homocisteína.<sup>[70]</sup>

Kudaïbergenova, Moldotashev , en 2012 realizaron un estudio para determinar la influencia del polimorfismo del gen MTHFR en pacientes con accidente cerebrovascular isquémico en la República de Kirguistán. El estudio genético molecular del polimorfismo C677T en el gen MTHFR se llevó a cabo en 107 pacientes de Kirguistán con accidente cerebrovascular isquémico. La limitación motora-funcional se evaluó por la escala de accidente cerebrovascular escandinava se asoció mayo limitación con detección de los genotipos TT del polimorfismo C677T en el gen de la MTHFR (0,05 y 0,14,  $p < 0,04$ ). En comparación con tensión arterial normal y accidente cerebrovascular, el desarrollo tensiones arteriales altas se asocia con la presencia de los genotipos TT mutantes de polimorfismo C677T en el gen de MTHFR (1,9% versus 9,1%,  $p < 0,04$ ).<sup>[71]</sup>

Al-Allawi , Avo , en el 2009 realizan un evaluar el polimorfismo del gen C677T MTHFR como un posible factor de riesgo en los pacientes con accidente cerebrovascular isquémico en Irak. Un



estudio de casos y controles en un hospital universitario en el norte de Irak. La población del estudio incluyó a 70 pacientes con accidente cerebrovascular isquémico diagnosticado por tomografía computarizada (TC) o la resonancia magnética (RM) y 50 controles emparejados por edad y sexo. La edad media de los pacientes fue de 60 años y el 54% eran varones. El análisis del gen MTHFR C677T genotipo TT fue detectado en el 20% de los pacientes y en el 6% de los controles y el genotipo CC en el 37% de los pacientes y en el 54% de los controles. El riesgo calculado de accidente cerebrovascular isquémico en los pacientes con genotipo TT fue 4,85 veces más que los sujetos con genotipo CC ( $P = 0,03$ ). Nivel de homocisteína en el suero fue significativamente mayor en los pacientes que en los controles ( $P = 0,02$ ). Los niveles de homocisteína sérica fueron significativamente mayores en los pacientes con genotipos TT y CT en comparación con aquellos con el genotipo CC ( $P < 0,001$  y  $p = 0,04$ , respectivamente).<sup>[72]</sup>

Arsene , Găină ,en el 2011 evaluaron la asociación de los dos polimorfismos MTHFR C677T y A1298C con accidente cerebrovascular isquémico en una serie de pacientes de un centro hospitalario .En el estudio participaron un total de 127 pacientes (67 con accidente cerebrovascular isquémico no cardioembólico diagnosticado por tomografía computarizada o resonancia magnética) y 60 casos de control. La edad media de los pacientes con ictus fue 68,73 años, y el 55,2% eran varones. Se reveló la presencia del genotipo TT en los sujetos control más que en la serie ictus (15% y 7,46% respectivamente). Además, el alelo T en general (CT + TT casos) estaba presente en el 71,6% de los casos de control, en comparación con pacientes con accidente cerebrovascular 44,7%. Alelo 1298C fue casi igual entre las dos series. Los dos polimorfismos MTHFR C677T y A1298C,, no parecían estar relacionados con la aparición del accidente cerebrovascular isquémico.<sup>[73]</sup>

Isordia I , Majluf A en el 2010 investigaron la posible asociación entre el polimorfismo C677T en el gen MTHFR y el accidente cerebrovascular isquémico idiopática en el joven mexicano-mestizo de la población. 178 pacientes <45 años con ictus isquémico idiopática y 183 controles se estudiaron para determinar el polimorfismo C677T en el gen de la MTHFR. Las causas de trombofilia primaria, así como los factores de riesgo clásicos de la enfermedad aterotrombótica también fueron evaluadas. No hubo una diferencia significativa en la distribución de los genotipos entre los pacientes y los controles ( $p = 0,01$ ), pero la frecuencia del alelo fue similar en ambos grupos ( $p = 0,09$ ). El análisis univariante identificó el alelo T como factor de riesgo para el ictus isquémico (TT y portadores CT), en comparación con los homocigotos para el alelo C ( $p = 0,01$ ). Además, el alelo T se asoció significativamente con un accidente cerebrovascular isquémico grandes vasos. <sup>[74]</sup>

Los estudios sobre el impacto en el riesgo de enfermedad de las variantes genéticas que afectan las concentraciones de homocisteína ayudará a determinar si la homocisteína es causal relacionados con la enfermedad vascular.

## V. JUSTIFICACION

Las enfermedades cardiovasculares son un problema de salud pública mundial. Hoy en día constituyen la primera causa de enfermedad y muerte en el mundo occidental y continuarán avanzando en los países en vías de desarrollo hasta sobrepasar a las enfermedades infecciosas.

Actualmente, y de acuerdo con la Federación Mundial del Corazón, las enfermedades cardiovasculares ocupan el primer lugar de morbilidad y mortalidad en casi dos terceras partes de la población mundial.

El EVC isquémico es una causa principal de muerte y discapacidad en los países desarrollados. En México, la enfermedad cerebrovascular isquémico representa la sexta causa de muerte en la población general.

Estudios anteriores identificaron un polimorfismo común (C677T) en el gen que codifica para la MTHFR como un factor de riesgo genético para el accidente cerebrovascular isquémico y la enfermedad de la arteria coronaria. Sin embargo, estos resultados no siempre han sido confirmados .

En México se considera que la mutación 677 de la MTHFR es el tipo de trombofilia hereditaria con mayor prevalencia 63% y contribuye a trombofilia en pacientes jóvenes hasta 64% , sin embargo con pocos estudios en población mexicana, así mismo el EVC ocupa el quinto lugar en mortalidad en la población adulta en nuestro país además es una de las cinco causas de ingreso a nuestro Hospital, por lo cual se pretende confirmar esta asociación en nuestra población.

## VI. Planteamiento del problema

El incremento en la tasa de morbi-mortalidad de enfermedad cardiovascular en nuestro país hace que el accidente vascular cerebral tipo isquémico constituya un problema de salud pública. Por lo que la identificación de factores etiológicos o de riesgo en población adulta requiere de múltiples estudios tanto clínicos como básicos. Se conoce que el accidente vascular cerebral tipo isquémico genera gran impacto social y económico; por lo anterior consideramos necesario evaluar la asociación del polimorfismo *C677T* en el gen *MTHFR* con el accidente vascular cerebral tipo isquémico en población adulta en México. Lo que nos lleva a plantear la siguiente pregunta de investigación:

*¿ La expresión del polimorfismo C677T de la MTHFR se relaciona con un incremento en la incidencia de EVC isquémico?*

## VII. Hipótesis

*La expresión del polimorfismo C677T de la MTHFR se asocia con un incremento en la incidencia de EVC isquémico.*

### Variables

Dependiente :

- EVC Isquémico

Independiente:

- *La expresión del polimorfismo C677T de la MTHFR*

## VII. OBJETIVOS

- Determinar que la expresión del polimorfismo C677T de la MTHFR se asocia con un incremento de la incidencia de EVC isquémico.

## IX Material y métodos

- Estudio No experimental. Casos y controles.
- Universo de trabajo.
  - Pacientes internados con el diagnóstico de EVC en el servicio de Urgencias del HGR1 Carlos Mc gregor Sánchez Navarro del IMSS.
- Método muestral
  - Muestreo no probabilístico por casos consecutivos.
- Tamaño de muestra.

$$n = (z\alpha\sqrt{pq} + z\beta\sqrt{p_1q_1} + \sqrt{p_0q_0})^2 \div (p_1 - p_0)^2$$

$$p_1 = \frac{p_0R}{1 + p_0(R - 1)}$$

$$p = \frac{1}{2(p_1 + p_0)}$$

$$q = 1 - p$$

$$q_1 = 1 - p_1$$

$$q_0 = 1 - p_0$$

Muestra: 150 casos, pareados con 150 controles.

## Criterios de inclusión

- Pacientes adultos con EVC isquémico, documentado por TAC simple/TAC multimodal /RM.
- Pacientes con EVC isquémico con secuelas o sin secuelas.
- Mayores de 16 años.
- Ambos sexos
- Acepten participación en el protocolo de estudio.
  
- Grupo control:
  - Pacientes internados en el servicio de Cirugía general.
  - Mayores de 16 años.
  - Sin antecedente de EVC
  - Sin antecedente de trombofilia.
  - Ambos sexos
  - Acepten participación en el protocolo de estudio.

#### Criterios de no inclusión

- Pacientes con Insuficiencia renal aguda o crónica
- Insuficiencia hepática.
- LES
- Hipotiroidismo
- Enfermedad inflamatoria intestinal
- Anemia perniciosa
- Anemia megaloblastica.
- Embarazo.
- No aceptación del paciente para ingresar al estudio

#### Criterios de exclusión

- Pacientes con EVC hemorrágico.
- Pacientes con EVC manejados con trombolisis.
- Pacientes con EVC manejados con reperfusión invasiva.
- Pacientes de cirugía con EVC reciente o enfermedad aterotrombotica.
- Pacientes que no desearon continuar con el estudio



## Variables

- *Independiente:*
- **Polimorfismo 677 MTHFR.** cualitativa dicotómica Definición: Sustitución de cisteína por timina a nivel del nucleótido 677 (C677T) del gen codificante de la MTHFR. *Tipo de variable:* Cualitativa nominal .Se medirá por secuencia de ADN y ARN. Genotipos: C/C (genotipo silvestre), C/T (genotipo heterocigoto) y TT (genotipo polimórfico).
- *Dependiente:*
- Evento Vascular Isquémico: cualitativa dicotómica. Definición: desarrollo de síntomas y signos clínicos de alteración focal o global de la función cerebral, con síntomas que tienen una duración de unas horas o más, o que progresan hacia la muerte y no tienen otra causa aparente que un origen vascular por disminución en el aporte sanguíneo. Ó presencia de Hipodensidad compatible con infarto o dignos tempranos demostrados en la tomografía de cráneo simple con signos y síntomas acompañantes. (Alteraciones tempranas del EVC por tomografía: reforzamiento de la arteria cerebral media, edema localizado, disminución de la relación sustancia gris-blanca, disminución de la visualización de los ganglios de la base). *Tipo de variable:* Cualitativa nominal.
- **Variables de confusión**
- **Variable confusora:** Sexo.
- *Definición:* Fenotipo del humano con sus características físicas, biológicas y sociales que establecen diferencias entre el hombre y la mujer. *Operacionalización:* Sexo referido por el

paciente, a través del cuestionario. *Tipo de variable:* Cualitativa nominal *Indicador:* 1. Hombre, 2. Mujer

- **Variable confusora:** Edad
- *Definición:* Tiempo entre la fecha de nacimiento y la fecha en que se aplica la encuesta.  
*Operacionalización:* Edad en años cumplidos al momento de la entrevista, referido por el paciente. *Tipo de variable:* Cuantitativa discreta. *Indicador:* años cumplidos
- **Variable confusora:** Diabetes Mellitus 2
- *Definición:* Trastorno de Hidratos de Carbono. *Operacionalización:* Diagnóstico previo de Diabetes Mellitus; Ingesta de fármacos hipoglucemiantes o uso de insulina; Glucemia central mayor de 126 en dos o más determinaciones a partir de su ingreso; Glucemia mayor de 200 más síntomas clásicos de la Diabetes Mellitus; Hemoglobina glucosilada mayor de 6.5 %. *Tipo de variable:* Cualitativa nominal dicotómica. *Indicador:* 1.Si , 2. No
- **Variable confusora:** Hipertensión Arterial
- *Definición:* Condición médica caracterizada por un incremento de las cifras de presión arterial. *Operacionalización:* Diagnóstico previo de hipertensión arterial, referido por el paciente ó tensión arterial medida durante la entrevista >130/85mmHg. *Tipo de variable:* Cualitativa nominal dicotómica. *Indicador:* 1. Hipertensión, 2. No Hipertensión
- **Variable confusora:** Dislipidemia
- *Definición:* Alteración de las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en la sangre.  
*Operacionalización:* Diagnóstico previo de hipercolesterolemia o hipertrigliceridemia,

referido por el paciente ó medición de lípidos en química clínica con alguno de los siguientes valores: a) Colesterol total >200mg/dl. b) Triglicéridos >150mg/d *Tipo de variable:* Cualitativa nominal Dicotómica *Indicador:* 1. Dislipidemia, 2. No Dislipidemia

- ***Variable confusora:*** Obesidad
- *Definición:* Condición patológica caracterizada por el exceso de peso dado por el aumento de la grasa corporal. *Operacionalización:* Índice de Masa Corporal (cociente entre el peso en kg y la talla al cuadrado) *Tipo de variable:* Cualitativa ordinal *Indicador:* 1. Normal 18-24.9 kg/m<sup>2</sup>, 2. Sobrepeso 25-29.9 kg/m<sup>2</sup>, 3. Obesidad >30kg/m<sup>2</sup>
- ***Variable confusora:*** *Cardiopatía Isquémica:*
- *Definición:* Antecedente de infarto agudo de miocardio, angina inestable o angina estable con o sin tratamiento médico farmacológico o intervencionista. *Tipo de variable:* Cualitativa Dicotómica *Indicador:* 1. Cardiopatía isquémica, 2. No Cardiopatía isquémica.
- ***Variable confusora:*** *Tabaquismo*
- *Definición:* Historia de ingesta de tabaco. *Tipo de variable:* Cualitativa Dicotómica *Indicador:* 1. Tabaquismo, 2. No tabaquismo.

#### Procedimiento.

- Una vez reunidos los criterios para ingresar al estudio, informados y con carta de aceptación firmada, Se incluirán pacientes hospitalizados en HGR 1, con diagnóstico de ingreso al servicio de urgencias de Evento vascular cerebral isquémico, definido como afección caracterizada por un rápido desarrollo de signos clínicos focales (en ocasiones globales) de la alteración en las funciones cerebrales, con una duración mayor de 24 horas o de curso fatal, sin otra causa aparente distinta de la vascular, ya sea con criterio clínico o tomográfico. A los cuales se aplicara cuestionario y se tomaran muestras sanguíneas para análisis de ADN 3 tubos, las muestras serán centrifugadas y separadas en sus diferentes componentes para su posterior traslado y almacenamiento en refrigeración, bajo los parámetros establecidos en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional Siglo XXI, donde se llevarán a cabo los estudios referentes al análisis genético, comparado con un grupo control de pacientes sin EVC ,ni enfermedad aterotrombótica reciente , con características basales similares, de hospitalización de cirugía general del HGR 1. Se realizará la determinación del polimorfismo de 677 de la MTHFR en ambos grupos.

#### Determinación de polimorfismo.

- La extracción de ADN y el ensayo de genotipificación serán realizados tomando como muestra al concentrado de leucocitos de las muestras sanguíneas.
- Se utilizará para cada tubo 1µl de sangre total sin tratamiento previo. Se añadirán 40 µl de mezcla de reacción de reacción en cadena de polimerasa (PCR) compuesta de 20 µl de *(QTM SYBR® Green Supermix. Bio-Rad)*.
- *La determinación del genotipo se basa en una técnica de PCR alelo-específica en la que se utiliza un único tubo por muestra.*
- Se utilizarán 2 tipos distintos de primers sentido, cada uno de ellos contiene una base distinta en el extremo 3' terminal que se corresponde con una de las 2 variantes alélicas del polimorfismo seleccionado, y un primer antisentido que amplifica con ambos alelos.

#### Análisis estadístico

- Las variables cuantitativas se expresaran como media  $\pm$  desviación estándar y las cualitativas como porcentajes. Se evaluará la distribución de las variables continuas mediante pruebas de normalidad. Se realizará un análisis descriptivo de la información mediante frecuencias simples, porcentajes, medidas de tendencia central y de dispersión.
- La comparación de diferencias entre las variables cualitativas se realizará mediante el test de la  $\chi^2$  o el test exacto de Fischer.

- Se llevará a cabo un análisis multivariado con finalidad de obtener la razón de momios de prevalencia ajustada entre el polimorfismo C677T MTHFR y la enfermedad vascular cerebral tipo isquémico.. El análisis multivariado también permitirá conocer la asociación entre las variables confusoras y la ocurrencia de la enfermedad vascular cerebral tipo isquémico.
- El nivel de significación estadística se establecerá en los diferentes test empleados para un valor de  $p < 0,05$  en sentido bilateral.

#### Consideraciones Éticas

- Este estudio cumple con los principios fijados por la XVIII Asamblea Medica Mundial en la declaración de Helsinki, la cual determina las recomendaciones para orientar a los médicos que realizan investigaciones biomédicas que incluyen sujetos humanos adoptadas por la XVIII Asamblea Medica Mundial Helsinki, Finlandia, Junio 1964 y enmendadas por la XXIX Asamblea Medica Mundial (Tokio, Japón, octubre 1975), la XXXV Asamblea Medica Mundial, Venecia, Italia (octubre 1983), y la XLI Asamblea Medica Mundial, Hong Kong (septiembre 1989) y por la XLVIII Asamblea General (Somerset West, República de Sudáfrica, octubre 1996).
- En acuerdo a lo dispuesto el Título Quinto, Capitulo Único, con todas sus Fracciones en la Ley General de Salud, última reforma publicada en el Diario Oficial de la Federación el 18 de diciembre de 2007, el Título Segundo, Capitulo I, Artículo 17, Fracción II, del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud, última

reforma publicada en el Diario Oficial de la Federación el 06 de enero de 1987; se consideró esta investigación Sin Riesgo ya que el desarrollo del protocolo no afectará el manejo terapéutico requerido por los pacientes que ingresen al estudio.

- El trabajo de investigación será aprobado por el Comité Local de Investigación del Hospital General Regional Gabriel Mancera del IMSS.
- Este estudio representa un riesgo mayor al mínimo debido a la toma de muestras sanguíneas.
- Los pacientes serán incluidos en el estudio sólo después de ser informados acerca de la naturaleza del estudio y dar su consentimiento por escrito para la utilización de sus muestras sanguíneas.
- Se tendrá cuidado y se aplicaran las normas de seguridad necesarias para los pacientes de acuerdo a los principios contenidos en el Código de Núremberg, la Declaración de Helsinki, la Enmienda de Tokio y el Informe Belmont.

## ANEXOS

### CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES DEL PROTOCOLO

**“ Influencia del polimorfismo C677T de la metiltetrahidrofolato-reductasa en la enfermedad vascular cerebral ”**

FECHAS	ACTIVIDADES.
ENERO 2013	DISEÑO DEL PROTOCOLO
FEBRERO 2013	INVESTIGACIÓN BIBLIOGRAFICA
FEBRERO 2013	REDACCION DEL PROTOCOLO
MARZO 2013	MODIFICACIONES DEL PROTOCOLO
ABRIL – DICIEMBRE 2013	RECOLECCION DE DATOS ,IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES Y TOMA DE MUESTRAS
DICIEMBRE 2013	PROCESAMIENTO DE DATOS
ENERO 2014	ANALISIS ESTADISTICO DE DATOS
ENERO 2014	ELABORACION DE CONCLUSIONES
FEBRERO 2014	REDACCION DEL ESCRITO O ARTICULO CIENTIFICO
FEBRERO 2014	ENVIO PARA SU PUBLICACION.



## INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

## HOSPITAL GENERAL REGIONAL 1: DR CARLOS MACGREGOR SANCHEZ NAVARRO

## MEDICINA INTERNA

## Influencia del polimorfismo C677T de la metiltetrahidrofolato-reductasa en la enfermedad vascular cerebral

Hoja de recolección de datos.

Caso

Control

Nombre:

Tel:

Afiliación:

Edad:

Sexo:

Fecha:

IMC:

T/A:

Peso:

Talla:

**Antecedentes**

<b>Tabaquismo</b>	Si	No
<b>Diabetes Mellitus</b>	Si	No
<b>Dislipidemia</b>	Si	No
<b>Hipertensión Arterial Sistémica</b>	Si	No
<b>Cardiopatía isquémica</b>	Si	No

Laboratorios:

<b>Glucosa</b>	mg/dl
<b>Colesterol</b>	mg/dl
<b>Triglicéridos</b>	mg/dl
<b>Polimorfismo</b>	Alelo C T Genotipo CC CT TT

## X II BIBLIOGRAFIA

1. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J.Clin.Invest* 1996;98:5-7.
2. Nappo F, De Rosa N, Marfella R, De Lucia D, Ingrosso D, Perna AF *et al.* Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. *JAMA* 1999;281:2113-18.
3. McQuillan BM, Beilby JP, Nidorf M, Thompson PL, Hung J. Hyperhomocysteinemia but not the C677T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase is an independent risk determinant of carotid wall thickening. The Perth Carotid Ultrasound Disease Assessment Study (CUDAS). *Circulation* 1999;99:2383-88.
4. De Franchis R, Mancini FP, D'Angelo A, Sebastio G, Fermo I, de S, V *et al.* Elevated total plasma homocysteine and 677C-->T mutation of the 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase gene in thrombotic vascular disease. *Am.J.Hum.Genet.* 1996;59:262-64.
5. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG. MTHFR 677C-- >T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA* 2002;288:2023-31.
6. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995;274:1049-57.
7. Cleophas TJ, Hornstra N, van Hoogstraten B, van der MJ. Homocysteine, a risk factor for coronary artery disease or not? A meta-analysis. *Am.J.Cardiol* 2000;86:1005-9, A8.
8. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM *et al.* Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA* 1997;277:1775-81.
9. Dalery K, Lussier-Cacan S, Selhub J, Davignon J, Latour Y, Genest J, Jr. Homocysteine and coronary artery disease in French Canadian subjects: relation with vitamins B12, B6, pyridoxal phosphate, and folate. *Am.J.Cardiol* 1995;75:1107-11.
10. Perry IJ, Refsum H, Morris RW, Ebrahim SB, Ueland PM, Shaper AG. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet* 1995;346:1395-98.
11. Bots ML, Launer LJ, Lindemans J, Hoes AW, Hofman A, Witteman JC *et al.* Homocysteine and short-term risk of myocardial infarction and stroke in the elderly: the Rotterdam Study. *Arch.Intern.Med* 1999;159:38-44.
12. Stubbs PJ, Al Obaidi MK, Conroy RM, MusB, Collinson PO, MRCPATH *et al.* Effect of plasma homocysteine concentration on early and late events in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000;102:605-10.
13. Gos M, Szecht A. Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. *J Appl Genet* 2002; 43:511-524
14. Kang SS, Zhou J, Wong PWK, Kowalysyn J, Strokosch G. Intermediate homocystinuria: a thermolabile variant of methylene tetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 414-421
15. Hughes LB, Beasley TM, Patel H, Tiwari HK, Morgan SL, Baggott JE, Saag KG, McNicholl J, Moreland LW, Alarcón GS, Bridges SL Jr. Racial Ethnic differences in allele frequencies of single nucleotide polymorphisms in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Their influence on Response to Methotrexate in Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65:1213-1218
16. Gollete P. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994; 7:195-200

17. Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells., *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:13217-13220
18. Isotalo PA, Donnelly JG. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase mutations in patients with venous thrombosis. *Mol Diagn* 2000; 5: 59-66
19. Kluijtmans LA, Kastelein JJ, Lindemans J, Boers GH, Heil SG, Bruschke AV, Jukema JW, van den Heuvel LP, Trijbels FJ, Boerma GJ, Verheugt FW, Willems F, Blom HJ. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 1997; 96: 2573-2577
20. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 1042-1050
21. McAndrew PE, Brandt JT, Pearl DK, Prior TW. The incidence of the gene for thermolabile methylene tetrahydrofolate reductase in African Americans. *Thromb Res* 1996; 83: 195-198
22. Davalos IP, Olivares N, Castillo MT, Cantu JM, Ibarra B, Sandoval L, Moran MC, Gallegos MP, Chakraborty R, Rivas F. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Ann Genet* 2000; 43: 89-92
23. Esfahani ST, Cogger EA, Caudill MA. Heterogeneity in the prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in women of different ethnic groups. *J Am Diet Assoc* 2003; 103: 200-207
24. Gallegos-Arreola MP, Figuera LE, Delgado JL, Puebla-Perez AM, Zuniga-Gonzalez GM: The MTHFR polymorphism C677T in adult patients with acute lymphoblastic leukemia is associated with an increased prevalence of cytogenetic abnormalities. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 40: 244-245
25. Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP, Namour F, Chabi NW, Sanni A, Anello G, Bosco P, Romano C, Amouzou E, Arrieta HR, Sanchez BE, Romano A, Herbeth B, Guillard JC, Mutchinick OM. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 701-707
26. Turello R, Rentsch K, Di Paolo E, Popovic MB Renal failure after high-dose methotrexate in a child homozygous for MTHFR C677T polymorphism. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 50:154-6
27. Chou YC, Wu MH, Yu JC, Lee MS, Yang T, Shih HL, Wu TY, Sun CA. Genetic polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene, plasma folate levels and breast cancer susceptibility: a case-control study in Taiwan. *Carcinogenesis* 2006, 27:2295-2300
28. Shrubsole MJ, Jin F, Dai Q, Shu XO, Potter JD, Hebert JR, Gao YT, Zheng W. Dietary folate intake and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Res* 2001, 61:7136-41
29. Lajous M, Romieu I, Sabia S, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F: Folate, vitamin B12 and postmenopausal breast cancer in a prospective study of French women. *Cancer Causes Control* 2006, 17:1209-1213
30. Lewis SJ, Harbord RM, Harris R, Smith GD: Meta-analyses of observational and genetic association studies of folate intakes or levels and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2006, 98:1607-1622
31. Chen J, Gammon MD, Chan W, Palomeque C, Wetmur JG, Kabat GC, Teitelbaum SL, Britton JA, Terry MB, Neugut AI, Santella RM: One-carbon metabolism, MTHFR polymorphisms, and risk of breast cancer. *Cancer Res* 2005, 65:1606-1614
32. Campbell IG, Baxter SW, Eccles DM, Choong DY: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002, 4:R14
33. Langsenlehner T, Renner W, Yazdani-Biuki B, Langsenlehner U. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and breast cancer risk: a nested-case-control study and a pooled meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2008, 107:459-460

34. Macis D, Maisonneuve P, Johansson H, Bonanni B, Botteri E, Iodice S, Santillo B, Penco S, Gucciardo G, D'Aiuto G, Rosselli Del Turco M, Amadori M, Costa A, Decensi A: Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and breast cancer risk: a nested-case-control study and a pooled meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2007, 106:263-271
35. Justenhoven C, Hamann U, Pierl CB, Rabstein S, Pesch B, Harth V, Baisch C, Vollmert C, Illig T, Brüning T, Ko Y, Brauch H: One-carbon metabolism and breast cancer risk: no association of MTHFR, MTR, and TYMS polymorphisms in the GENICA study from Germany. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14:3015-3018
36. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R: A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998, 64:169-172
37. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Curtis ER, Eckfeldt JH, Rozen R. The 1298A-->C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 2001,156:409-415
38. Izumi M, Iwai N, Ohmichi N, Nakamura Y, Shimoike H, Kinoshita M. Molecular variant of 5,10- methylene tetrahydrofolate reductase: risk factor of ischemic heart disease in the Japanese population. *Atherosclerosis* 1996; 121: 293 - 294
39. Qiu LX, Zhang J, Li WH, Zhang QL, Yu H, Wang BY, Wang LP, Wang JL, Wang HJ, Liu XJ, Luo ZG, Wu XH. Lack of association between methylenetetrahydrofolate reductase gene A1298C polymorphism and breast cancer susceptibility. *Mol Biol Rep* 2011; 38:2295-2299
40. Martin DN, Boersma BJ, Howe TM, Goodman JE, Mechanic LE, Chanock SJ, Amb S. Association of MTHFR gene polymorphisms with breast cancer survival. *BMC Cancer*. 2006; 27:257
41. Meisel C, Cascorbi I, Gerloff T, Stangl V, Laule M, Müller JM, Wernecke KD, Baumann G, Roots I, Stangl K. Identification of six methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genotypes resulting from common polymorphisms: impact on plasma homocysteine levels and development of coronary artery disease *Atherosclerosis* 2001; 154:651-658
42. Rady PL, Szucs S, Grady J, Hudnall SD, Kellner LH, Nitowsky H, Tyring SK, Matalon RK. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. *Am J Med Genet* 2002; 107:162-168
43. Rady PL, Tyring SK, Hudnall SD, Vargas T, Kellner LH, Nitowsky H, Matalon RK. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): the incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Med Genet* 1999;86:380-384
44. Neumann AS, Lyons HJ, Shen H, Liu Z, Shi Q, Sturgis EM, Shete S, Spitz MR, El-Naggar A, Hong WK, Wei Q. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis. *Int J Cancer* 2005;115:131-136
45. Meisel C, Cascorbi I, Gerloff T, Stangl V, Laule M, Müller JM, Wernecke KD, Baumann G, Roots I, Stangl K. Identification of six methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genotypes resulting from common polymorphisms: impact on plasma homocysteine levels and development of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2001; 154:651-658
46. Cicek MS, Nock NL, Li L, Conti DV, Casey G, Witte JS.. Relationship between methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C genotypes and haplotypes and prostate cancer risk and aggressiveness. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13:1331-1336
47. Evans RW, Shaten BJ, Hempel JD, Cutler JA, Kuller LH. Homocyst(e)ine and risk of cardiovascular disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol*. 1997;17:1947-53.

48. Thogersen AM, Nilsson TK, Dahlen G, Jansson JH, Boman K, Huhtasaari F *et al.* Homozygosity for the C677-->T mutation of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and total plasma homocyst(e)ine are not associated with greater than normal risk of a first myocardial infarction in northern Sweden. *Coron.Artery Dis.* 2001;12:85-90.
49. Verhoef P, Hennekens CH, Malinow MR, Kok FJ, Willett WC, Stampfer MJ. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of ischemic stroke. *Stroke* 1994;25:1924-30.
50. Ridker PM, Shih J, Cook TJ, Clearfield M, Downs JR, Pradhan AD *et al.* Plasma homocysteine concentration, statin therapy, and the risk of first acute coronary events. *Circulation* 2002;105:1776-79.
51. Stangl K, Cascorbi I, Stangl V, Laule M, Dschietzig T, Richter C *et al.* Hyperhomocysteinaemia and adverse events complicating coronary catheter interventions. *Int.J.Cardiol* 2000;76:211-17.
52. Lindgren A, Brattstrom L, Norrving B, Hultberg B, Andersson A, Johansson BB. Plasma homocysteine in the acute and convalescent phases after stroke. *Stroke* 1995;26:795-800.
53. Okada E, Oida K, Tada H, Asazuma K, Eguchi K, Tohda G *et al.* Hyperhomocysteinemia is a risk factor for coronary arteriosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999;22:484-90.
54. Robinson K, Arheart K, Refsum H, Brattstrom L, Boers G, Ueland P *et al.* Low circulating folate and vitamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. European COMAC Group. *Circulation* 1998;97:437-43.
55. Vermeulen EG, Stehouwer CD, Twisk JW, van den BM, de Jong SC, Mackaay AJ *et al.* Effect of homocysteine-lowering treatment with folic acid plus vitamin B6 on progression of subclinical atherosclerosis: a randomised, placebocontrolled trial. *Lancet* 2000;355:517-22.
56. Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ, Payne N, Durrant HJ, Lewis MJ *et al.* Folic acid improves endothelial function in coronary artery disease via mechanisms largely independent of homocysteine lowering. *Circulation* 2002;105:22-26.
57. Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, Spence JD, Pettigrew LC, Howard VJ *et al.* Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA* 2004;291:565-75.
58. Schnyder G, Roffi M, Flammer Y, Pin R, Hess OM. Effect of homocysteinelowering therapy with folic acid, vitamin B12, and vitamin B6 on clinical outcome after percutaneous coronary intervention: the Swiss Heart study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288:973-79.
59. Franco RF, Araujo AG, Guerreiro JF, Elion J, Zago MA. Analysis of the 677 C-->T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb.Haemost.* 1998;79:119-21.
60. Chambers JC, Ireland H, Thompson E, Reilly P, Obeid OA, Refsum H *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-->T mutation and coronary heart disease risk in UK Indian Asians. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2000;20:2448-52.
61. Kim CH, Hwang KY, Choi TM, Shin WY, Hong SY. The methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in Koreans with coronary artery disease. *Int.J.Cardiol* 2001;78:13-17.
62. Pinto X, Vilaseca MA, Garcia-Giralt N, Ferrer I, Pala M, Meco JF *et al.* Homocysteine and the MTHFR 677C-->T allele in premature coronary artery disease. Case control and family studies. *Eur.J.Clin.Invest* 2001;31:24-30.
63. Vulapalli R, Liang C, Zareba W, Moss AJ. Recurrent coronary events are not increased in postinfarction patients with methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism. *Am.J.Cardiol* 2001;87:1289-92.

64. Rothenbacher D, Fischer HG, Hoffmeister A, Hoffmann MM, Marz W, Bode G *et al.* Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase genotype: association with risk of coronary heart disease and relation to inflammatory, hemostatic, and lipid parameters. *Atherosclerosis* 2002;162:193-200.
65. Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 1998;98:2520-26.
66. Brilakis ES, Berger PB, Ballman KV, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T and methionine synthase reductase (MTRR) 66A>G polymorphisms: association with serum homocysteine and angiographic coronary artery disease in the era of flour products fortified with folic acid. *Atherosclerosis* 2003;168:315-22.
67. Zylberstein DE, Bengtsson C, Bjorkelund C, Landaas S, Sundh V, Thelle D *et al.* Serum homocysteine in relation to mortality and morbidity from coronary heart disease: a 24-year follow-up of the population study of women in Gothenburg. *Circulation* 2004;109:601-06.
68. Girelli D, Martinelli N, Pizzolo F, Friso S, Olivieri O, Stranieri C *et al.* The interaction between MTHFR 677 C-->T genotype and folate status is a determinant of coronary atherosclerosis risk. *J.Nutr.* 2003;133:1281-85.
69. Kluijtmans LA, Whitehead AS. Methylenetetrahydrofolate reductase genotypes and predisposition to atherothrombotic disease; evidence that all three MTHFR C677T genotypes confer different levels of risk. *Eur.Heart J.* 2001;22:294-99.
70. Konrad C, Müller G, Langer C, Kuhlenbäumer G, Berger K, Nabavi DG, Dziewas R, Stögbauer F, Ringelstein EB, Junker R. Plasma homocysteine, MTHFR C677T, CBS 844ins68bp, and MTHFD1 G1958A polymorphisms in spontaneous cervical artery dissections. *J Neurol.* 2004 Oct;251(10):1242-8.
71. Kudaïbergenova N, Moldotashev I, Aldashev A, Mukhanova A. Role of methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism in the development of ischemic stroke in the dwellers of the Kyrgyz Republic. *Ter Arkh.* 2012;84:37-41.
72. Al-Allawi A, Avo A, Jubrael J. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in Iraqi patients with ischemic stroke. *Neurol India.* 2009 Sep-Oct;57:631-5.
73. Arsene D, Găină G, Bălescu C, Ardeleanu C. C677T and A1298C methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms as factors involved in ischemic stroke. *Rom J Morphol Embryol.* 2011;52:1203-7.
74. Isordia I, Barinagarrementeria F, Leños A, Barrayo G, Vela J, García J, Ibarra I, Majluf A. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with idiopathic ischemic stroke in the young Mexican-Mestizo population. *Cerebrovasc Dis.* 2010;29:454-9.