



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Caracterización genética de variantes alélicas de  
*timidilato sintetasa* y *dihidrofolato reductasa* en una  
muestra de población mexicana mestiza**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**ÁLVARO GUILLERMO VÁZQUEZ SÁNCHEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**Año 2007**



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.

Jurado asignado:

Presidente: Prof. JORGE MANUEL VAZQUEZ RAMOS

Vocal: Profa. ALICIA BEATRIZ CERVANTES PEREDO

Secretario: Prof. OSVALDO MUTCHINICK BARINGOLTZ

1er. Suplante: Profa. MARIA BENITA LEONOR FERNANDEZ SALGADO

2º. Suplente: Profa. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Departamento de Genética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición  
"Salvador Zubirán"

Asesor del tema:

Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz

---

Supervisor Técnico

QB. Beatriz Sánchez Hernández

---

Sustentante:

Álvaro Guillermo Vázquez Sánchez

---

## AGRADECIMIENTOS

*... yo te bendigo, vida  
porque nunca me diste  
ni esperanza fallida  
ni trabajo injusto,  
ni pena inmerecida.*

*Porque veo al final de mi rudo camino  
que yo fui el arquitecto de mi propio destino  
que si extraje la hiel o la miel de las cosas,  
fue porque en ellas puse hiel, o mieles sabrosas...  
...¡Ame, fui amado, el sol acarició mi faz!  
¡Vida, nada me debes! ¡Vida, estamos en paz!*

*Amado Nervo*

Gracias a la UNAM y a la Facultad de Química por haberme concedido el privilegio de estudiar en sus instalaciones y obtener una visión crítica de la vida. Gracias a todos los profesores que me impartieron clase y a todos aquellos que me dejaron una enseñanza.

Gracias a mis padres Arturo y Juanita por haberme entendido y apoyado a lo largo de la carrera, gracias por los consejos y regaños, gracias por haberme dado la educación que hoy tengo y por hacer de mí lo que hoy soy. Gracias a mi hermano *Betito* por apoyarme en los momentos difíciles, gracias por tus palabras y por marcarme el camino que debía seguir.

Gracias a mi pareja Celia Galicia por haber compartido este sueño y por ayudarme a vivirlo, gracias por crecer a mi lado como persona, gracias por tu tiempo y tu cariño.

Gracias a todos los integrantes del departamento de Genética del INCMNSZ por compartir todo este tiempo conmigo, en especial quiero agradecer a

mi asesor, el Dr. Mutchinick por haber creído en mi para este proyecto, por haberme auxiliado y encaminado en la tesis. Gracias a mi supervisora técnica por dedicarme un poco de su tiempo y enseñarme a trabajar en el laboratorio. Gracias al apreciado Dr. Juan José Morales por enseñarme la estadística aquí empleada. Gracias a mis amigos Saúl y Julio por hacer de los días una enseñanza de convivencia y dejarme conocerlos.

Quiero disculparme si en estos momentos omito a alguien, son tantos los nombres que me gustaría mencionar que unas cuantas hojas no serían suficientes, pero saben que de corazón siempre agradeceré el ánimo que me inyectaron.

Gracias a mis abuelitos que donde quiera que estén siempre se mantuvieron a mi lado. Gracias a mi tío *Manú* por ser como un padre para mí. A todos mis familiares y compañeros que creyeron en mí también dedico estas letras y les hago un reconocimiento especial. En fin, a todos aquellos que estuvieron cerca de mí gracias por su apoyo y por impulsarme para lograr un objetivo más en mi vida, gracias por toda su comprensión y por el tiempo que sin quererlo les robé y no compartí con ustedes, este logro es totalmente suyo.

# ÍNDICE

CONTENIDO	PAGINA
1. ANTECEDENTES	6
1.1 Ácidos nucleicos	6
1.2 Síntesis de timidilato	10
1.3 Timidilato sintetasa	12
1.3.1 Variantes alélicas del gen de la TS	14
1.3.2 SNP en la variante de tres repetidos en <i>TYMS</i>	16
1.3.3 Frecuencia de las variantes de <i>TYMS</i> en diversas poblaciones	18
1.4 Dihidrofolato reductasa	19
1.4.1 Variantes genéticas en <i>DHFR</i>	22
1.4.2 Frecuencia de la variante alélica del19pb del gen de la DHFR en diversas poblaciones	23
1.5 Ácido fólico, vitamina B12 y homocisteína	24
1.6 Metabolismo de los folatos	27
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
3. JUSTIFICACIÓN	30
4. OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo general	31
4.2 Objetivos específicos	31
5. HIPÓTESIS DEL TRABAJO	32
6. MATERIAL Y MÉTODOS	32
6.1 Población de estudio	32

6.1.1	Criterios de selección	32
6.1.2	Tamaño de la muestra	33
6.2	Descripción del procedimiento	33
6.3	Variables a medir	34
6.4	Métodos de análisis de laboratorio	34
6.4.1	Extracción de ADN	34
6.4.2	Cuantificación de ADN	35
6.4.3	Genotipificación de las variantes alélicas de <i>TYMS</i> y <i>DHFR</i>	36
6.4.3.1	PCR y electroforesis	36
6.4.3.2	Identificación del SNP G→C	38
6.4.4	Análisis estadístico	38
7.	RESULTADOS	39
7.1	Timidilato sintetasa	39
7.1.1	Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes de repetidos de 28pb y SNP G→C en la variante de tres repetidos	40
7.1.2	Equilibrio de Hardy-Weinberg	43
7.1.3	Niveles de homocisteína, folatos y vitamina B12 con respecto al genotipo y al sexo.	43
7.1.4	Frecuencias genotípica y alélica con respecto a otras poblaciones	56
7.2	Dihidrofolato reductasa	60
7.2.1	Frecuencias genotípica y alélicas de la variante del 19pb	61
7.2.2	Equilibrio de Hardy-Weinberg	63
7.2.3	Niveles de homocisteína, folatos y vitamina B12 con respecto al genotipo y al sexo.	63

7.2.4 Frecuencias genotípica y alélica con respecto a otras poblaciones	70
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	72
9. CONCLUSIONES	81
10. PERSPECTIVAS	83
11. BIBLIOGRAFÍA	84
ANEXO I. Cálculos para la obtención de frecuencias genotípica y alélica y equilibrio de Hardy-Weinberg	i
ANEXO II. Listado descriptivo de las muestras empleadas en el estudio	v
ANEXO III. Niveles de metabolitos por genotipos y por sexo	xii
ANEXO IV. Reactivos y soluciones	xx

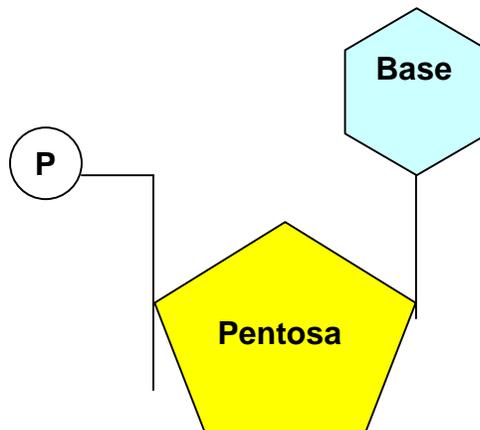
## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos, ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), son macromoléculas encargadas de almacenar y transferir la información genética (Lehninger, 1994)

Al analizar el producto de la hidrólisis total de cualquier ácido nucleico se obtienen siempre tres componentes (Fig. 1):

- una pentosa,
- una base nitrogenada,
- un grupo fosfato

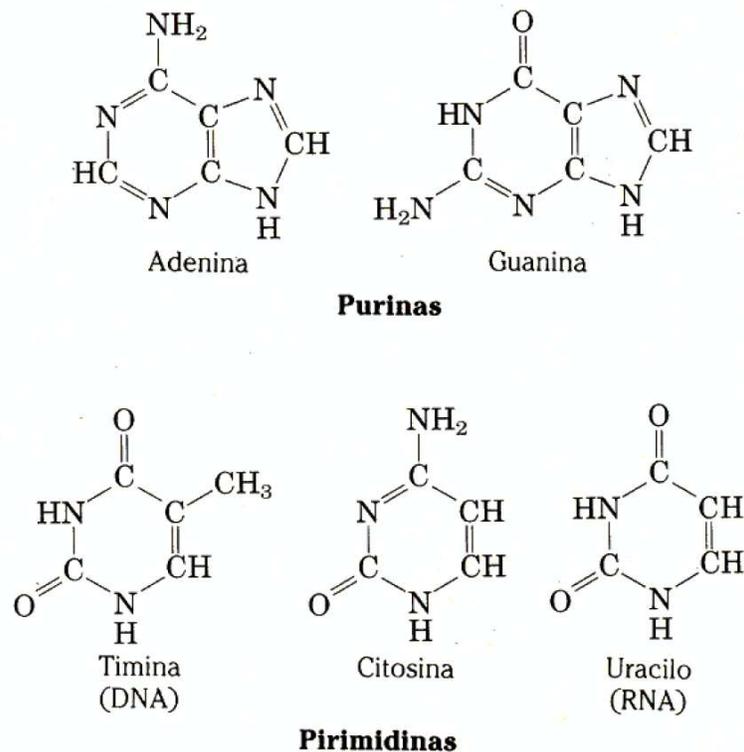


**Base + Pentosa + Fosfato = nucleótido**

**Fig. 1.** Estructura de un nucleótido. La unión de una pentosa, una base nitrogenada y un fosfato en relación 1:1:1 constituye un nucleótido, unidad básica o monómero de los ácidos nucleicos. Figura realizada por A. Vázquez tomando como referencia: Lehninger. Principios de Bioquímica, 3ª ed, 2001.

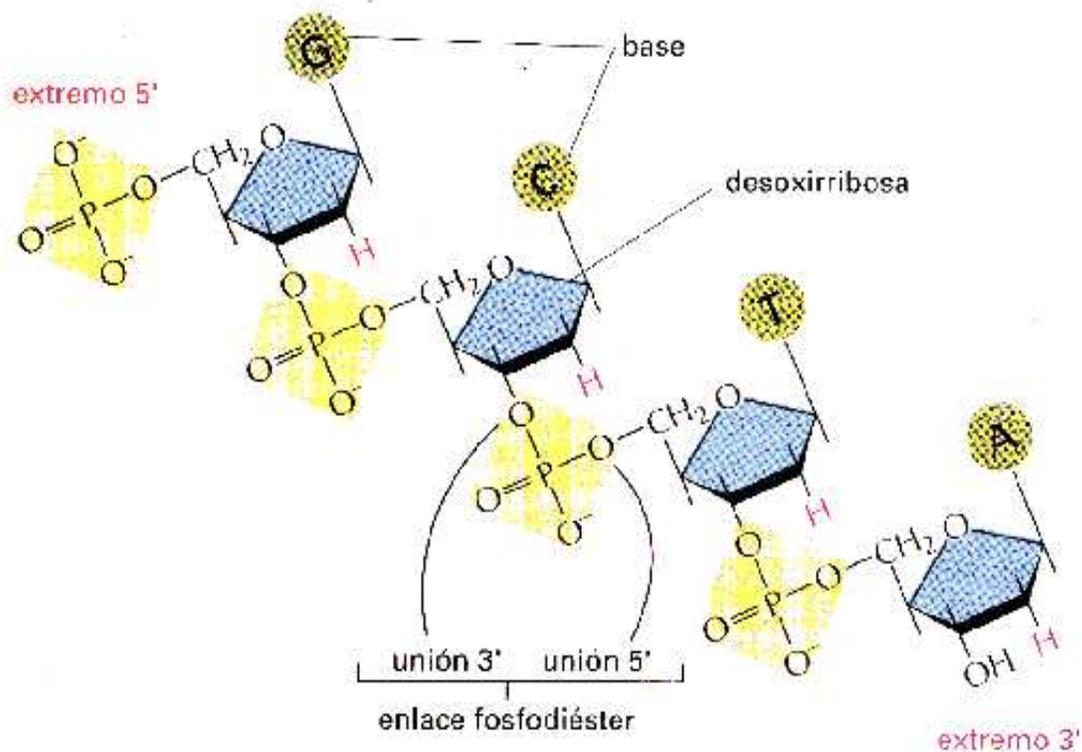
El monosacárido es una pentosa: ribosa o desoxirribosa. La diferencia entre ambas reside en que el grupo hidroxilo (-OH) del carbono 2' de la ribosa es sustituido por un hidrógeno en la desoxirribosa. Los nucleótidos con ribosa (ribonucleótidos) son los constituyentes del ARN, mientras que aquellos que tienen desoxirribosa (desoxirribonucleótidos), constituyen el ADN (Nelson y Cox, 2001).

Las bases nitrogenadas, son una familia de moléculas cíclicas derivadas de dos anillos básicos: purina y pirimidina. El ADN contiene dos bases púricas, adenina (A) y guanina (G) y dos bases pirimidínicas citosina (C) y timina (T). En el ARN las bases púricas son las mismas que en el ADN, sin embargo, las bases pirimidínicas son la citosina y el uracilo (U) (Nelson y Cox, 2001, ver Fig. 2)



**Fig. 2.** Estructura de las Bases Nitrogenadas. Figura tomada de Lehninger. Principios de Bioquímica, 3ª ed, 2001.

Los ácidos nucleicos, ADN y ARN, son cadenas de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos respectivamente, unidos entre sí por enlaces fosfodiéster entre los C 5' y 3' de las pentosas de nucleótidos consecutivos. De esta forma el extremo 5' de la cadena polinucleotídica tendrá un grupo fosfato libre y el extremo 3' un grupo hidroxilo libre (Alberts et al, 3ª ed, 2002, ver Fig. 3).



**Fig. 3.** Enlace fosfodiéster en la estructura de los ácidos nucleicos. (Figura tomada de Biología molecular de la célula, 3ª ed, 2002)

La secuencia lineal de los nucleótidos de un ácido nucleico se abrevia con la letra correspondiente a la inicial de cada base nitrogenada comenzando desde la izquierda, por el extremo 5' de la cadena. Así, el extremo 5' hace referencia al primer nucleótido de la cadena y el extremo 3' al último. La secuencia de bases

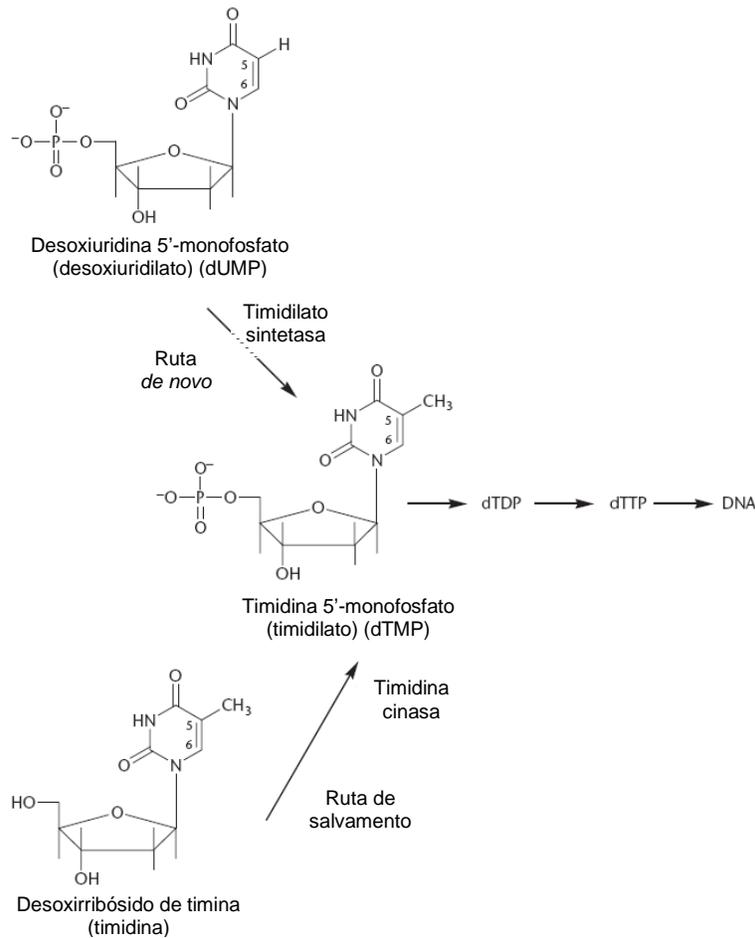
constituye lo que se denomina estructura primaria y se lee en sentido 5'-3' de la cadena de nucleótidos. Un dinucleótido en el que se unieron un nucleótido con la base A con un nucleótido con la base G y el enlace fosfodiéster se formó entre el carbono 3' del nucleótido con base A y el 5' del nucleótido con base G, se representa simplemente como AG. Si a este dinucleótido se le agrega otro nucleótido en el carbono 3' y este nucleótido tiene una base T, el trinucleótido resultante se representará por AGT. Ésta es la forma simplificada en que se acostumbra representar los polinucleótidos (Alberts et al, 3ª ed, 2002).

Los ribonucleósidos y los desoxirribonucleósidos fosfato son esenciales para todas las células. Sin ellos, ni el ADN, ni el ARN pueden ser producidos, y por tanto las proteínas no pueden ser sintetizadas o las células proliferar. Los nucleótidos también sirven como transportadores de actividad intermediaria en la síntesis de algunos carbohidratos, lípidos y proteínas y son componentes estructurales de un número de coenzimas esenciales como la coenzima A, FAD, NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup>. En adición, los nucleótidos tienen una función importante como moneda energética en la célula (Lehninger, 1994)

Asimismo, los nucleótidos son importantes compuestos regulatorios para muchas de las rutas del metabolismo, inhibiendo o activando enzimas claves. Las bases de purina y pirimidina que se encuentran en los nucleótidos pueden ser sintetizadas *de novo* o pueden ser obtenidos a través de rutas de salvamento que permiten el reuso de las bases preformadas resultado de un ciclo celular normal o de las ingeridas por la dieta (Kisliuk, 2005).

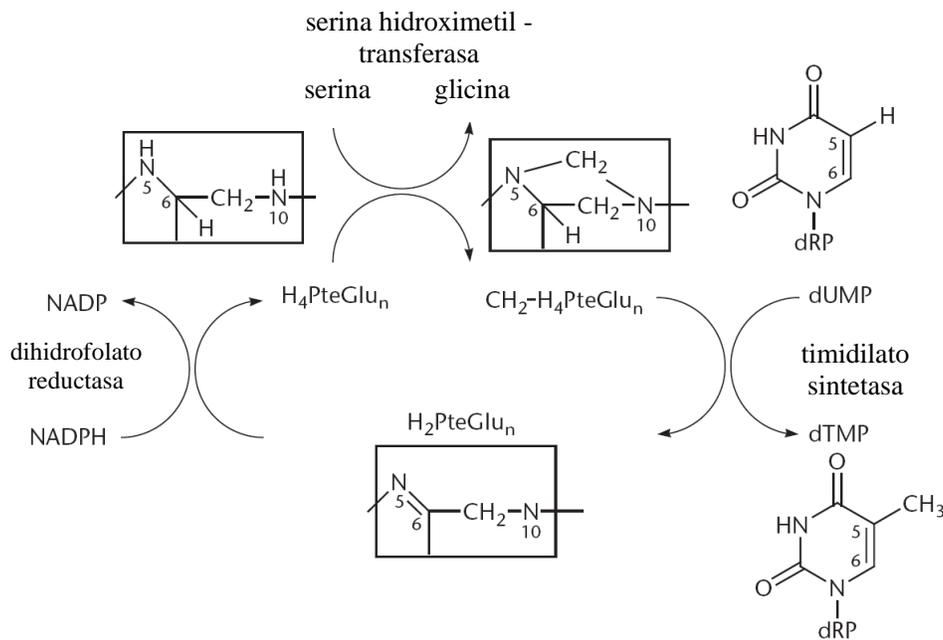
## 1.2 Síntesis de timidilato

El timidilato (desoxitimidin 5'-monofosfato, metiluracil-2'-desoxiribósido-5'-fosfato, dTMP) es un metabolito esencial requerido para la síntesis y reparación del ADN (Kisliuk, 2005, ver Fig. 4).



**Fig. 4.** Síntesis e incorporación del timidilato al ADN (Figura modificada de Kisliuk, 2005)

Plantas, animales y muchas bacterias producen timidilato *de novo* a partir del desoxiuridilato (dUMP) y del metilén tetrahidrofolato mediante la acción del ciclo del dTMP, el cual involucra a las enzimas timidilato sintetasa (TS), dihidrofolato reductasa (DHFR) y serina hidroximetiltransferasa (Kisliuk, 2005, ver Fig. 5).

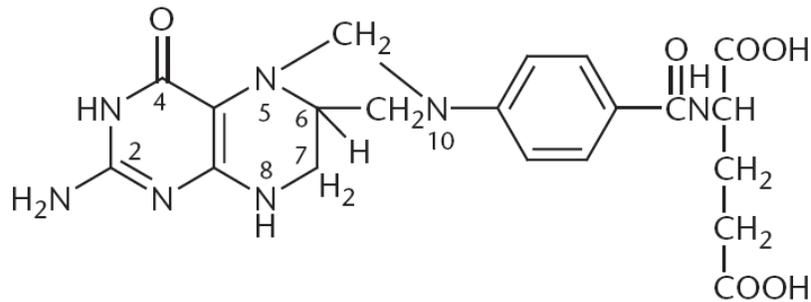


**Fig. 5.** El ciclo del timidilato involucra a las enzimas timidilato sintetasa, dihidrofolato reductasa y serina hidroximetil transferasa. Las estructuras en los cuadros representan porciones de coenzimas del folato participantes en las reacciones:  $\text{H}_4\text{PteGlu}_n$ = tetrahidrofolato;  $\text{CH}_2\text{-H}_4\text{PteGlu}_n$ = 5,10-metilén tetrahidrofolato;  $\text{H}_2\text{PteGlu}_n$ = 7,8-dihidrofolato. dRP= 2'-desoxirribosa-5'-fosfato; n= número de residuos de glutamato. (Figura modificada de Kisliuk, 2005)

Además de la síntesis *de novo*, se puede obtener dTMP a través de una ruta alterna llamada “de salvamento” (ver Fig. 4) que no involucra a la timidilato sintetasa y que consiste en utilizar como sustrato timidina, en vez de dUMP,

mediante la acción intracelular de la timidina cinasa, que adiciona un grupo fosfato en la posición 5' a la timidina para formar timidilato (Kisliuk, 2005).

En mamíferos alrededor de 20 enzimas están involucradas en el metabolismo de moléculas de un solo carbono dependientes de tetrahidrofolato, en la ruta de la timidilato sintetasa el 5,10-metilén tetrahidrofolato actúa como donador y como receptor de un carbono (Kisliuk, 2005, ver Fig. 6).



**Fig. 6.** Estructura química del ácido 5,10-metilén-5,6,7,8-tetrahidrofólico.  
(Figura modificada de Kisliuk, 2005)

### 1.3 Timidilato sintetasa

El gen *TYMS* codifica para la enzima timidilato sintetasa (TS) y se localiza en la región cromosómica 18p11.32. La enzima TS es responsable de la provisión de timidina para la síntesis y reparación del ADN, cataliza la conversión de desoxiuridilato a desoxitimidilato por la conversión simultánea de 5,10-metilén

tetrahidrofolato –que dona un grupo metilo al dUMP en la posición 5- a dihidrofolato (Hishida et al, 2003 ver Fig. 5).

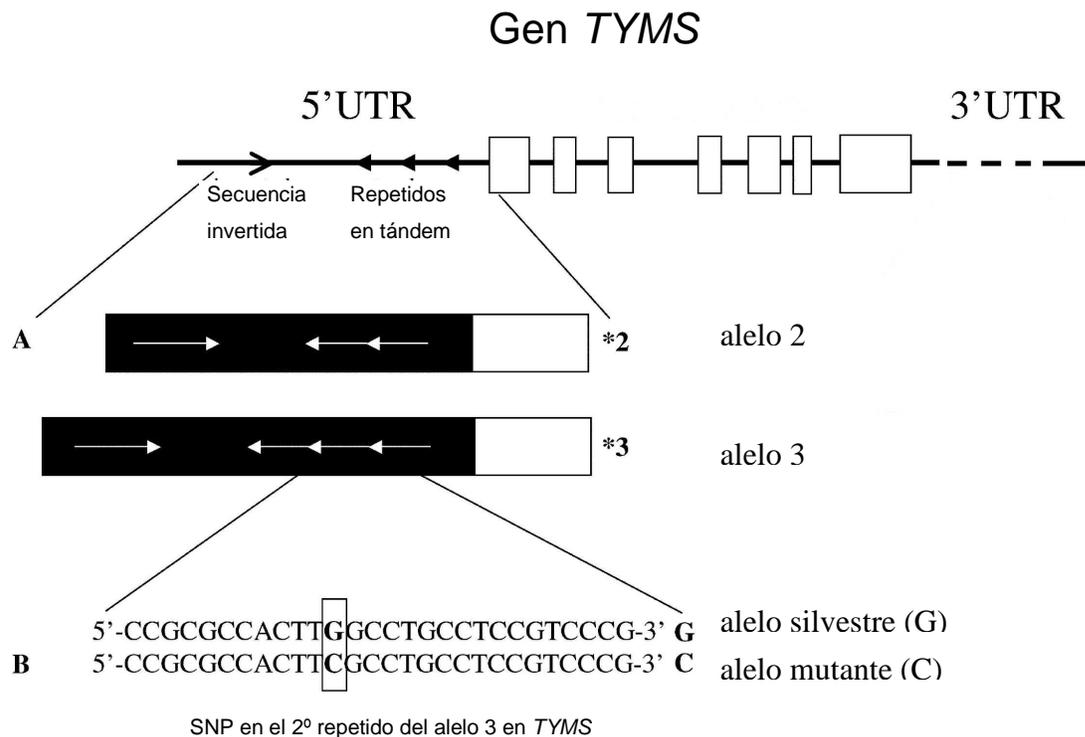
Diversos estudios han demostrado que la TS es blanco intracelular de las fluoropirimidinas como el 5 fluorouracilo (5-FU) y la capecitabina, además de otros nuevos agentes antifolatos en investigación que bloquean la acción de esta enzima (Papamichael, 2000). La TS desempeña un papel muy importante en la terapia contra el cáncer y posiblemente en la prevención de este padecimiento (Ulrich et al., 2000).

Estudios *in vitro* han demostrado que algunas células pueden ser resistentes a los inhibidores y reguladores de la TS debido a que existe una sobre expresión del gen y un aumento intracelular de TS, lo que lleva a pensar que la cantidad de TS presente en células cancerosas o tumores puede ser un factor predictor de la respuesta a la terapia (Marsh, 2005). De hecho, estudios recientes han demostrado que la expresión de los TS varía considerablemente entre tumores y que la sensibilidad de éstos a la quimioterapia con 5-FU está correlacionada con el nivel intratumoral de TS (Bertino, 2003). Las concentraciones intracelulares de TS se relacionan con la sensibilidad de tumores al 5-FU, de manera que se ha descrito un aumento de la respuesta al fármaco en pacientes con bajos valores de actividad de TS en sus tumores cuando se compara con la respuesta observada en pacientes cuyos cánceres sobre-expresan TS (Uchida et al., 2004). Niveles de expresión altos de la TS han sido correlacionados con un pronóstico pobre en el cáncer de mama, gástrico y colorectal (Marsh, 2005).

### 1.3.1 Variantes alélicas del gen de la TS

Los polimorfismos en el gen *TYMS* resultan en una enzima con función alterada. Esto puede afectar la susceptibilidad al cáncer o la eficiencia o toxicidad de agentes terapéuticos contra esta patología (Kawakami et al, 2003).

El gen *TYMS* presenta un polimorfismo en el portenciador ubicado en la región no traducida 5' (5'UTR) del gen, en la mayoría de los casos, es un doble (2R) o triple repetido (3R) de 28 pares de bases en tándem (Marsh, 2005, ver Fig. 7).

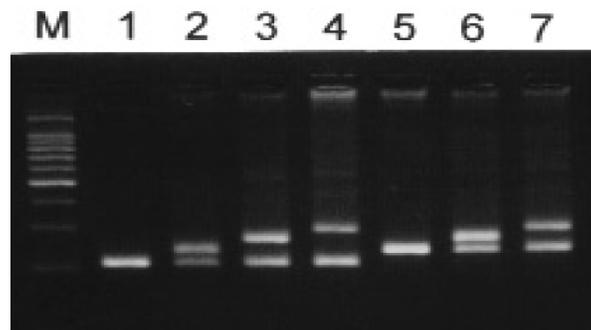


**Fig. 7.** Polimorfismos en el gen de timidilato sintetasa. (A) Repetidos en TS, (B) SNP G→C en el alelo 3 de *TYMS* (Figura modificada de Marsh, 2005).

Estudios *in vitro* han demostrado que el incremento en el número de repetidos (3 o más) provoca un incremento en la expresión del gen *TYMS*, y un

incremento en la actividad de la enzima TS. El mecanismo de acción de esta región aún se ha esclarecido, sin embargo, se sabe que la primer copia del repetido es requerida en la formación de un asa alrededor del sitio de inicio ATG para la traducción del gen, y las copias siguientes de repetidos son necesarias para dar entrada a la transcripción, por lo que un aumento en el número de repetidos en el potenciador se cree aumentará la tasa de transcripción del gen (Marsh, 2005).

La separación de diferentes polimorfismos de *TYMS* se puede hacer mediante electroforesis dado el elevado número de bases en los repetidos que hacen que el tamaño molecular del amplificado a analizar sea notablemente distinto (Mandola et al, 2003, ver Fig. 8).



**Fig. 8.** Polimorfismos de TS. M= Marcador de tamaño molecular; 1= 2R2R; 2= 2R3R; 3= 2R4R; 4= 2R5R; 5= 3R3R; 6= 3R4R; 7= 3R5R (Figura tomada de Hishida et al, 2003).

El alelo *TYMS* de tres repetidos (3R) es más común en asiáticos (80%) que en caucásicos (53-60%) (Uchida et al, 2004, Ulrich et al, 2000). Existen nuevos alelos raros que contienen 4,5, o 9 repetidos que han sido descritos (Volcik et al, 2003; Marsh et al, 2000; Zhai et al, 2006). Estudios *in vitro* han demostrado que el

homocigoto para 3 repetidos muestra hasta 2,6 veces más actividad de TS que para los homocigotos con dos repeticiones (Horie et al, 1995).

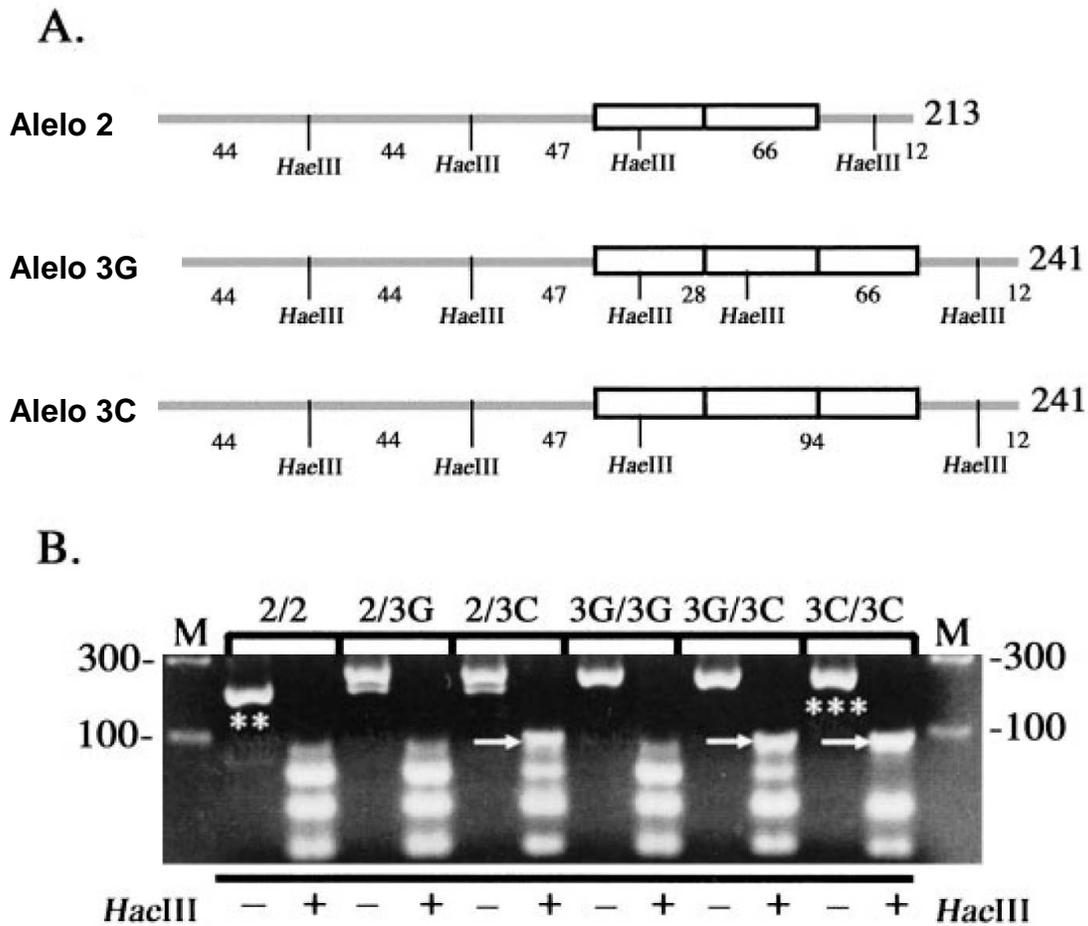
Según el polimorfismo de la TS, los pacientes con cáncer de colon cuyo genotipo sea homocigoto con dos repeticiones serían más sensibles a 5-FU, mientras que los homocigotos para tres repeticiones serían resistentes, debido a que el homocigoto para el alelo 3 presenta una mayor actividad de la enzima TS, lo cual provoca se tenga que ajustar la dosis terapéutica de acuerdo al genotipo (Horie et al, 1995).

Las concentraciones de TS para los pacientes con cáncer colorectal homocigotos para tres repeticiones (3/3) alcanzan cifras 3,6 veces superiores a las de los homocigotos para dos repeticiones (2/2). Esto se traduce en un índice de respuestas a tratamiento farmacológico (con 5-FU) del 9% para los 3/3 frente al 50% para los 2/2; las respuestas para los heterocigotos es de 15% ( $p = 0,04$ ) (Pullarkat et al, 2001).

### **1.3.2 SNP en la variante de tres repetidos en *TYMS***

Recientemente se ha identificado un SNP dentro del tándem de repetidos en *TYMS*. Los datos sugieren que este polimorfismo tiene impacto en el segundo repetido del alelo 3, cambiando una guanina por una citosina, lo que determina la capacidad de fijar y transactivar los complejos del factor estimulador río arriba (USF, por sus siglas en inglés) (Mandola et al, 2003). Las proteínas del USF participan de manera importante en la activación transcripcional de ADN modulando múltiples mecanismos como la fosforilación mediante cinasas como la proteína cinasa tipo A y tipo C, p38, cdk1 y cinasa P13; también intervienen en la

formación de homo o heterodímeros y en la metilación del ADN. Por lo tanto, los factores de transcripción USF son reguladores de la expresión del gen *TYMS* (Corre et al, 2006). El polimorfismo G→C es más frecuente en blancos y chinos que en áfrico-americanos (Mandola et al, 2003).



### 1.3.3 Frecuencia de las variantes de *TYMS* en diversas poblaciones

En la tabla 1 se muestra la frecuencia genotípica y alélica para las variantes descritas anteriormente (repetidos en tándem y SNP G→C en el 2º repetido de la variante 3) en diversas poblaciones.

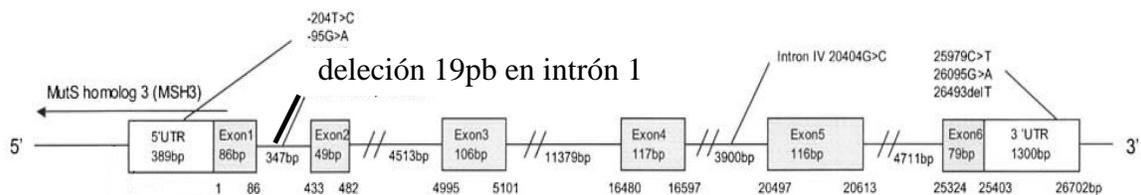
<b>Tabla 1.</b> Distribución de la variante de repetidos en tándem del gen <i>TYMS</i> y el SNP G→C en el 2º repetido de la variante 3.													
Grupo Étnico	N*	Genotipo (%)							Frecuencia del alelo (%)				
		2/2	2/3G	2/3C	3G/3G	3G/3C	3C/3C	Otros	2	3G	3C	Otros	
Blanco	99	19	13	31	11	16	9		41	26	33		
Hispánico	98	17	26	25	10	13	7	2	42	30	26	2	
Áfro- americano	59	29	25	13	19	12	2		48	37	15		
Chino	80	2	19	15	32	18	14		19	51	30		
*n, número total de individuos en la población de muestra.													
El genotipo "otros" corresponde a aquellos repetidos con mayor número de 3.													
Referencia tomada del artículo de Mandola et al, 2003													

Tal y como se puede apreciar en la tabla anterior, existe una distribución genotípica y alélica diferente en cada uno de los grupos étnicos mencionados.



El tetrahidrofolato producto de la reacción de DHFR, es un cofactor esencial en la conversión de desoxiuridilato (dUMP) a desoxitimidilato (dTMP) por la enzima timidilato sintetasa. Por eso, DHFR es una enzima crítica de la correcta síntesis de ADN y ha sido blanco para el desarrollo de drogas y terapia de cáncer (Rod et al, 2003).

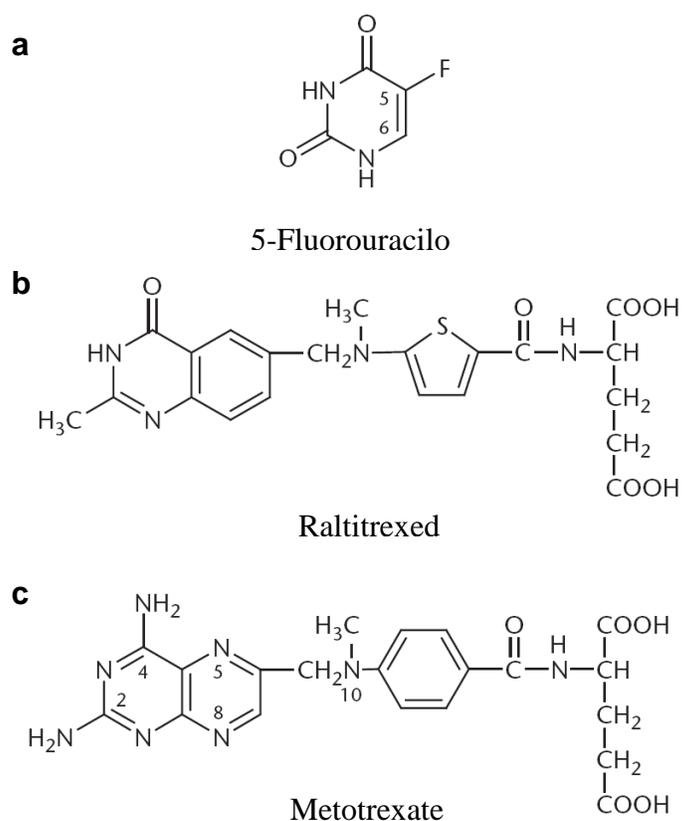
El gen funcional *DHFR* (Fig. 11) se localiza en la región q11.1-q13.3 del cromosoma 5 (Anagnou, 1988). La importancia de la DHFR en la ruta celular de la biosíntesis de purinas, timidina y aminoácidos ha hecho que los estudios hechos a esta enzima sean enfocados al desarrollo de compuestos anticáncer altamente específicos y de agentes antibacterianos.



**Fig. 11.** Estructura del gen *DHFR*. En el esquema se observan las distintas regiones en los que se localizan algunos polimorfismos encontrados en este gen (Figura modificada de Gellekink et al, 2006).

En la literatura se han descrito varios pseudogenes para el gen *DHFR*. Anagnou y colaboradores (1984) identificaron al pseudogen 4 (*DHFRP4*) en el cromosoma 3, mientras que el pseudogen 1 (*DHFRP1*) fue localizado en el cromosoma 1 y el pseudogen 2 (*DHFRP2*) en el cromosoma 6 (Anagnou et al, 1988).

Las células tumorales que se están dividiendo rápidamente requieren acceso a altas concentraciones de timidilato (dTMP) para la síntesis de ADN. La vulnerabilidad de estas células por la inhibición de la síntesis de dTMP ha sido utilizada en quimioterapia de cáncer. Las enzimas TS y DHFR son blancos para la quimioterapia (ver Fig. 12). La síntesis de dTMP puede bloquearse mediante la inhibición de la producción de tetrahidrofolato. Análogos de dihidrofolato, como la aminopterina y metotrexate (ametopterina) son potentes inhibidores competitivos de la DHFR (Papamichael, 2000).

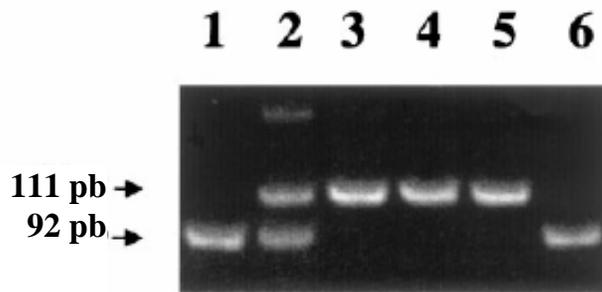


**Fig. 12.** Inhibidores de la síntesis de timidilato. Por poseer una estructura semejante al sustrato de las enzimas, a) y b) son potentes inhibidores de timidilato sintetasa, mientras c) es inhibidor de DHFR (Figura modificada de Kisliuk, 2005).

### 1.4.1 Variantes genéticas en *DHFR*

Pocos estudios se han realizado para identificar variantes alélicas en el gen *DHFR*. En 2006 Gellekink et al, publican un análisis de este gen en donde describen algunas de las variantes más importantes encontradas en la población caucásica holandesa, destacando dos variantes principales: una serie de repetidos en tandem de 9 pb en la región no traducida 5', y una delección de 19 pb (del19pb) en el intrón 1 del gen (Fig. 13).

Esta última variante ha sido descrita en estudios anteriores (Johnson et al, 2004 y 2005), encontrando una frecuencia para la variante alélica mayor al 30%; por tal razón, es motivo de estudio, ya que el intrón 1 ha sido descrito como un sitio útil en regular secuencias para algunos genes, como por ejemplo el gen de la 3 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo I (3 beta-HSDI) y el gen tisular 1 inhibidor de metaloproteinasas (*TIMP-1*). La delección de 19 pb de *DHFR* en el gen humano elimina un sitio de unión al factor de transcripción SP1 y es posible que este polimorfismo actúe disminuyendo la transcripción de *DHFR* y baje la disponibilidad de folatos en los fetos (Johnson et al, 2004).



**Fig. 13.** Gel de acrilamida al 10% en donde se exhibe la variante alélica del19pb de *DHFR*. El alelo 1 (sin delección) corresponde a la banda de 111 pb. El alelo 2 (con la delección) corresponde a la banda de 92 pb. Genotipos: Línea 1: 22; Línea 2: 12; Línea 3: 11; Línea 4: 11; Línea 5: 11; Línea 6: 22 (Modificado de Jonson et al, 2004).

### 1.4.2 Frecuencia de la variante alélica del19pb del gen de la DHFR en diversas poblaciones

Existen pocos estudios en donde se ha genotipificado la variante alélica del19pb del gen *DHFR*. Las frecuencias que se han reportado aparecen en la tabla 2:

<b>Tabla 2.</b> Distribución del polimorfismo de19 pb en <i>DHFR</i> .						
Población	# de individuos analizados	Frecuencia del Genotipo			Frecuencia Alélica	
		1/1	1/2	2/2	1	2
<b>Población estadounidense</b>	n = 219	61 (28%)	120 (55%)	38 (17%)	55.25%	44.75%
<b>Población holandesa</b>	n = 330	114 (34.5%)	150 (45.5%)	66 (20%)	57.27%	42.73%

El genotipo 1/1 corresponde al homocigoto silvestre, 1/2 al heterocigoto, 2/2 es el homocigoto mutante con la delección. El alelo 1 corresponde al alelo silvestre, mientras que el alelo 2 corresponde a la delección.

Población estadounidense: el 88.1% caucásica, 5.9% hispánica, 5.9% asiática (Jonson et al, 2004)

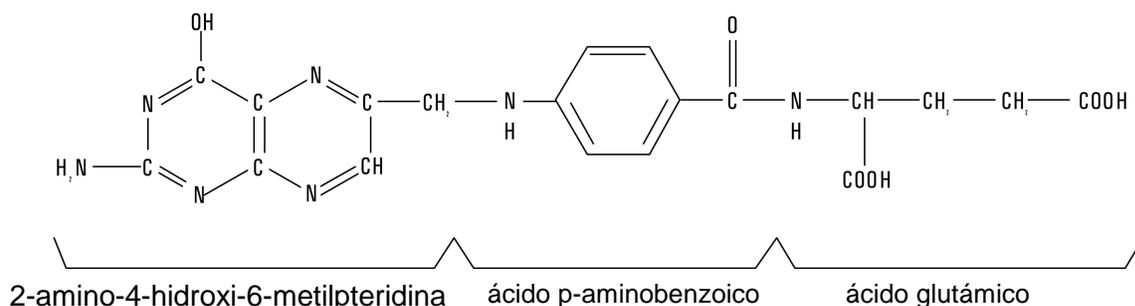
Población holandesa: 100% caucásicos holandeses (Gellekink et al, 2006)

La población holandesa presenta un mayor porcentaje de homocigotos silvestres (1/1) que la población estadounidense, sin embargo, las diferencias entre la distribución de genotipos no son muy altas. La frecuencia alélica para ambas poblaciones es similar. Cabe destacar que hasta la fecha no se ha reportado el estudio de caracterización de esta variante alélica (del19pb) en otros grupos étnicos.

## 1.5 Ácido fólico, vitamina B12 y homocisteína.

El ácido fólico y la vitamina B<sub>12</sub> o cobalamina son vitaminas con una estrecha interrelación metabólica en la síntesis de nucleótidos purínicos y pirimidínicos y en la metilación de la homocisteína (Hcy) para obtener metionina (Tamura y Picciano, 2006).

La estructura química del ácido fólico involucra a la 2-amino-4-hidroxi-6-metilpteridina, el ácido p-aminobenzoico y el ácido glutámico (fig. 14).



**Fig. 14.** Estructura química del ácido fólico (Figura modificada de Tamura y Picciano, 2006).

La forma coenzimática es el ácido tetrahidrofólico (FH<sub>4</sub>), que actúa como transportador intermediario de fragmentos de un átomo de carbono como grupos hidroxilo, formilo, metilo y formimio (Lehninger, 2<sup>a</sup> ed, 1994).

Los folatos metabólicamente activos son poliglutamatos. La glutamilación de éstos permite su acumulación intracelular ya que de manera natural, los folatos no son capaces de atravesar las membranas celulares y facilitar las reacciones intermedias de los sitios catalíticos en complejos multienzimáticos y en enzimas multifuncionales (Tamura y Picciano, 2006).



Una importante función de la vitamina B<sub>12</sub> es la transferencia de fragmentos de un átomo de carbono, como los grupos metilo e hidroxilo. Además participa en el intercambio 1,2 de un átomo de hidrógeno por el grupo funcional X del átomo de carbono adyacente (Lehninger, 2ª ed, 1994).

La mayoría de los folatos en los alimentos están presentes principalmente como poliglutamatos, que son menos absorbidos que los monoglutamatos. El monoglutamato se obtiene mediante la hidrólisis del poliglutamato de la dieta por la folato hidrolasa (dependiente de Zn<sup>2+</sup>), en la superficie del borde ciliado de las células de la mucosa yeyunal (Tamura y Picciano, 2006).

La cobalamina y el folato son necesarios para el metabolismo de la homocisteína, mientras que sólo se requiere cobalamina para el metabolismo del ácido metilmalónico, por lo tanto el ácido metilmalónico y la homocisteína se elevan en la deficiencia de cobalamina, pero sólo la homocisteína se eleva en la deficiencia de ácido fólico. La elevación de los metabolitos séricos por encima de los intervalos de referencia precede a la caída de los niveles de vitamina en el suero, también muestra una relación consistente con deficiencias evidentes de vitamina, pero no con los bajos niveles de vitaminas en sangre (Tamura y Picciano, 2006).

La homocisteína es un aminoácido que se metaboliza a cisteína vía transulfuración a metionina mediante el proceso de remetilación. Las alteraciones en estas rutas metabólicas, de causa genética o nutricional, pueden provocar hiperhomocisteinemia. Algunos estudios epidemiológicos muestran que un incremento mínimo de las concentraciones de homocisteína están asociados con

un riesgo aumentado de sufrir enfermedades cerebrovasculares, cardiovasculares o neurológicas (Tamura y Picciano, 2006).

Un producto de reacción en el metabolismo de la homocisteína es la metionina. La cobalamina y el folato son necesarios para estas reacciones. Uno de los factores que se deben considerar son las alteraciones genéticas presentes en torno a la ruta metabólica de la homocisteína (Brosnan et al, 2004).

### **1.6 Metabolismo de los folatos**

Diversas enzimas y diferentes sustratos participan en el metabolismo de los folatos (Fig. 16), el cual tiene como principales funciones:

- a) Formilación de ribonucleótidos en la síntesis de las purinas.
- b) Metilación del ácido desoxiuridílico a ácido timidílico en la biosíntesis de nucleótidos de pirimidina.
- c) Generación y utilización del formato.
- d) Conversión de aminoácidos.

Serina (Ser) a glicina (Gly) (requiere de piridoxina).

Histidina (His) a glutámico (Glu).

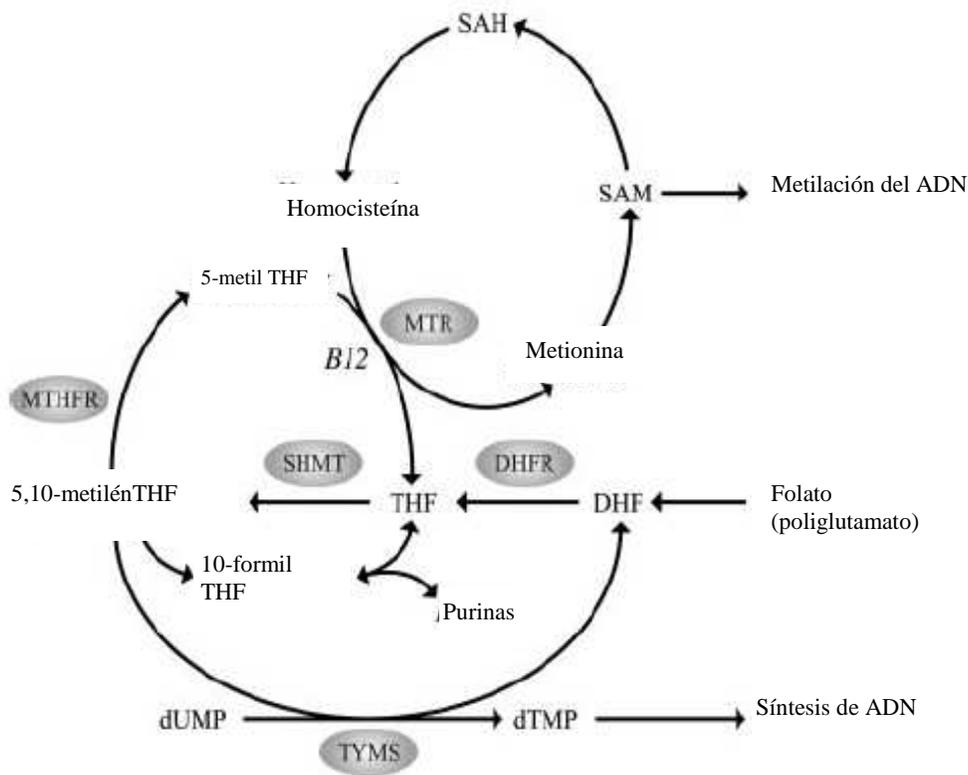
Homocisteína a metionina (Met) (requiere metilcobalamina).

En las células compiten por los folatos disponibles 2 grupos de reacciones: las de biosíntesis de nucleótidos y un gran número de reacciones de metilación que emplean la S-adenosilmetionina y que requieren, por lo tanto, un suministro constante de metionina (Tamura y Picciano, 2006).

Por su implicación en la síntesis de ADN, ARN y el metabolismo de algunos aminoácidos, la deficiencia de ácido fólico en el embarazo, principalmente antes

del cierre del tubo neural, puede ocasionar daños en la formación de la médula espinal y el cerebro conduciendo a la aparición de anencefalia, espina bífida y encefalocele (Gos y Szpecht-Potocka, 2002).

Diferentes estudios han llevado a evidencias epidemiológicas sobre la asociación de los niveles bajos de ingestión y niveles séricos bajos de ácido fólico con estos defectos congénitos, además de que se han relacionado con la aparición de paladar hendido y labio leporino (Eskes, 1994).



**Fig. 16.** Esquema de la ruta metabólica del folato en el humano. SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína; DHF: dihidrofolato; DHFR: Dihidrofolato reductasa; THF: tetrahydrofolato; SHMT: serina hidroximetiltransferasa; 5,10-metilén THF: 5,10-metilén tetrahydrofolato; MTHFR: 5,10-metilén tetrahydrofolato reductasa; 5-metil THF: 5-metiltetrahydrofolato; 10-formil THF: 10-formil tetrahydrofolato; MTR: metionina sintetasa; TYMS: timidilato sintetasa; dTMP: desoxitimidina monofosfato; B12: vitamina B12; dUMP: desoxiuridina monofosfato (Figura modificada de Skibola et al, 2004).

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

La enzima timidilato sintetasa está estrechamente relacionada a la dihidrofolato reductasa ya que ambas enzimas participan de manera directa o indirecta en la síntesis del ADN y en el metabolismo de los folatos. Por ello, la disminución o aumento en la actividad de estas enzimas, puede ocasionar efectos indeseados que alteren el ciclo celular. En el caso de la DHFR se ha observado un aumento de 2 veces en el riesgo para tener hijos con defectos del tubo neural cuando las madres son homocigotas para la variante del 19pb. En tanto, se ha observado un riesgo de presentación de cáncer (principalmente de colon) de 2.6 veces si se es homocigoto para el alelo de tres repetidos en tándem en la región potenciadora del gen *TYMS*.

### 3. JUSTIFICACIÓN:

La biología molecular ha hecho posible la identificación de probables factores de riesgo y marcadores moleculares relacionados a diversas patologías y eventos adversos en el ser humano. Un aspecto que en las últimas décadas ha sido centro de investigación es el metabolismo de los folatos y la homocisteína (Eskes, 1994; Ho, 2000; Goss et al, 2002; Gos y Szpecht-Potocka, 2002; Sassi et al, 2002; Skibola et al, 2004; Trinh et al, 2002; Brown et al, 2004; Gellekink et al, 2006; Tamura y Piciano, 2006); asimismo, se ha descubierto que una misma enzima puede participar en más de una vía metabólica dentro del organismo vivo (Gos y Szpecht-Potocka, 2002; Trinh et al, 2002; Oterino et al, 2005). La enzima timidilato sintetasa está estrechamente relacionada a la dihidrofolato reductasa, ambas enzimas actúan de manera directa o indirecta en el metabolismo de los folatos y en la síntesis del ADN. Algunas alteraciones descubiertas en los genes codificadores para estas enzimas, pueden ser un factor de riesgo para desarrollar defectos del tubo neural en recién nacidos (*DHFR*) o bien la presentación de cáncer (*TYMS*). Debido a que en diversas poblaciones la frecuencia de mutaciones en estos genes es elevada, además que han sido asociadas a un incremento en el riesgo para desarrollar ciertas enfermedades en la población general, este protocolo de investigación es un precedente para la caracterización genética de variantes alélicas *TYMS* y *DHFR* en una muestra de población mestiza mexicana.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

- Determinar la frecuencia de variantes alélicas de *TYMS* y *DHFR* en un grupo de la población mestiza mexicana y establecer su relación con los niveles plasmáticos de Hcy, folato y vitamina B 12 en el grupo en estudio.

### 4.2. Objetivos específicos:

- Realizar el análisis genotípico de los repetidos en tándem, incluido el SNP localizado en la variante de tres repetidos en *TYMS*, en una muestra de población mexicana mestiza.
- Identificar la variante del19pb en *DHFR* en una muestra de población mexicana mestiza
- Relacionar los genotipos de *TYMS* y *DHFR*, con niveles plasmáticos de Hcy, folato y vitamina B 12 en el grupo en estudio.
- Comparar la frecuencia alélica y genotípica para las variantes alélicas en *TYMS* y *DHFR* en la población mexicana mestiza con otras poblaciones previamente reportadas en la literatura.

## 5. HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Si las variantes alélicas: G→C en la variante 3 (*TYMS*), repetidos en tándem (*TYMS*) y del19pb (*DHFR*), se presentan con una elevada frecuencia en la población mexicana mestiza, entonces será posible encontrar diferencias en cuanto a la concentración plasmática de metabolitos como folatos, homocisteína y vitamina B12 tal y como sucede en poblaciones de diferente origen étnico previamente reportadas en la literatura.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

**6.1 Población de Estudio:** mujeres y hombres sanos donadores del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

### *6.1.1 Criterios de selección*

a) inclusión: mujeres y hombres sanos donadores del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” que cuenten con resultados clínicos y de laboratorio para ser aceptados como donadores y se cuente con el consentimiento informado por escrito del donador, nacidos en

México y descendientes de padres y abuelos nacidos en México, por lo que se considera al donador como mestizo.

b) eliminación: cuando no se cuente con el material necesario para realizar todos los estudios programados, y cuando no se cumpla con los criterios de inclusión.

### *6.1.2 Tamaño de la muestra*

300 muestras del Banco de Sangre del INCMNSZ (150 de hombres y 150 de mujeres). Los hombres tuvieron una edad promedio de 34.72 años (18-60 años), mientras que las mujeres tuvieron una de edad promedio de 33.37 años (17-62 años).

## **6.2 Descripción del procedimiento**

Se contó con muestras de ADN congelado en el Laboratorio de Genética correspondientes a donadores del Banco de Sangre del INCMNSZ. Dichas muestras fueron extraídas de sangre de las personas que cumplieron con los criterios de selección, a las cuales se les invitó de forma individual a participar en esta investigación. Se les explicó cuales son los objetivos del estudio, se les dio una carta de información y se les solicitó que firmaran la carta de consentimiento informado. A cada participante se le solicitó una muestra de sangre para determinar niveles plasmáticos de Hcy, folato y vitamina B12. De estas mediciones sólo fue posible obtener valores de homocisteína en 287 individuos (144 hombres y 143 mujeres), mientras que valores de folatos y vitamina B12 sólo se consiguieron de 282 (142 hombres y 140 mujeres) y 281 (142 hombres y 139

mujeres) individuos respectivamente. Del paquete celular se realizó extracción de ADN en 10 casos. Se realizará con el ADN mencionado la genotipificación de las variantes de repetidos en tándem para *TYMS* y el SNP G→C en el 2º repetido de la variante 3, y la deleción de 19 pb para *DHFR*. La amplificación de los fragmentos de ADN nuclear así como el análisis de las mutaciones se hará bajo condiciones previamente reportadas (Tabla 3). La mutación G→C de 3R para TS se investigará por RFLP, mientras que la deleción de 19 pb en *DHFR* y el análisis de repetidos para *TYMS* se realizarán mediante electroforesis en agarosa al 3%.

### **6.3 Variables a medir:**

- a) Principales: Mutaciones G→C en 3R (TS), repetidos en tándem (TS), deleción 19 pb (DHFR) , niveles de Hcy, niveles de ácido fólico, niveles de VB12 (previamente medidos: Gueant-Rodriguez et al, 2006)

### **6.4 Métodos de análisis de laboratorio**

#### **6.4.1 Extracción de ADN**

La extracción de ADN de sangre se realizó en 10 muestras mediante la siguiente metodología:

El paquete globular (obtenido después de la separación del plasma mediante centrifugación) se resuspende en tris-tritón-sacarosa (TTS) y luego se reparte en tubos para microcentrífuga (1 ml por tubo) para ser centrifugado a 14 000 rpm durante 3 min. Se desecha el sobrenadante cuidadosamente, el botón se lava con 1 ml de TTS y se centrifuga a 14 000 rpm durante 3 min. Se realizan 4 lavados más, el botón tiene que ser blanco o transparente y contiene los leucocitos para la

extracción. Una vez decantado el sobrenadante del último lavado, el botón se resuspende en 570  $\mu\text{l}$  de NaCl 5 mM. Posteriormente se adicionan 30  $\mu\text{l}$  de SDS al 10%, la mezcla se homogeniza manualmente por 5 min o 30 seg en el vórtex. A continuación se adicionan 200  $\mu\text{l}$  de NaCl saturado, se agita manualmente por 5 min o en el vórtex por 30 seg y se centrifuga a 14 000 rpm durante 10 min. Se recolecta el sobrenadante el cual se lava con 500  $\mu\text{l}$  de Cloroformo-Alcohol isoamílico 49:1. Se agita vigorosamente y nuevamente se centrifuga a 14 000 rpm durante 10 min. La fase superior se transfiere a un frasco que contiene 1600  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto frío para precipitar el ADN. Se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$  2h. El botón de ADN se lava con 300  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% y se centrifuga a 14 000 rpm durante 10 min. El etanol se decanta y el ADN se deja secar en el Speed Vac o a temperatura ambiente. Una vez seco el ADN se resuspende en 50  $\mu\text{l}$  de agua estéril.

#### **6.4.2 Cuantificación de ADN**

La cuantificación se realiza por densitometría en un espectrofotómetro a una longitud de onda de  $\lambda = 260$  nm para ácidos nucleicos y 280 nm para proteínas, el factor de las lecturas a 260/280 nm  $\geq 1.8$  corresponde a un ADN libre de proteínas. Cada determinación se realiza contra un blanco de agua estéril.

Esta cuantificación será útil, ya que una vez determinada la cantidad de ADN presente en la muestra de Banco de Sangre se procederá a tomar una alícuota de ella suficiente para realizar una dilución a 100  $\mu\text{l}$  de volumen final que cuente con una concentración de 100ng/ $\mu\text{l}$ .

### 6.4.3 Genotipificación de las variantes alélicas de *TYMS* y *DHFR*.

La detección de las variantes alélicas: G→C en el 2º repetido de la variante 3 en *TYMS*, repetidos en tándem de *TYMS*, del19pb para *DHFR* se realizarán de acuerdo con las condiciones de amplificación y de análisis que se encuentran descritas en la tabla 3, y que serán detalladas más adelante.

**Tabla 3.** Condiciones de amplificación para las variantes alélicas en genes de las enzimas a estudiar.

MUTACIÓN	INICIADORES	CONDICIONES DE AMPLIFICACION	TÉCNICA DE ANALISIS
<i>TYMS</i> repetidos <sup>1</sup>	5'-GTG GCT CCT GCG TTT CCC CC-3' 5'-GCT CCG AGC CGG CCA CAG GCA TGG CGC GG-3'	35 x (94°C 1 m, 62°C 1 m, 72°C 1 m)	Electroforesis en gel de agarosa.
<i>TYMS</i> repetidos G→C <sup>2</sup>	5'-GCA AAG GCC ATC GCA GAA GAC A-3' 5'-CAC TTC CCA ACC AAA ATT CTT CAA-3'	35 x (94°C 1 m, 62°C 1 m, 72°C 1 m)	RFLP con la enzima Hae III
<i>DHFR</i> del19bp <sup>3</sup>	F1- 5'-CCA CGG TCG GGG TAC CTG GG-3' F2- 5'-ACG GTC GGG GTG GCC GAC TC-3' R- 5'-AAA AGG GGA ATC CAG TCG G-3'	35 x (94°C 45 s, 61°C 45 s, 72°C 45s)	Electroforesis en gel de agarosa.

#### 6.4.3.1 PCR y electroforesis

La identificación de los diversos polimorfismos de *TYMS* puede realizarse de diversas maneras, una técnica frecuentemente empleada es la amplificación del repetido en tándem, la cual se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y la determinación del genotipo se realiza mediante una electroforesis en gel de agarosa al 3%

Las condiciones para la PCR empleada en la detección de repetidos en tándem en la región portenciadora gen *TYMS* son ADN genómico (50-100ng) en una mezcla de reacción con un volumen final de 25µl con 0.15mM de los dNTP, 12.5 pM de cada oligonucleótido [sentido (5'-GTG GCT CCT GCG TTT CCC CC-

<sup>1</sup> Mandola et al, 2003

<sup>2</sup> Mandola et al, 2003

<sup>3</sup> Johnson et al, 2004

3') y antisentido (5'-GCT CCG AGC CGG CCA CAG GCA TGG CGC GG-3')], 2.5µl de DMSO, 1 unidad de enzima Taq polimerasa, además de una concentración final de 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>. Las condiciones de amplificación son: 5 minutos de desnaturalización a 95°C. Treinta y cinco ciclos consistentes en tres temperaturas: 95°C por 1 minuto; 62°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto cada uno. Al finalizar estos ciclos la extensión final se realiza a 72°C por 5 minutos.

Los amplificadores de la PCR son visualizados en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio. Los homocigotos para 2 repetidos (2/2) producen sólo una banda de 210 pb. Los heterocigotos (2/3) cuentan con fragmentos de 210 y 238 pb, y los homocigotos para 3 repetidos (3/3) producen dos fragmentos de 238 pb visualizados como una sola banda.

La delección de 19 pb en *DHFR* se detecta mediante la realización de una PCR alelo específico. Las condiciones son: ADN genómico (50-100ng) empleado en una mezcla de reacción de 25µl con 0.15mM de los dNTP, 12.5 pM de cada oligonucleótido [sentido 1: 5'-CCA CGG TCG GGG TAC CTG GG-3', sentido 2: 5'-ACG GTC GGG GTG GCC GAC TC-3 y antisentido: 5'-AAA AGG GGA ATC CAG TCG G-3'], 2.5µl de DMSO, 1 unidad de enzima Taq polimerasa, además de una concentración final de 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>. Las condiciones de amplificación son: 5 minutos de desnaturalización a 95°C. Treinta y cinco ciclos de tres temperaturas: a) 95°C por 1 minuto; b) 61°C por 1 minuto y c) 72°C por 1 minuto. La extensión final se realiza a 72°C por 5 minutos.

Los amplificadores de la PCR son visualizados en un gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio.

#### **6.4.3.2 Identificación del SNP G→C**

La genotipificación del SNP se realiza con un análisis por RFLP, en donde se utilizan 15µl del amplificado para 2 y 3 repetidos para ser digeridos con la enzima de restricción *Hae III* en un volumen final de 20 µl. El alelo G de la variante 3 (3G) produce bandas de 12, 28, 44, 47, 66 pb. La variante C (3C) produce bandas de 12, 44, 47 y 94 pb, ésta última la que caracteriza a la variante 3C. La variante de 2 repetidos produce bandas de 12, 44, 47 y 66 pb.

#### **6.4.4 Análisis estadístico**

1. Análisis univariado: Se determinarán las frecuencias alélicas y genotípicas para las mutaciones de los genes *TYMS* y *DHFR*.

Se realizará la determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg a través de la prueba de Chi cuadrada *goodness-of-fit test*.

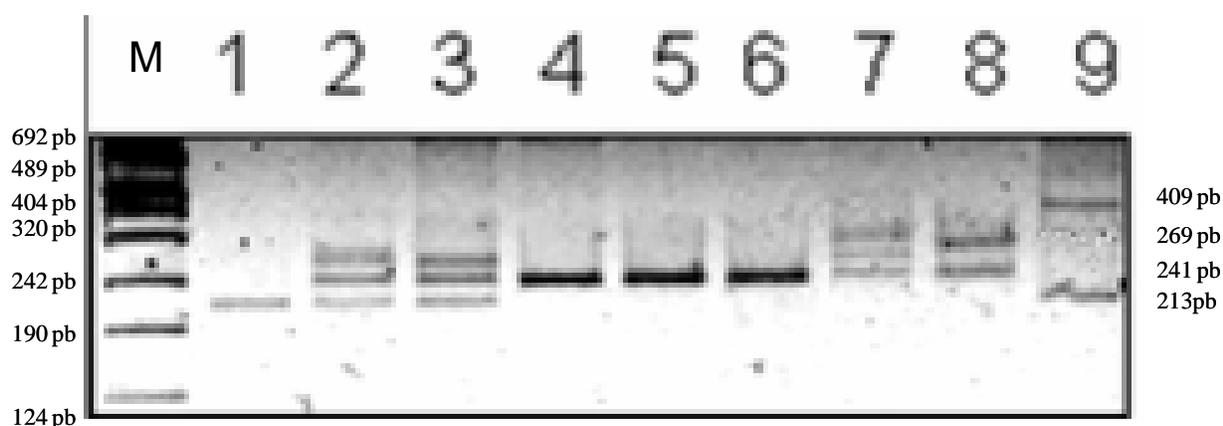
2. Análisis bivariado: Se compararon los niveles de homocisteína, folatos y vitamina B12 de acuerdo al genotipo específico para *DHFR* o *TYMS* y el sexo a través de una prueba t de student.

3. Se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas en este estudio para las variantes analizadas con las reportadas en la literatura a través de una prueba de Chi cuadrada.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Timidilato sintetasa

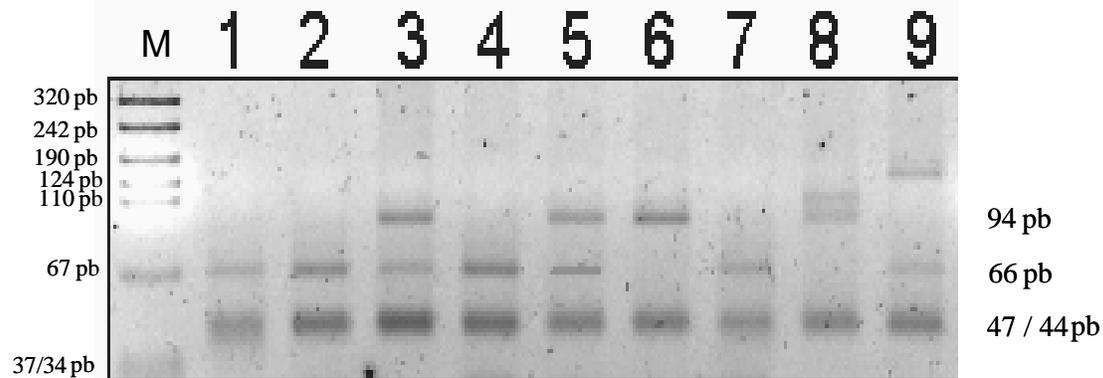
Se realizó la caracterización de la variante genética en *TYMS* consistente en la cuantificación de repetidos de 28pb en tándem. La amplificación y caracterización genética se realizó en 300 muestras correspondientes a 150 hombres y 150 mujeres donadores del Banco de Sangre del INCMNSZ. En la Fig. 17 se observa un ejemplo de las diferentes variantes alélicas para *TYMS* caracterizadas en este estudio. Los productos de PCR en un gel de agarosa al 3% se observaron de la siguiente manera:



**Fig. 17.** Variantes alélicas de *TYMS* (repetidos en tándem). La banda que aparece en 213 pb corresponde al alelo de 2 repetidos (R), la banda de 241 pb corresponde a 3R, 269 pb ilustra 4 R, mientras que 409 pb corresponden a 9R. 1 = 2/2; 2 = 2/3; 3 = 2/3; 4 = 3/3; 5 = 3/3; 6 = 3/3; 7 = 3/4; 8 = 3/4; 9 = 2/9. (M= Escalera de tamaño molecular [pb])

Tal como se describe en la sección de métodos, se realizó la genotipificación del SNP consistente en un cambio G→C en el segundo repetido de la variante 3 de *TYMS*. La caracterización se realizó mediante la observación del producto de digestión en un gel de agarosa al 3%, La Fig. 18 ejemplifica la

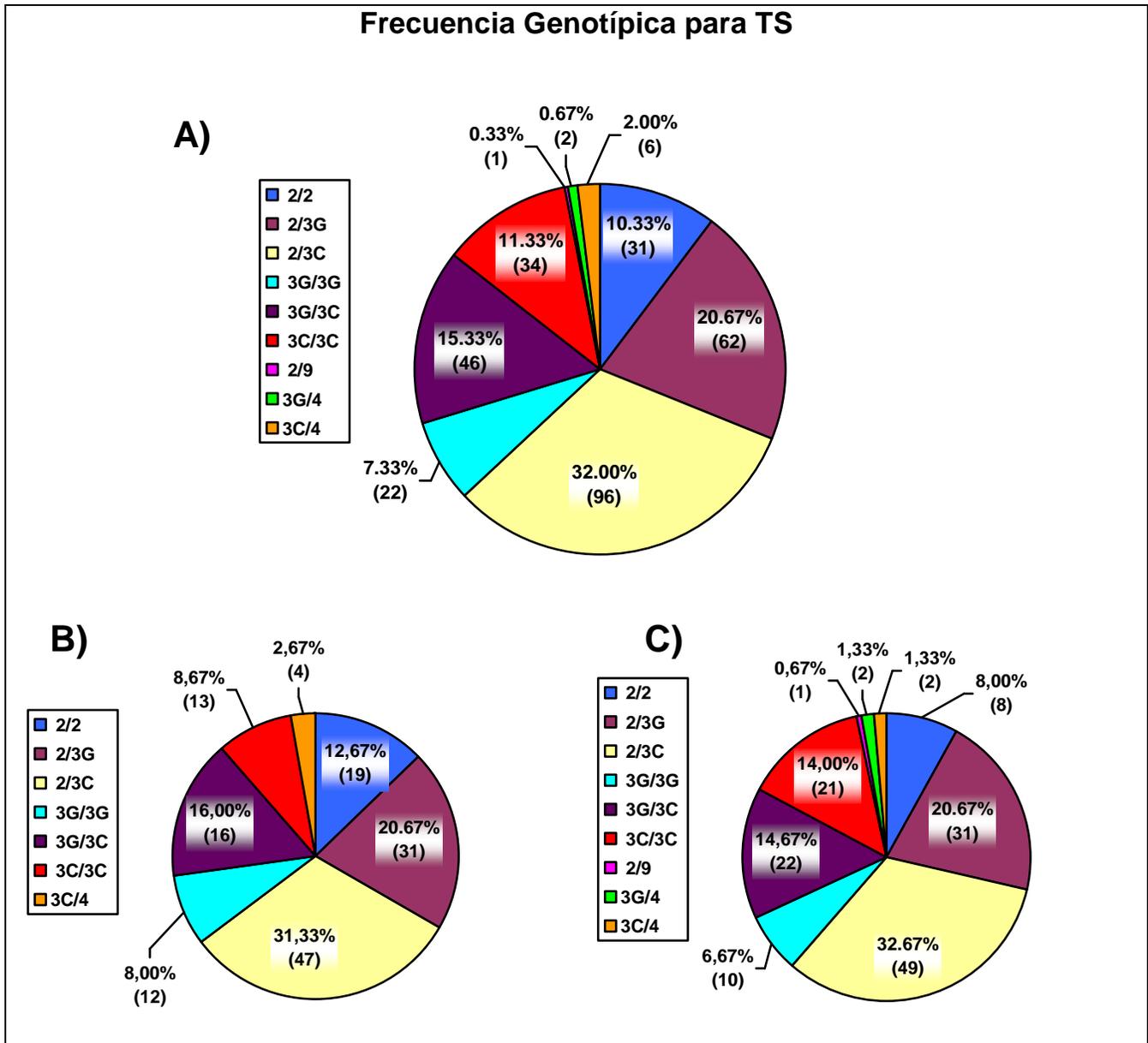
digestión con la enzima *Hae III* de los productos de PCR previamente mostrados en la Fig. 17:



**Fig. 18.** SNP en el 2º repetido de la variante 3 de *TYMS*. La banda de 94 pb es característica del alelo C (con cambio de base). La banda de 66 pb corresponde a un alelo silvestre, mientras que las bandas de 47 y 44 pb corresponden a los dos alelos. En esta figura se muestran los genotipos: 1 = 2/2; 2 = 2/3G; 3 = 2/3C; 4 = 3G/3G; 5 = 3G/3C; 6 = 3C/3C; 7 = 3G/4; 8 = 3C/4; 9 = 2/9. (M= Escalera de tamaño molecular [pb])

### 7.1.1 Frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes de repetidos de 28 pb y el SNP G→C en la variante de tres repetidos

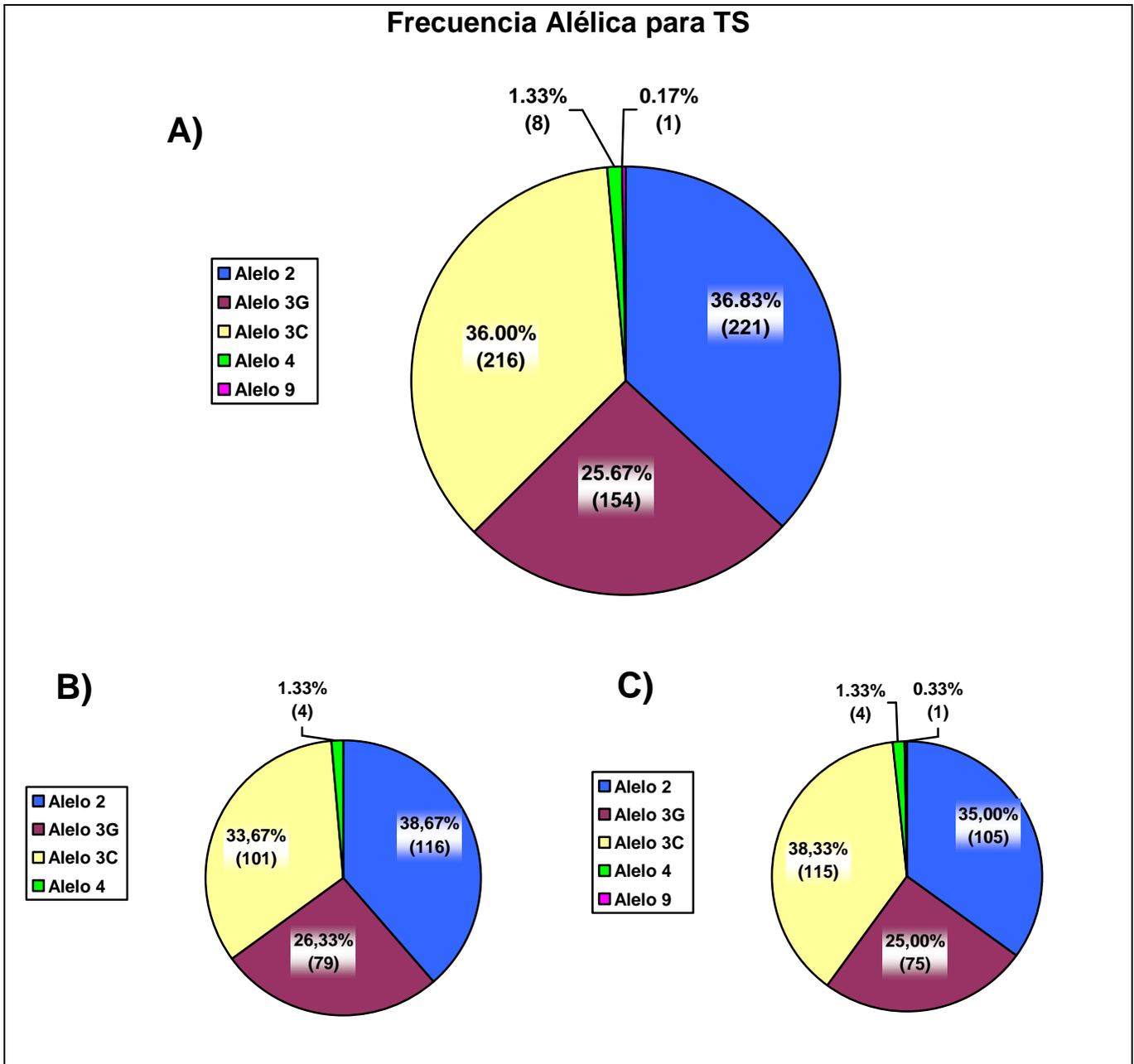
Se calculó la frecuencia de acuerdo al genotipo en el total de las muestras utilizadas y se determinó la frecuencia genotípica por sexo la frecuencia genotípica por sexo. En la figura 19 se puede observar que las variantes para tres repetidos (G o C) representan en conjunto más del 20% en la muestra analizada. El genotipo 2/3C es el más frecuente (32%). La distribución de los genotipos en hombres y mujeres es similar. A diferencia de las mujeres, en los hombres se encontraron variantes “raras” tales como 2/9 y 3G/4 (1 y 2 individuos respectivamente).



**Fig. 19.** Distribución de los genotipos para *TYMS*. **A)** Distribución en el total de las muestras. **B)** Distribución de los genotipos en mujeres. **C)** Frecuencia genotípica en hombres.

El genotipo con mayor prevalencia es el 2/3C.

Se determinó la frecuencia alélica en *TYMS* para el polimorfismo de los repetidos de 28pb, así como para el SNP en el tercer repetido en el total de las muestras y separadas por sexo (Fig. 20).



**Fig. 20.** Frecuencia alélica para *TYMS*. **A)** Distribución de los alelos en el total de las muestras. **B)** Distribución de las variantes alélicas en mujeres. **C)** Frecuencia alélica en hombres.

El alelo con tres repetidos es muy frecuente en la población mexicana (más del 50%). Existen dos variantes para este alelo (G y C). El alelo 3C es el más frecuente entre las dos posibles variantes en el segundo repetido de la variante 3.

### 7.1.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Se analizó si los resultados obtenidos para este genotipo se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg según la prueba de Chi cuadrada *goodness-of-fit test* (para ver los cálculos realizados, observar el Anexo I).

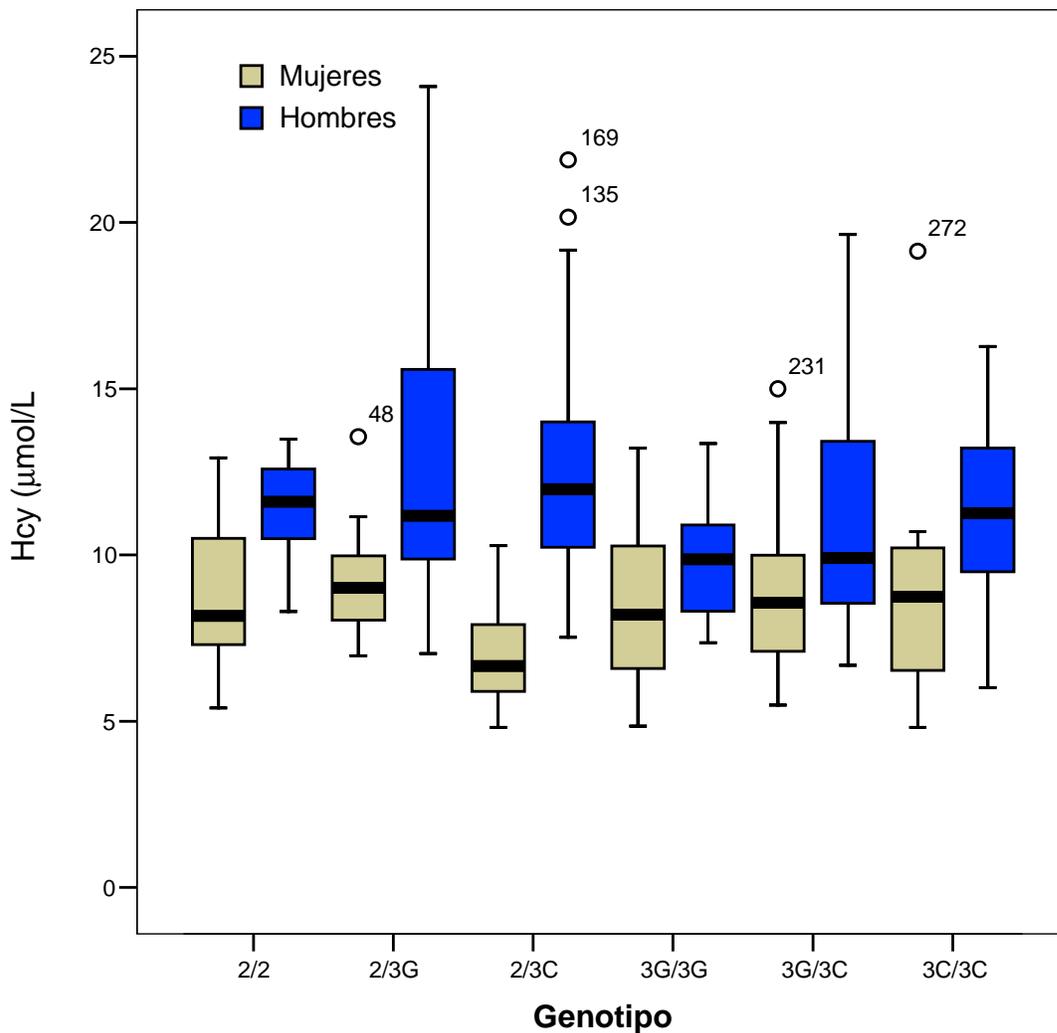
<b>Tabla 4.</b> Prueba de $\chi^2$ en los individuos analizados para repetidos en <i>TYMS</i> y SNP G→C en el tercer repetido.			
Muestra	N	$\chi^2$	p
Total	300	13.42	<b>&lt;0.005</b>
Mujeres	150	5.65	>0.05
Hombres	150	9.38	<b>&lt;0.025</b>

Se observa que la población estudiada no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, esta falta de equilibrio se debe principalmente a que los hombres de este estudio no se encuentran en equilibrio debido a que se encontró un número menor a lo esperado de homocigotos para dos repetidos (2/2), y un número mayor de heterocigotos 2/3C.

### 7.1.3 Niveles de homocisteína, folatos y vitamina B12 con respecto al genotipo y al sexo.

Se analizó por sexo, genotipo y alelo mediante una prueba t de student si existía alguna correlación entre el genotipo caracterizado y los niveles séricos de homocisteína, folatos y vitamina B12 (determinados en Gueant-Rodriguez et al, 2006) (las tablas correspondientes a los metabolitos se encuentran localizadas en el Anexo II).

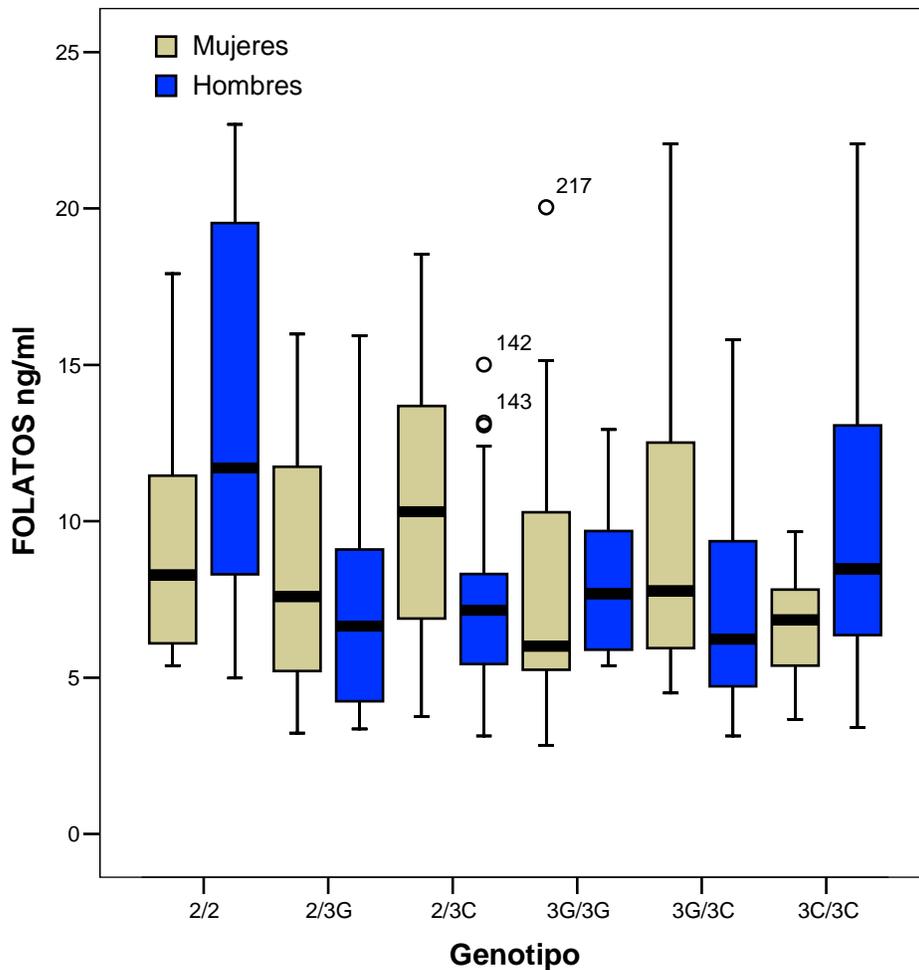
Para homocisteína sólo fue posible contar con el valor de los niveles séricos de este metabolito en 241 de los 300 casos caracterizados (117 mujeres y 124 hombres) debido a que no se registraron lecturas. Los resultados se muestran en la Fig. 21.



**Fig. 21.** Distribución de homocisteína en hombres y mujeres de acuerdo al genotipo para *TYMS*. Debido al limitado número de casos, los genotipos 2/9, 3G/4 y 3C/4 fueron excluidos. Se observa que los hombres independientemente del genotipo registran niveles más altos de Hcy que las mujeres, las diferencias son significativas.

En la Fig. 21 no se puede observar una correlación entre los niveles de Hcy y el genotipo para *TYMS*.

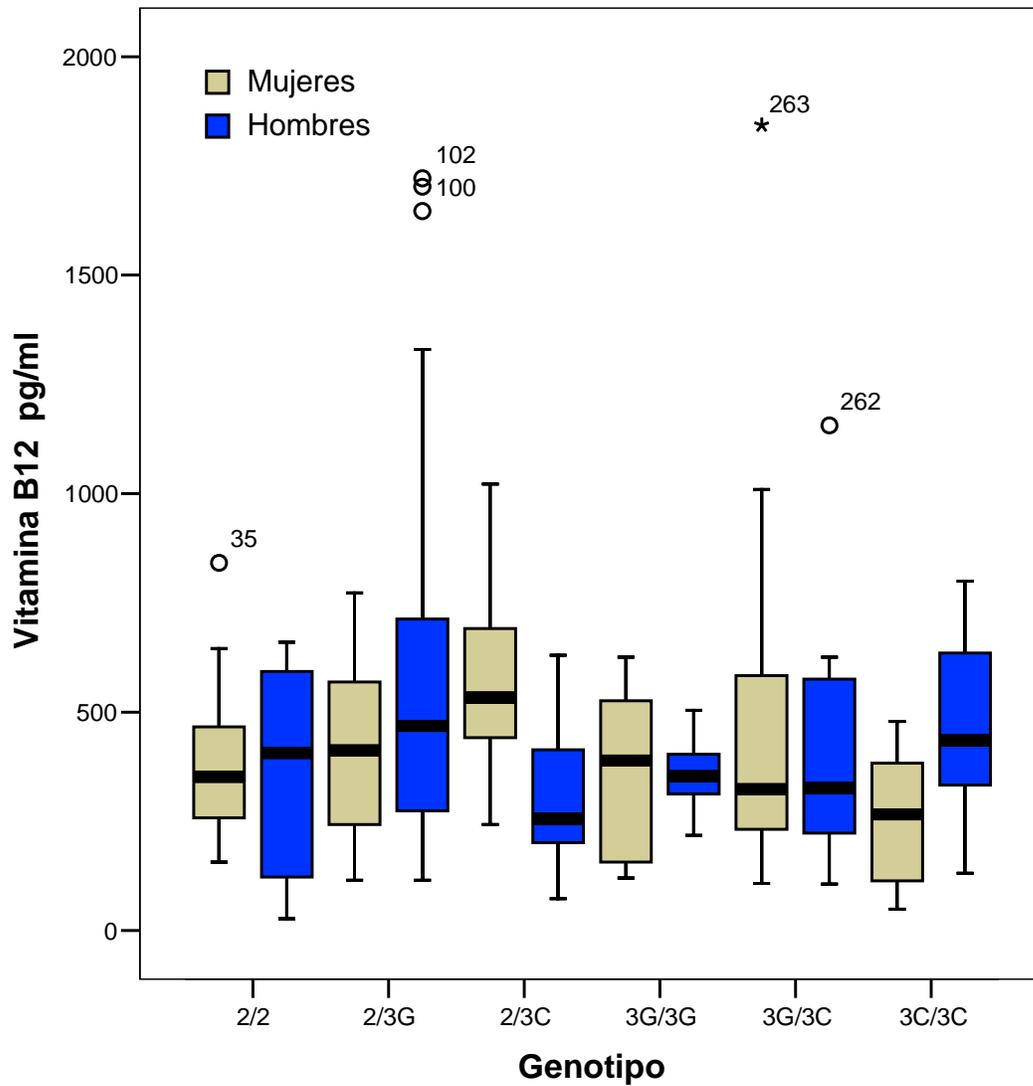
Se contó con 236 casos (114 mujeres y 122 hombres) que tenían valores de folatos, obteniendo la gráfica mostrada en la Fig. 22:



**Fig. 22.** Distribución de folatos en hombres y mujeres de acuerdo al genotipo para *TYMS*. No existen diferencias entre los niveles de folatos de hombres y mujeres, así como tampoco se puede establecer una correlación entre los niveles de folatos y el genotipo para *TYMS*.

Los niveles de folatos en hombres y mujeres de acuerdo al genotipo para *TYMS* son similares, no se puede realizar una correlación entre genotipo y niveles de folatos.

En el caso de la vitamina B12 se contó con valores de 236 casos (114 mujeres y 122 hombres) mostrando los resultados de la gráfica de la Fig. 23:



**Fig. 23.** Distribución de vitamina B12 en hombres y mujeres de acuerdo al genotipo para *TYMS*. No existen diferencias entre los niveles de vitamina B12 de hombres y mujeres, así como tampoco se puede establecer una correlación entre los niveles de vitamina B12 y el genotipo para *TYMS*.

No existe una correlación entre las variantes genéticas para *TYMS* y los niveles de vitamina B12, así como tampoco existen diferencias significativas en los niveles de este metabolito y el sexo.

En el anexo III se muestran los niveles de metabolitos (Hcy, Folatos y Vit B12) para cada sexo y genotipo. Se puede observar que existe una gran dispersión de datos, es decir, las varianzas entre los valores de metabolitos para un mismo genotipo son muy altas, por lo cual se decidió transformar logarítmicamente los valores de cada uno de los metabolitos, obteniendo una muestra más homogénea (Anexo III).

Una vez realizada esta transformación y como trabajo complementario a esta investigación se realizó una prueba t de student para comparar los niveles de metabolitos.

En este caso se comparó el logaritmo de estos metabolitos con la finalidad de homogenizar varianzas. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

<b>Tabla 5. Prueba de t para comparar niveles de metabolitos entre sexos</b>				
Metabolito	Grupos a comparar	N	t	p
Log Hcy	Mujeres	121	-9.81	<b>2.1537E-19</b>
	Hombres	129		
Log Folatos	Mujeres	118	1.82	0.0699
	Hombres	127		
Log vitB12	Mujeres	118	1.21	0.2264
	Hombres	127		

Se observan diferencias significativas en los niveles de Hcy entre mujeres y hombres, siendo éstos últimos los que cuentan con una mayor lectura promedio (8.51 y 11.98  $\mu\text{mol/L}$  respectivamente).

Al ser significativamente diferentes los valores de Hcy entre mujeres y hombres, las comparaciones entre genotipos se realizaron separando por sexo (Tablas 6-11).

**Tabla 6.** Prueba de t para comparar niveles de Hcy (log Hcy) en mujeres de acuerdo al genotipo

Genotipos a comparar	N	t	p	Genotipos a comparar	N	t	p
2/2	16	-0.91	0.3711	2/2+2/3G	39	0.95	0.3486
2/3G	23			3G/3G	10		
2/2	16	3.41	<b>0.0013</b>	2/2+2/3G	39	0.20	0.8397
2/3C	34			3G/3C	23		
2/2	16	0.37	0.7141	2/2+2/3G	39	0.38	0.7129
3G/3G	10			3C/3C	11		
2/2	16	-0.28	0.7819	2/2+2/3C	50	-3.85	<b>0.0003</b>
3G/3C	23			2/3G	23		
2/2	16	0.08	0.9379	2/2+2/3C	50	-1.30	0.1997
3C/3C	11			3G/3G	10		
2/3G	23	5.60	<b>0.000001</b>	2/2+2/3C	50	-2.83	<b>0.0060</b>
2/3C	34			3G/3C	23		
2/3G	23	0.98	0.3457	2/2+2/3C	50	-1.60	0.1139
3G/3G	10			3C/3C	11		
2/3G	23	0.57	0.5740	2/3G+3G/3G	33	0.43	0.6715
3G/3C	23			2/2	16		
2/3G	23	0.58	0.5722	2/3G+3G/3G	33	4.97	<b>0.000001</b>
3C/3C	11			2/3C	34		
2/3C	34	-2.26	<b>0.0293</b>	2/3G+3G/3G	33	0.10	0.9224
3G/3G	10			3G/3C	23		
2/3C	34	-4.04	<b>0.0002</b>	2/3G+3G/3G	33	0.42	0.6743
3G/3C	23			3C/3C	11		
2/3C	34	-1.80	0.0966	2/3C+3C/3C	45	-2.25	<b>0.0283</b>
3C/3C	11			2/2	16		
3G/3G	10	-0.61	0.5450	2/3C+3C/3C	45	-3.79	<b>0.0003</b>
3G/3C	23			2/3G	23		
3G/3G	10	-0.20	0.8400	2/3C+3C/3C	45	-1.37	0.1751
3C/3C	11			3G/3G	10		
3G/3C	23	0.29	0.7704	2/3C+3C/3C	45	-2.87	<b>0.0056</b>
3C/3C	11			3G/3C	23		
2/2+2/3G	39	5.48	<b>0.000001</b>				
2/3C	34						

**Tabla 7.** Prueba de t para comparar niveles de folatos (log Folatos) en mujeres de acuerdo al genotipo

Genotipos a comparar	N	t	p	Genotipos a comparar	N	t	p
2/2	16	1.05	0.2998	2/2+2/3G	38	0.45	0.6580
2/3G	22			3G/3G	9		
2/2	16	-0.63	0.5303	2/2+2/3G	38	-0.59	0.5596
2/3C	34			3G/3C	23		
2/2	16	0.83	0.4145	2/2+2/3G	38	1.36	0.1819
3G/3G	9			3C/3C	10		
2/2	16	0.14	0.8898	2/2+2/3C	50	1.87	0.0660
3G/3C	23			2/3G	22		
2/2	16	2.03	0.0531	2/2+2/3C	50	1.36	0.1778
3C/3C	10			3G/3G	9		
2/3G	22	-1.90	0.0624	2/2+2/3C	50	0.69	0.4941
2/3C	34			3G/3C	23		
2/3G	22	0.07	0.9428	2/2+2/3C	50	3.28	<b>0.0041</b>
3G/3G	9			3C/3C	10		
2/3G	22	-0.97	0.3388	2/3G+3G/3G	31	-1.08	0.2879
3G/3C	23			2/2	16		
2/3G	22	1.02	0.3174	2/3G+3G/3G	31	-2.03	<b>0.0463</b>
3C/3C	10			2/3C	34		
2/3C	34	1.40	0.1696	2/3G+3G/3G	31	-1.03	0.3082
3G/3G	9			3G/3C	23		
2/3C	34	0.84	0.4037	2/3G+3G/3G	31	1.04	0.3066
3G/3C	23			3C/3C	10		
2/3C	34	2.56	<b>0.0142</b>	2/3C+3C/3C	44	-0.03	0.9751
3C/3C	10			2/2	16		
3G/3G	9	-0.75	0.4582	2/3C+3C/3C	44	1.29	0.2016
3G/3C	23			2/3G	22		
3G/3G	9	0.54	0.6021	2/3C+3C/3C	44	0.97	0.3366
3C/3C	10			3G/3G	9		
3G/3C	23	2.11	<b>0.0445</b>	2/3C+3C/3C	44	0.14	0.8894
3C/3C	10			3G/3C	23		
2/2+2/3G	38	-1.64	0.1063				
2/3C	34						

**Tabla 8.** Prueba de t para comparar niveles de Vitamina B12 (log VitB12) en mujeres de acuerdo al genotipo

Genotipos a comparar	N	t	p	Genotipos a comparar	N	t	p
2/2	16	-0.25	0.8038	2/2+2/3G	38	0.72	0.4725
2/3G	22			3G/3G	9		
2/2	16	-3.60	<b>0.0008</b>	2/2+2/3G	38	-0.08	0.9332
2/3C	34			3G/3C	23		
2/2	16	0.53	0.5980	2/2+2/3G	38	2.52	<b>0.0153</b>
3G/3G	9			3C/3C	10		
2/2	16	-0.18	0.8545	2/2+2/3C	50	2.06	<b>0.0429</b>
3G/3C	23			2/3G	22		
2/2	16	2.01	0.0561	2/2+2/3C	50	1.82	0.1009
3C/3C	10			3G/3G	9		
2/3G	22	-2.94	<b>0.0059</b>	2/2+2/3C	50	1.58	0.1256
2/3C	34			3G/3C	23		
2/3G	22	0.71	0.4856	2/2+2/3C	50	3.06	0.0118
3G/3G	9			3C/3C	10		
2/3G	22	0.02	0.9810	2/3G+3G/3G	31	-0.03	0.9774
3G/3C	23			2/2	16		
2/3G	22	2.21	<b>0.0346</b>	2/3G+3G/3G	31	-3.62	<b>0.0007</b>
3C/3C	10			2/3C	34		
2/3C	34	2.43	<b>0.0371</b>	2/3G+3G/3G	31	-0.24	0.8103
3G/3G	9			3G/3C	23		
2/3C	34	2.43	<b>0.0214</b>	2/3G+3G/3G	31	2.11	<b>0.0411</b>
3G/3C	23			3C/3C	10		
2/3C	34	3.60	<b>0.0047</b>	2/3C+3C/3C	44	1.31	0.1946
3C/3C	10			2/2	16		
3G/3G	9	-0.57	0.5727	2/3C+3C/3C	44	1.16	0.2504
3G/3C	23			2/3G	22		
3G/3G	9	1.10	0.2849	2/3C+3C/3C	44	1.50	0.1393
3C/3C	10			3G/3G	9		
3G/3C	23	1.88	0.0694	2/3C+3C/3C	44	1.10	0.2754
3C/3C	10			3G/3C	23		
2/2+2/3G	38	-3.95	<b>0.0002</b>				
2/3C	34						

<b>Tabla 9.</b> Prueba de t para comparar niveles de Hcy (log Hcy) en hombres de acuerdo al genotipo							
Genotipos a comparar				Genotipos a comparar			
	N	t	p		N	t	p
2/2	8	-0.86	0.3992	2/2+2/3G	38	1.98	0.0543
2/3G	30			3G/3G	9		
2/2	8	-0.93	0.3562	2/2+2/3G	38	1.23	0.2251
2/3C	38			3G/3C	20		
2/2	8	1.75	0.1012	2/2+2/3G	38	0.90	0.3735
3G/3G	9			3C/3C	19		
2/2	8	0.55	0.5897	2/2+2/3C	46	0.00	0.9962
3G/3C	20			2/3G	30		
2/2	8	0.18	0.8552	2/2+2/3C	46	2.72	<b>0.0088</b>
3C/3C	19			3G/3G	9		
2/3G	30	-0.20	0.8447	2/2+2/3C	46	1.73	0.0887
2/3C	38			3G/3C	20		
2/3G	30	1.92	0.0626	2/2+2/3C	46	1.33	0.1891
3G/3G	9			3C/3C	19		
2/3G	30	1.27	0.2102	2/3G+3G/3G	39	0.23	0.8166
3G/3C	20			2/2	8		
2/3G	30	0.97	0.3360	2/3G+3G/3G	39	-1.02	0.3101
3C/3C	19			2/3C	38		
2/3C	38	2.73	<b>0.0090</b>	2/3G+3G/3G	39	0.74	0.4603
3G/3G	9			3G/3C	20		
2/3C	38	1.82	0.0748	2/3G+3G/3G	39	0.43	0.6706
3G/3C	20			3C/3C	19		
2/3C	38	1.44	0.1546	2/3C+3C/3C	57	0.53	0.5976
3C/3C	19			2/2	8		
3G/3G	9	-1.04	0.3080	2/3C+3C/3C	57	-0.29	0.7738
3G/3C	20			2/3G	30		
3G/3G	9	-1.32	0.1976	2/3C+3C/3C	57	2.29	<b>0.0256</b>
3C/3C	19			3G/3G	9		
3G/3C	20	-0.30	0.7693	2/3C+3C/3C	57	1.39	0.1695
3C/3C	19			3G/3C	20		
2/2+2/3G	38	-0.46	0.6478				
2/3C	38						

**Tabla 10.** Prueba de t para comparar niveles de folatos (log Folatos) en hombres de acuerdo al genotipo

Genotipos a comparar	N	t	p	Genotipos a comparar	N	t	p																																																																																																																																																																																				
2/2	8	3.24	<b>0.0025</b>	2/2+2/3G	38	-0.23	0.8158																																																																																																																																																																																				
2/3G	30			3G/3G	8			2/2	8	3.54	<b>0.0009</b>	2/2+2/3G	38	0.65	0.5198	2/3C	39	3G/3C	19	2/2	8	1.98	0.0682	2/2+2/3G	38	-1.50	0.1393	3G/3G	8	3C/3C	18	2/2	8	2.72	<b>0.0118</b>	2/2+2/3C	47	1.45	0.1505	3G/3C	19	2/3G	30	2/2	8	1.15	0.2618	2/2+2/3C	47	-0.13	0.8992	3C/3C	18	3G/3G	8	2/3G	30	-0.58	0.5633	2/2+2/3C	47	0.95	0.3459	2/3C	39	3G/3C	19	2/3G	30	-1.01	0.3179	2/2+2/3C	47	-1.55	0.1260	3G/3G	8	3C/3C	18	2/3G	30	-0.25	0.8038	2/3G+3G/3G	38	-3.27	<b>0.0021</b>	3G/3C	19	2/2	8	2/3G	30	-2.48	<b>0.0170</b>	2/3G+3G/3G	38	-0.25	0.8049	3C/3C	18	2/3C	39	2/3C	39	-0.82	0.4189	2/3G+3G/3G	38	0.02	0.9853	3G/3G	8	3G/3C	19	2/3C	39	0.22	0.8288	2/3G+3G/3G	38	-2.41	<b>0.0195</b>	3G/3C	19	3C/3C	18	2/3C	39	-2.46	<b>0.0173</b>	2/3C+3C/3C	57	-2.68	<b>0.0093</b>	3C/3C	18	2/2	8	3G/3G	8	0.74	0.4656	2/3C+3C/3C	57	1.52	0.1327	3G/3C	19	2/3G	30	3G/3G	8	-0.90	0.3747	2/3C+3C/3C	57	-0.13	0.8938	3C/3C	18	3G/3G	8	3G/3C	19	-1.93	0.0614	2/3C+3C/3C	57	0.99	0.3273	3C/3C	18	3G/3C	19	2/2+2/3G	38	0.66	0.5109					2/3C	39		
2/2	8	3.54	<b>0.0009</b>	2/2+2/3G	38	0.65	0.5198																																																																																																																																																																																				
2/3C	39			3G/3C	19			2/2	8	1.98	0.0682	2/2+2/3G	38	-1.50	0.1393	3G/3G	8	3C/3C	18	2/2	8	2.72	<b>0.0118</b>	2/2+2/3C	47	1.45	0.1505	3G/3C	19	2/3G	30	2/2	8	1.15	0.2618	2/2+2/3C	47	-0.13	0.8992	3C/3C	18	3G/3G	8	2/3G	30	-0.58	0.5633	2/2+2/3C	47	0.95	0.3459	2/3C	39	3G/3C	19	2/3G	30	-1.01	0.3179	2/2+2/3C	47	-1.55	0.1260	3G/3G	8	3C/3C	18	2/3G	30	-0.25	0.8038	2/3G+3G/3G	38	-3.27	<b>0.0021</b>	3G/3C	19	2/2	8	2/3G	30	-2.48	<b>0.0170</b>	2/3G+3G/3G	38	-0.25	0.8049	3C/3C	18	2/3C	39	2/3C	39	-0.82	0.4189	2/3G+3G/3G	38	0.02	0.9853	3G/3G	8	3G/3C	19	2/3C	39	0.22	0.8288	2/3G+3G/3G	38	-2.41	<b>0.0195</b>	3G/3C	19	3C/3C	18	2/3C	39	-2.46	<b>0.0173</b>	2/3C+3C/3C	57	-2.68	<b>0.0093</b>	3C/3C	18	2/2	8	3G/3G	8	0.74	0.4656	2/3C+3C/3C	57	1.52	0.1327	3G/3C	19	2/3G	30	3G/3G	8	-0.90	0.3747	2/3C+3C/3C	57	-0.13	0.8938	3C/3C	18	3G/3G	8	3G/3C	19	-1.93	0.0614	2/3C+3C/3C	57	0.99	0.3273	3C/3C	18	3G/3C	19	2/2+2/3G	38	0.66	0.5109					2/3C	39														
2/2	8	1.98	0.0682	2/2+2/3G	38	-1.50	0.1393																																																																																																																																																																																				
3G/3G	8			3C/3C	18			2/2	8	2.72	<b>0.0118</b>	2/2+2/3C	47	1.45	0.1505	3G/3C	19	2/3G	30	2/2	8	1.15	0.2618	2/2+2/3C	47	-0.13	0.8992	3C/3C	18	3G/3G	8	2/3G	30	-0.58	0.5633	2/2+2/3C	47	0.95	0.3459	2/3C	39	3G/3C	19	2/3G	30	-1.01	0.3179	2/2+2/3C	47	-1.55	0.1260	3G/3G	8	3C/3C	18	2/3G	30	-0.25	0.8038	2/3G+3G/3G	38	-3.27	<b>0.0021</b>	3G/3C	19	2/2	8	2/3G	30	-2.48	<b>0.0170</b>	2/3G+3G/3G	38	-0.25	0.8049	3C/3C	18	2/3C	39	2/3C	39	-0.82	0.4189	2/3G+3G/3G	38	0.02	0.9853	3G/3G	8	3G/3C	19	2/3C	39	0.22	0.8288	2/3G+3G/3G	38	-2.41	<b>0.0195</b>	3G/3C	19	3C/3C	18	2/3C	39	-2.46	<b>0.0173</b>	2/3C+3C/3C	57	-2.68	<b>0.0093</b>	3C/3C	18	2/2	8	3G/3G	8	0.74	0.4656	2/3C+3C/3C	57	1.52	0.1327	3G/3C	19	2/3G	30	3G/3G	8	-0.90	0.3747	2/3C+3C/3C	57	-0.13	0.8938	3C/3C	18	3G/3G	8	3G/3C	19	-1.93	0.0614	2/3C+3C/3C	57	0.99	0.3273	3C/3C	18	3G/3C	19	2/2+2/3G	38	0.66	0.5109					2/3C	39																										
2/2	8	2.72	<b>0.0118</b>	2/2+2/3C	47	1.45	0.1505																																																																																																																																																																																				
3G/3C	19			2/3G	30			2/2	8	1.15	0.2618	2/2+2/3C	47	-0.13	0.8992	3C/3C	18	3G/3G	8	2/3G	30	-0.58	0.5633	2/2+2/3C	47	0.95	0.3459	2/3C	39	3G/3C	19	2/3G	30	-1.01	0.3179	2/2+2/3C	47	-1.55	0.1260	3G/3G	8	3C/3C	18	2/3G	30	-0.25	0.8038	2/3G+3G/3G	38	-3.27	<b>0.0021</b>	3G/3C	19	2/2	8	2/3G	30	-2.48	<b>0.0170</b>	2/3G+3G/3G	38	-0.25	0.8049	3C/3C	18	2/3C	39	2/3C	39	-0.82	0.4189	2/3G+3G/3G	38	0.02	0.9853	3G/3G	8	3G/3C	19	2/3C	39	0.22	0.8288	2/3G+3G/3G	38	-2.41	<b>0.0195</b>	3G/3C	19	3C/3C	18	2/3C	39	-2.46	<b>0.0173</b>	2/3C+3C/3C	57	-2.68	<b>0.0093</b>	3C/3C	18	2/2	8	3G/3G	8	0.74	0.4656	2/3C+3C/3C	57	1.52	0.1327	3G/3C	19	2/3G	30	3G/3G	8	-0.90	0.3747	2/3C+3C/3C	57	-0.13	0.8938	3C/3C	18	3G/3G	8	3G/3C	19	-1.93	0.0614	2/3C+3C/3C	57	0.99	0.3273	3C/3C	18	3G/3C	19	2/2+2/3G	38	0.66	0.5109					2/3C	39																																						
2/2	8	1.15	0.2618	2/2+2/3C	47	-0.13	0.8992																																																																																																																																																																																				
3C/3C	18			3G/3G	8			2/3G	30	-0.58	0.5633	2/2+2/3C	47	0.95	0.3459	2/3C	39	3G/3C	19	2/3G	30	-1.01	0.3179	2/2+2/3C	47	-1.55	0.1260	3G/3G	8	3C/3C	18	2/3G	30	-0.25	0.8038	2/3G+3G/3G	38	-3.27	<b>0.0021</b>	3G/3C	19	2/2	8	2/3G	30	-2.48	<b>0.0170</b>	2/3G+3G/3G	38	-0.25	0.8049	3C/3C	18	2/3C	39	2/3C	39	-0.82	0.4189	2/3G+3G/3G	38	0.02	0.9853	3G/3G	8	3G/3C	19	2/3C	39	0.22	0.8288	2/3G+3G/3G	38	-2.41	<b>0.0195</b>	3G/3C	19	3C/3C	18	2/3C	39	-2.46	<b>0.0173</b>	2/3C+3C/3C	57	-2.68	<b>0.0093</b>	3C/3C	18	2/2	8	3G/3G	8	0.74	0.4656	2/3C+3C/3C	57	1.52	0.1327	3G/3C	19	2/3G	30	3G/3G	8	-0.90	0.3747	2/3C+3C/3C	57	-0.13	0.8938	3C/3C	18	3G/3G	8	3G/3C	19	-1.93	0.0614	2/3C+3C/3C	57	0.99	0.3273	3C/3C	18	3G/3C	19	2/2+2/3G	38	0.66	0.5109					2/3C	39																																																		
2/3G	30	-0.58	0.5633	2/2+2/3C	47	0.95	0.3459																																																																																																																																																																																				
2/3C	39			3G/3C	19			2/3G	30	-1.01	0.3179	2/2+2/3C	47	-1.55	0.1260	3G/3G	8	3C/3C	18	2/3G	30	-0.25	0.8038	2/3G+3G/3G	38	-3.27	<b>0.0021</b>	3G/3C	19	2/2	8	2/3G	30	-2.48	<b>0.0170</b>	2/3G+3G/3G	38	-0.25	0.8049	3C/3C	18	2/3C	39	2/3C	39	-0.82	0.4189	2/3G+3G/3G	38	0.02	0.9853	3G/3G	8	3G/3C	19	2/3C	39	0.22	0.8288	2/3G+3G/3G	38	-2.41	<b>0.0195</b>	3G/3C	19	3C/3C	18	2/3C	39	-2.46	<b>0.0173</b>	2/3C+3C/3C	57	-2.68	<b>0.0093</b>	3C/3C	18	2/2	8	3G/3G	8	0.74	0.4656	2/3C+3C/3C	57	1.52	0.1327	3G/3C	19	2/3G	30	3G/3G	8	-0.90	0.3747	2/3C+3C/3C	57	-0.13	0.8938	3C/3C	18	3G/3G	8	3G/3C	19	-1.93	0.0614	2/3C+3C/3C	57	0.99	0.3273	3C/3C	18	3G/3C	19	2/2+2/3G	38	0.66	0.5109					2/3C	39																																																														
2/3G	30	-1.01	0.3179	2/2+2/3C	47	-1.55	0.1260																																																																																																																																																																																				
3G/3G	8			3C/3C	18			2/3G	30	-0.25	0.8038	2/3G+3G/3G	38	-3.27	<b>0.0021</b>	3G/3C	19	2/2	8	2/3G	30	-2.48	<b>0.0170</b>	2/3G+3G/3G	38	-0.25	0.8049	3C/3C	18	2/3C	39	2/3C	39	-0.82	0.4189	2/3G+3G/3G	38	0.02	0.9853	3G/3G	8	3G/3C	19	2/3C	39	0.22	0.8288	2/3G+3G/3G	38	-2.41	<b>0.0195</b>	3G/3C	19	3C/3C	18	2/3C	39	-2.46	<b>0.0173</b>	2/3C+3C/3C	57	-2.68	<b>0.0093</b>	3C/3C	18	2/2	8	3G/3G	8	0.74	0.4656	2/3C+3C/3C	57	1.52	0.1327	3G/3C	19	2/3G	30	3G/3G	8	-0.90	0.3747	2/3C+3C/3C	57	-0.13	0.8938	3C/3C	18	3G/3G	8	3G/3C	19	-1.93	0.0614	2/3C+3C/3C	57	0.99	0.3273	3C/3C	18	3G/3C	19	2/2+2/3G	38	0.66	0.5109					2/3C	39																																																																										
2/3G	30	-0.25	0.8038	2/3G+3G/3G	38	-3.27	<b>0.0021</b>																																																																																																																																																																																				
3G/3C	19			2/2	8			2/3G	30	-2.48	<b>0.0170</b>	2/3G+3G/3G	38	-0.25	0.8049	3C/3C	18	2/3C	39	2/3C	39	-0.82	0.4189	2/3G+3G/3G	38	0.02	0.9853	3G/3G	8	3G/3C	19	2/3C	39	0.22	0.8288	2/3G+3G/3G	38	-2.41	<b>0.0195</b>	3G/3C	19	3C/3C	18	2/3C	39	-2.46	<b>0.0173</b>	2/3C+3C/3C	57	-2.68	<b>0.0093</b>	3C/3C	18	2/2	8	3G/3G	8	0.74	0.4656	2/3C+3C/3C	57	1.52	0.1327	3G/3C	19	2/3G	30	3G/3G	8	-0.90	0.3747	2/3C+3C/3C	57	-0.13	0.8938	3C/3C	18	3G/3G	8	3G/3C	19	-1.93	0.0614	2/3C+3C/3C	57	0.99	0.3273	3C/3C	18	3G/3C	19	2/2+2/3G	38	0.66	0.5109					2/3C	39																																																																																						
2/3G	30	-2.48	<b>0.0170</b>	2/3G+3G/3G	38	-0.25	0.8049																																																																																																																																																																																				
3C/3C	18			2/3C	39			2/3C	39	-0.82	0.4189	2/3G+3G/3G	38	0.02	0.9853	3G/3G	8	3G/3C	19	2/3C	39	0.22	0.8288	2/3G+3G/3G	38	-2.41	<b>0.0195</b>	3G/3C	19	3C/3C	18	2/3C	39	-2.46	<b>0.0173</b>	2/3C+3C/3C	57	-2.68	<b>0.0093</b>	3C/3C	18	2/2	8	3G/3G	8	0.74	0.4656	2/3C+3C/3C	57	1.52	0.1327	3G/3C	19	2/3G	30	3G/3G	8	-0.90	0.3747	2/3C+3C/3C	57	-0.13	0.8938	3C/3C	18	3G/3G	8	3G/3C	19	-1.93	0.0614	2/3C+3C/3C	57	0.99	0.3273	3C/3C	18	3G/3C	19	2/2+2/3G	38	0.66	0.5109					2/3C	39																																																																																																		
2/3C	39	-0.82	0.4189	2/3G+3G/3G	38	0.02	0.9853																																																																																																																																																																																				
3G/3G	8			3G/3C	19			2/3C	39	0.22	0.8288	2/3G+3G/3G	38	-2.41	<b>0.0195</b>	3G/3C	19	3C/3C	18	2/3C	39	-2.46	<b>0.0173</b>	2/3C+3C/3C	57	-2.68	<b>0.0093</b>	3C/3C	18	2/2	8	3G/3G	8	0.74	0.4656	2/3C+3C/3C	57	1.52	0.1327	3G/3C	19	2/3G	30	3G/3G	8	-0.90	0.3747	2/3C+3C/3C	57	-0.13	0.8938	3C/3C	18	3G/3G	8	3G/3C	19	-1.93	0.0614	2/3C+3C/3C	57	0.99	0.3273	3C/3C	18	3G/3C	19	2/2+2/3G	38	0.66	0.5109					2/3C	39																																																																																																														
2/3C	39	0.22	0.8288	2/3G+3G/3G	38	-2.41	<b>0.0195</b>																																																																																																																																																																																				
3G/3C	19			3C/3C	18			2/3C	39	-2.46	<b>0.0173</b>	2/3C+3C/3C	57	-2.68	<b>0.0093</b>	3C/3C	18	2/2	8	3G/3G	8	0.74	0.4656	2/3C+3C/3C	57	1.52	0.1327	3G/3C	19	2/3G	30	3G/3G	8	-0.90	0.3747	2/3C+3C/3C	57	-0.13	0.8938	3C/3C	18	3G/3G	8	3G/3C	19	-1.93	0.0614	2/3C+3C/3C	57	0.99	0.3273	3C/3C	18	3G/3C	19	2/2+2/3G	38	0.66	0.5109					2/3C	39																																																																																																																										
2/3C	39	-2.46	<b>0.0173</b>	2/3C+3C/3C	57	-2.68	<b>0.0093</b>																																																																																																																																																																																				
3C/3C	18			2/2	8			3G/3G	8	0.74	0.4656	2/3C+3C/3C	57	1.52	0.1327	3G/3C	19	2/3G	30	3G/3G	8	-0.90	0.3747	2/3C+3C/3C	57	-0.13	0.8938	3C/3C	18	3G/3G	8	3G/3C	19	-1.93	0.0614	2/3C+3C/3C	57	0.99	0.3273	3C/3C	18	3G/3C	19	2/2+2/3G	38	0.66	0.5109					2/3C	39																																																																																																																																						
3G/3G	8	0.74	0.4656	2/3C+3C/3C	57	1.52	0.1327																																																																																																																																																																																				
3G/3C	19			2/3G	30			3G/3G	8	-0.90	0.3747	2/3C+3C/3C	57	-0.13	0.8938	3C/3C	18	3G/3G	8	3G/3C	19	-1.93	0.0614	2/3C+3C/3C	57	0.99	0.3273	3C/3C	18	3G/3C	19	2/2+2/3G	38	0.66	0.5109					2/3C	39																																																																																																																																																		
3G/3G	8	-0.90	0.3747	2/3C+3C/3C	57	-0.13	0.8938																																																																																																																																																																																				
3C/3C	18			3G/3G	8			3G/3C	19	-1.93	0.0614	2/3C+3C/3C	57	0.99	0.3273	3C/3C	18	3G/3C	19	2/2+2/3G	38	0.66	0.5109					2/3C	39																																																																																																																																																														
3G/3C	19	-1.93	0.0614	2/3C+3C/3C	57	0.99	0.3273																																																																																																																																																																																				
3C/3C	18			3G/3C	19			2/2+2/3G	38	0.66	0.5109					2/3C	39																																																																																																																																																																										
2/2+2/3G	38	0.66	0.5109																																																																																																																																																																																								
2/3C	39																																																																																																																																																																																										

<b>Tabla 11. Prueba de t para comparar niveles de Vitamina B12 (log VitB12) en hombres de acuerdo al genotipo</b>							
Genotipos a comparar				Genotipos a comparar			
	N	t	p		N	t	p
2/2	8	-1.88	0.0676	2/2+2/3G	38	0.94	0.3515
2/3G	30			3G/3G	8		
2/2	8	-0.15	0.8877	2/2+2/3G	38	1.04	0.3043
2/3C	39			3G/3C	19		
2/2	8	-0.81	0.4413	2/2+2/3G	38	-0.24	0.8107
3G/3G	8			3C/3C	18		
2/2	8	-0.61	0.5558	2/2+2/3C	47	-3.57	<b>0.0006</b>
3G/3C	19			2/3G	30		
2/2	8	-1.31	0.2275	2/2+2/3C	47	-2.15	<b>0.0415</b>
3C/3C	18			3G/3G	8		
2/3G	30	3.69	<b>0.0005</b>	2/2+2/3C	47	-1.20	0.2339
2/3C	39			3G/3C	19		
2/3G	30	1.77	0.0865	2/2+2/3C	47	-2.92	<b>0.0049</b>
3G/3G	8			3C/3C	18		
2/3G	30	1.76	0.0842	2/3G+3G/3G	38	1.35	0.2133
3G/3C	19			2/2	8		
2/3G	30	0.40	0.6882	2/3G+3G/3G	38	3.64	<b>0.0005</b>
3C/3C	18			2/3C	39		
2/3C	39	-2.19	0.0396	2/3G+3G/3G	38	1.62	0.1105
3G/3G	8			3G/3C	19		
2/3C	39	-1.28	0.2068	2/3G+3G/3G	38	0.10	0.9194
3G/3C	19			3C/3C	18		
2/3C	39	-3.31	<b>0.0016</b>	2/3C+3C/3C	57	0.52	0.6171
3C/3C	18			2/2	8		
3G/3G	8	0.43	0.6737	2/3C+3C/3C	57	-2.91	<b>0.0046</b>
3G/3C	19			2/3G	30		
3G/3G	8	-1.16	0.2573	2/3C+3C/3C	57	-1.03	0.3172
3C/3C	18			3G/3G	8		
3G/3C	19	-1.53	0.1344	2/3C+3C/3C	57	-0.32	0.7522
3C/3C	18			3G/3C	19		
2/2+2/3G	38	2.65	<b>0.0102</b>				
2/3C	39						

Se realizó el análisis estadístico con una prueba t de student para comparar los niveles de metabolitos (Hcy, folatos y vitamina B12) entre los genotipos para *TYMS* (En el anexo III se muestran los valores de: media, mediana, desviación estándar [DE], varianza, máximo y mínimo valor en el grupo, percentilas 25, 50 y 75). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

En la tabla 6 el genotipo 2/3C en mujeres difiere significativamente en valores de Hcy de los genotipos 2/2, 2/3G, 3G/3G, 3G/3C; también es importante destacar que el genotipo 2/3C presenta el valor promedio más bajo de todos los genotipos en mujeres (6.94  $\mu\text{mol/L}$ ), en tanto el genotipo 2/3G tiene los valores más bajos (9.15  $\mu\text{mol/L}$ ).

Los niveles de folato (tabla 7) entre las distintas muestras en mujeres no difieren significativamente entre sí con excepción de 3G/3C y 3C/3C, además de 2/3C y 3C/3C. El genotipo homocigoto para la variante C (3C/3C) tiene valores de folatos más bajos (6.75 ng/mL) y el genotipo 2/3C presenta en promedio el nivel más alto de folatos (10.32ng/mL). Este último resultado concuerda con lo establecido en la literatura, en donde se menciona que los niveles de folato son inversamente proporcionales a los niveles de Hcy debido a que los folatos promueven la remetilación de Hcy a metionina (Hol et al, 1998).

El genotipo 2/3C en mujeres (tabla 8) difiere significativamente en niveles de vitamina B12 de todos los genotipos, siendo esta variante la que cuenta con niveles más altos de vitamina B12 (564.00 pg/mL).

En la tabla 9 los genotipos en hombres no presentan variación estadísticamente significativa en cuanto a los niveles de Hcy en plasma a

excepción de las variantes 2/3C y 3G/3G, las cuales difieren significativamente en niveles de Hcy, siendo la primera quien presenta mayores niveles comparada con la segunda (12.65  $\mu\text{mol/L}$  y 9.83  $\mu\text{mol/L}$  respectivamente).

Para folatos, el análisis estadístico mostrado en la tabla 10, el genotipo 2/2 en hombres cuenta con valores significativamente más elevados (13.34 ng/mL) que los genotipos 2/3G, 2/3C y 3G/3C (7.20, 7.38 y 7.56 ng/mL respectivamente), asimismo 3C/3C tiene valores significativamente mayores (10.44 ng/mL) que los genotipos 2/3G y 2/3C.

Finalmente, el genotipo 2/3C en hombres cuenta con niveles séricos de vitamina B12 (299.75pg/mL) significativamente menores que los genotipos 2/3G (599.39pg/mL) y 3C/3C (471.15pg/mL).

De lo anterior se observa que las variantes genéticas en hombres y mujeres no presentan los mismos niveles de metabolitos. Es importante destacar que en mujeres la variante 2/3C es la que presenta menores niveles de Hcy (6.94 $\mu\text{mol/L}$ ), mientras que en los hombres esta misma variante cuenta con el segundo valor más alto de este mismo metabolito de acuerdo al genotipo (12.65 $\mu\text{mol/L}$ ). Por lo tanto, se puede señalar que los niveles de Hcy no solamente dependen del genotipo para las variantes analizadas de *TYMS*, sino que existen otros factores que indudablemente influyen en los niveles séricos de Hcy, tales como el sexo, la ingesta de folatos a través de suplementación alimenticia, consumo de alcohol (Melerba et al, 2006), lo cual pudo provocar las diferencias estadísticamente significativas mencionadas con anterioridad.

### 7.1.4 Frecuencias genotípica y alélica con respecto a otras poblaciones

Con la finalidad de caracterizar las variantes alélicas de manera adecuada se realizó una prueba de Chi cuadrada para comparar las frecuencias obtenidas en el presente estudio y las reportadas previamente en la literatura.

En esta primer comparación (tabla 12) no se consideró al SNP en el tercer repetido debido a que los estudios y caracterización de variantes alélicas que lo consideraban son escasos. Se seleccionaron las siguientes poblaciones debido a que son representativas de distintas regiones:

<b>Tabla 12.</b> Comparación entre las frecuencias genotípicas de la población estudiada y la reportada en otras poblaciones.										
Población	N	Genotipo							$\chi^2$	p
		2/2	2/3	3/3	Otros					
					2/4	3/4	2/9	3/9		
INCMNSZ	300	31	158	102	0	8	1	0	Ref.	Ref.
Kenia <sup>1</sup>	98	17	43	25	10	3	0	0	19.89	<b>&gt;0.001</b>
Ghana <sup>d</sup>	249	35	120	72	7	10	1	4	7.38	0.061
Afro-americana <sup>d</sup>	92	18	49	22	0	3	0	0	7.09	0.069
China <sup>2</sup>	473	25	143	305	0	0	0	0	62.85	<b>&gt;0.001</b>
Caucásica estadounidense <sup>d</sup>	104	20	56	27	0	0	0	0	6.33	<b>0.042</b>
Caucásica británica <sup>d</sup>	97	18	51	27	1	0	0	0	4.80	0.091

Kenia: donadores del Hospital Nacional de Kenia y de la Universidad de Nairobi (este de África); Ghana: donadores de Accra, Ghana (oeste de África); Afro-americanos y Caucásicos estadounidenses: donadores de Memphis; Caucásicos británicos: donadores de Aberdeen y Glasgow, Escocia, Reino Unido; China: Provincia de Jiangsu (Este de China).

Es importante aclarar que con el objeto de facilitar el estudio, los genotipos 2/4, 3/4, 2/9 y 3/9 fueron clasificados dentro de una misma categoría denominada “otros”.

Como se pudo observar en la tabla anterior, la población mexicana analizada en este trabajo, difiere en la frecuencia genotípica de las poblaciones

<sup>1</sup> Referencia tomada de Marsh, 2000

<sup>2</sup> Referencia tomada de Zhai et al, 2006

caucásica estadounidense y keniana debido a que en estas dos, la frecuencia del homocigoto 2/2 es más elevada con respecto a la mexicana (INCMNSZ), mientras que la frecuencia del genotipo 3/3 es menor que en la de la población del INCMNSZ. En tanto, la población china difiere significativamente de la mexicana, debido a que el genotipo 3/3 es mucho más frecuente en la primera, mientras que los heterocigotos 2/3 y los homocigotos 2/2 son más comunes en la población mexicana con respecto a la china. También debe destacarse la mayor frecuencia en las poblaciones africanas de los genotipos “raros” (2/4, 3/4, 2/9 y 3/9) con respecto a las otras poblaciones.

Asimismo, con las mismas poblaciones se realizó la comparación entre las frecuencias alélicas obteniendo los resultados mostrados en la tabla 13.

<b>Tabla 13.</b> Comparación entre las frecuencias alélicas de la población estudiada y la reportada en otras poblaciones.							
Población	N	Alelo				$\chi^2$	p
		2	3	4	9		
INCMNSZ	600	221	370	8	1	Ref.	Ref.
Kenia	196	87	96	13	1	22.29	<b>&gt;0.001</b>
Ghana	498	198	278	17	5	10.85	<b>0.013</b>
Afro-americana	184	85	96	3	0	5.69	0.128
China	946	193	753	0	0	52.51	<b>&gt;0.001</b>
Caucásica estadounidense	208	96	112	0	0	4.57	<b>0.032</b>
Caucásica británica	194	88	105	1	0	4.99	0.082

En la tabla anterior, la población mexicana del INCMNSZ, difiere en la frecuencia alélica de las poblaciones caucásica americana, keniana y ghanesa debido a que en estas tres, la frecuencia del alelo 2 es más elevada con respecto a la mexicana, mientras que la frecuencia del alelo 3 es menor en estas tres poblaciones que en la de la población del INCMNSZ. También debe destacarse

que los alelos “raros” (4 y 9) son más frecuentes en las poblaciones africanas que en la mexicana. En tanto, también puede observarse en la misma tabla que la población china difiere significativamente de la mexicana, debido a que el alelo 3 es mucho más frecuente en la primera, mientras que el alelo 2 es más común en la población mexicana con respecto a la china.

Considerando el SNP en el tercer repetido de TS, se realizó un análisis comparativo entre las frecuencias de distintas poblaciones. Los resultados obtenidos son mostrados en la tabla 14.

**Tabla 14.** Comparación entre las frecuencias genotípicas de la población estudiada y las reportadas en otras poblaciones.

Población	N	Genotipo							X <sup>2</sup>	p
		2/2	2/3G	2/3C	3G/3G	3G/3C	3C/3C	Otros		
INCMNSZ	300	31	62	96	22	46	34	9	Ref.	Ref.
Blanca norteamericana <sup>3</sup>	99	19	13	31	11	16	9	0	8.39	0.136
Hispánica <sup>f</sup>	98	17	25	24	10	13	7	2	7.37	0.194
Afro-americana <sup>f</sup>	59	17	15	8	11	7	1	0	30.19	>0.001
China (Singapur) <sup>f</sup>	80	2	15	12	26	14	11	0	42.36	>0.001
China (Beijing) <sup>4</sup>	492	18	69	68	79	187	71	0	93.71	>0.001

Poblaciones Blanca Americana, Hispánica y Africo Americana: Los Ángeles, California.  
La columna “Otros” contiene a los genotipos 2/9, 3G/4 y 3C/4.

No existen diferencias significativas entre la población blanca americana y la población hispánica. Aún cuando en la literatura no existe una descripción del origen de esta última, es muy probable que se encuentre estrechamente relacionada con la población mexicana, ya que Los Ángeles cuenta con un gran número de habitantes de origen mexicano (no se debe olvidar que también

<sup>3</sup> Referencia tomada de Mandola et al, 2003

<sup>4</sup> Referencia tomada de Tan et al, 2005

pueden formar parte de esta población puertorriqueños, centroamericanos continentales, y algunos sudamericanos).

Asimismo es importante destacar que en las poblaciones descritas en la tabla 7, solamente en la población hispánica y en la del INCMNSZ se encuentran genotipos “raros” (en el caso de la población mexicana 2/9, 3G/4 y 3C/4, mientras que en la población hispánica no se especifica el genotipo).

En cuanto a las diferencias significativas, la población mexicana difiere de las poblaciones chinas y de la población afro americana. En el caso de las poblaciones chinas, la frecuencia del genotipo 2/2 es baja con respecto a la población mexicana. Sin embargo, es importante destacar que en cuanto al SNP G→C en el tercer repetido, el genotipo 3G/3G es el más frecuente en la población de Singapur, en cambio, en la población mexicana, en cuanto al tercer repetido es más común el genotipo 3C/3C, en tanto en la población china de Beijing, no existe esta tendencia.

Con estas mismas poblaciones se realizó una comparación entre las frecuencias alélicas encontrando los resultados mostrados en la tabla 15.

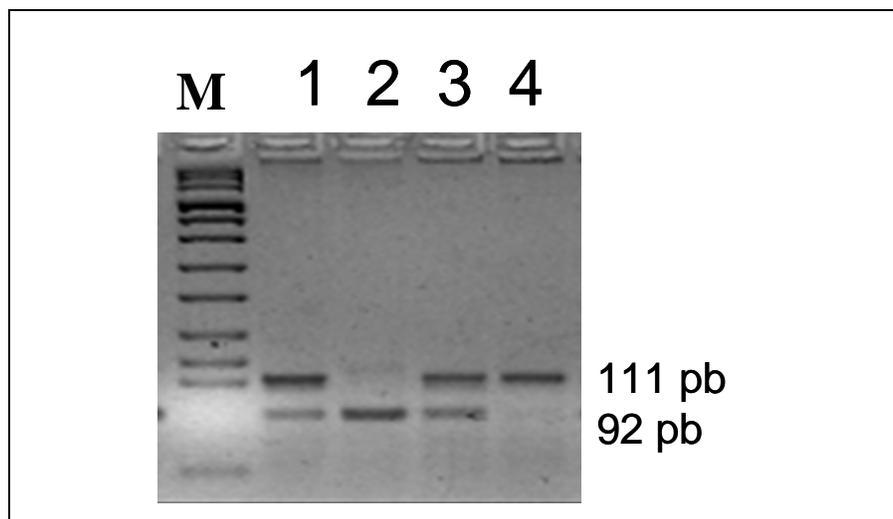
<b>Tabla 15.</b> Comparación entre las frecuencias alélicas de la población estudiada y las reportadas en otras poblaciones.							
Población	N	Alelo				X <sup>2</sup>	p
		2	3G	3C	Otros		
INCMNSZ	600	220	152	210	18	Ref.	Ref.
Blanca estadounidense	198	82	51	65	0	0.95	0.622
Hispánica	196	83	58	51	4	5.86	0.053
Afro-americana	118	57	44	17	0	21.32	<b>&gt;0.001</b>
China (Singapur)	160	31	81	48	0	37.94	<b>&gt;0.001</b>
China (Beijing)	984	173	414	397	0	87.05	<b>&gt;0.001</b>

En la tabla anterior se observa que la población mexicana difiere de las poblaciones chinas y de la población afro-americana. En el caso de las

poblaciones chinas, el alelo 2 tiene una menor frecuencia que en la población mexicana, además, aquellos alelos “raros” (Otros) no se presentan en las poblaciones chinas (Singapur y Beijing).

## 7.2 Dihidrofolato reductasa

Se llevó a cabo la amplificación y caracterización genética de 300 muestras correspondientes a 150 hombres y 150 mujeres donadores del Banco de Sangre del INCMNSZ para la variante genética en *DHFR* consistente en una delección de 19 pb. Los productos de PCR en un gel de agarosa al 3% se observaron de la siguiente manera:

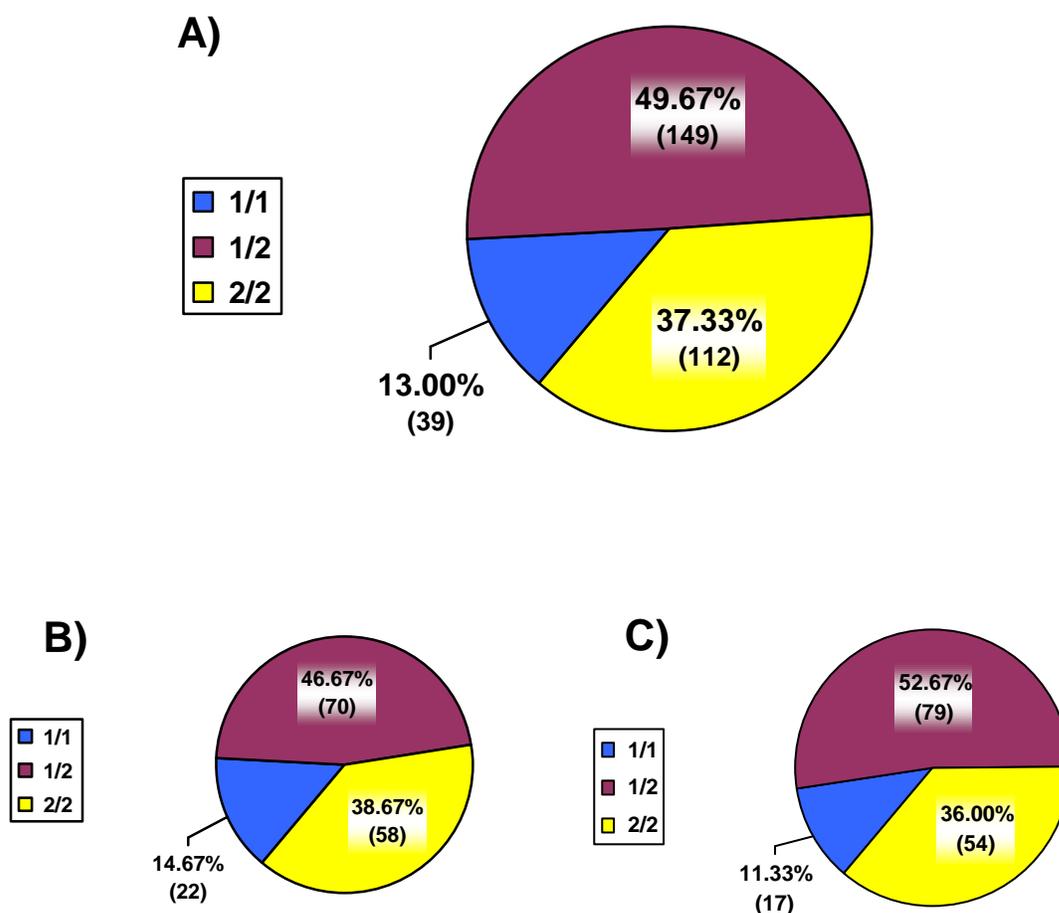


**Fig. 24.** Polimorfismos de *DHFR*. El alelo 1 es aquél que no tiene la delección, observado en la banda de 111 pb. El alelo 2 es aquél que cuenta con la delección y se observa en la banda de 92 pb. Genotipos: Línea 1: 1/2; Línea 2: 2/2; Línea 3: 1/2; Línea 4: 1/1  
M= Escalera de tamaño molecular.

### 7.2.1 Frecuencias alélicas y genotípicas de la variante del19pb

Una vez caracterizada la variante genotípica correspondiente a la delección de 19pb del gen *DHFR*, se procedió a calcular la frecuencia de acuerdo al genotipo encontrada en el total de las muestras utilizadas, así como también la determinación de la frecuencia genotípica por sexo. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 25.

**Frecuencia Genotípica para DHFR**

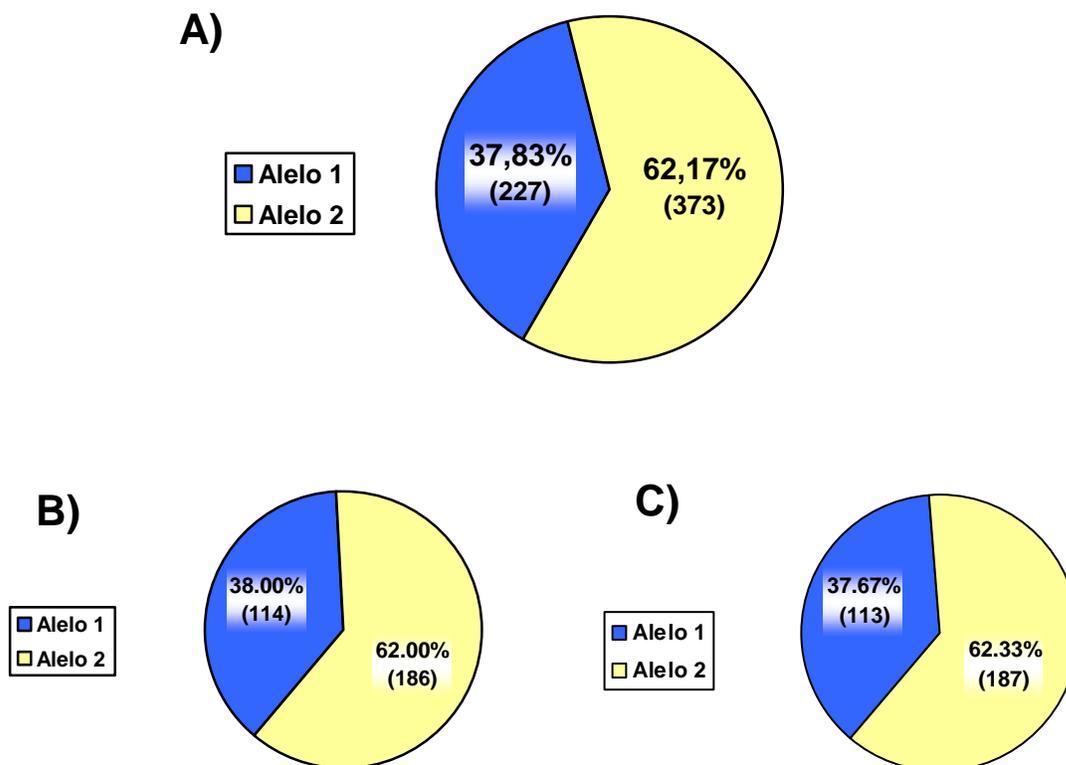


**Fig. 25.** Distribución de los genotipos para *DHFR*. El genotipo 1/1 representa al homocigoto Silvestre; 1/2 heterocigoto; 2/2 Homocigoto mutante (con la variante del19pb). **A)** Distribución en el total de las muestras. **B)** Distribución de los genotipos en mujeres. **C)** Frecuencia genotípica en hombres.

En la figura anterior se aprecia que el genotipo más común en la población estudiada corresponde al heterocigoto (1/2). También se puede observar una alta frecuencia del homocigoto mutante (2/2).

Realizado el cálculo de frecuencias genotípicas, se determinó la frecuencia alélica para del19pb en *DHFR* en el total de las muestras utilizadas y posteriormente de acuerdo al sexo de los sujetos analizados. Los resultados se muestran en la Fig. 26.

### Frecuencia Alélica para DHFR



**Fig. 26.** Distribución alélica para la variante analizada en el gen *DHFR*. El alelo 1 es el silvestre; el alelo 2 corresponde a la delección de 19pb en el intrón 1. **A)** Distribución alélica en el total de las muestras. **B)** Distribución de los alelos en mujeres. **C)** Frecuencia alélica en hombres.

El alelo 2 (con la delección) es el más frecuente en la población analizada.

### 7.2.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Se analizó si los resultados obtenidos para este genotipo se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg según la prueba de Chi cuadrada *goodness-of-fit test*. Para los genotipos correspondientes a la delección de 19 pb se obtuvieron los resultados de la tabla 16 (cálculos desglosados en el Anexo I).

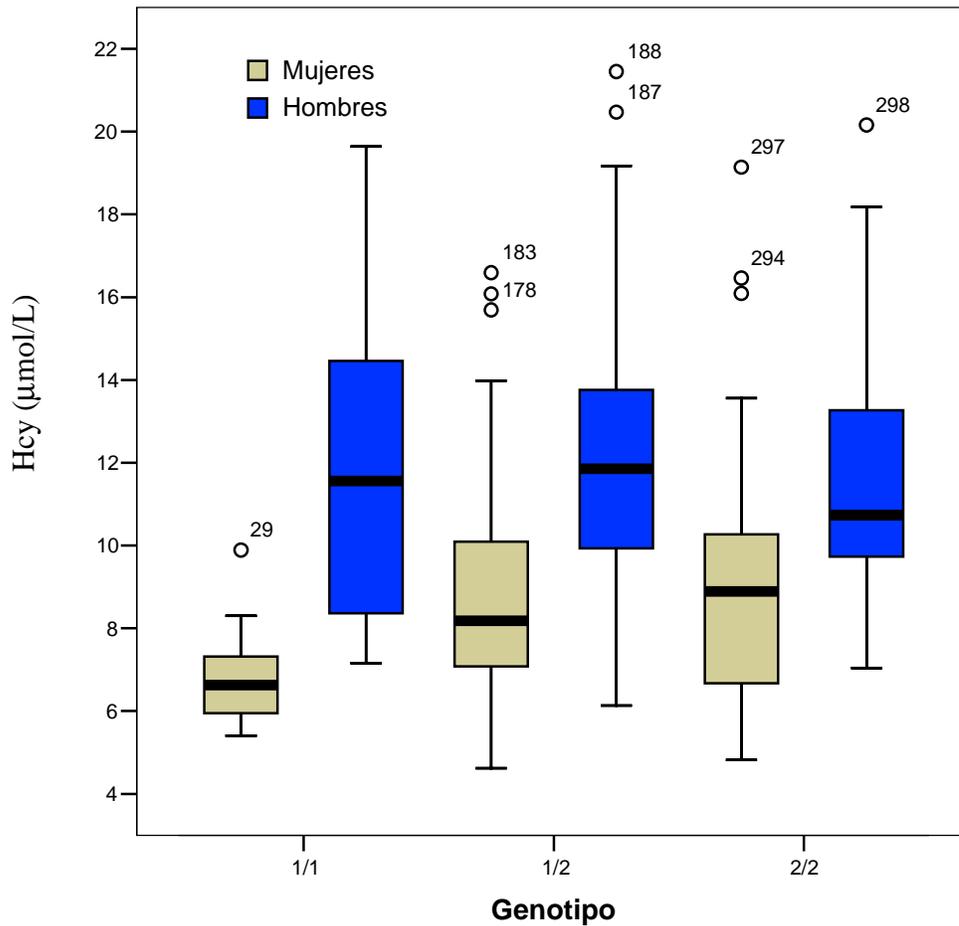
<b>Tabla 16.</b> Prueba de $\chi^2$ en los individuos analizados para DHFR			
Muestra	N	$\chi^2$	p
Total	300	0,9358	> 0.05
Hombres	150	2,2171	> 0.05
Mujeres	150	0,0139	> 0.05

En el total de la muestra, hombres y mujeres, la “p” obtenida en la prueba Chi cuadrada es mayor a 0.05, esto es un indicativo de que no existen diferencias significativas entre los genotipos observados y los esperados para esta variante por lo cual se establece que la población analizada se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

### 7.2.3 Niveles de homocisteína, folatos y vitamina B12 con respecto al genotipo y al sexo

Se analizó por genotipo y por alelo mediante una prueba t de student si existía alguna correlación entre el genotipo caracterizado y los niveles séricos de homocisteína, folatos y vitamina B12 (las tablas correspondientes a los metabolitos de acuerdo al genotipo se encuentran localizadas en el Anexo II).

Para homocisteína sólo fue posible contar con el valor de los niveles séricos de este metabolito en 258 de los 300 casos estudiados (129 mujeres y 129 hombres), obteniendo resultados mostrados en la Fig. 27.

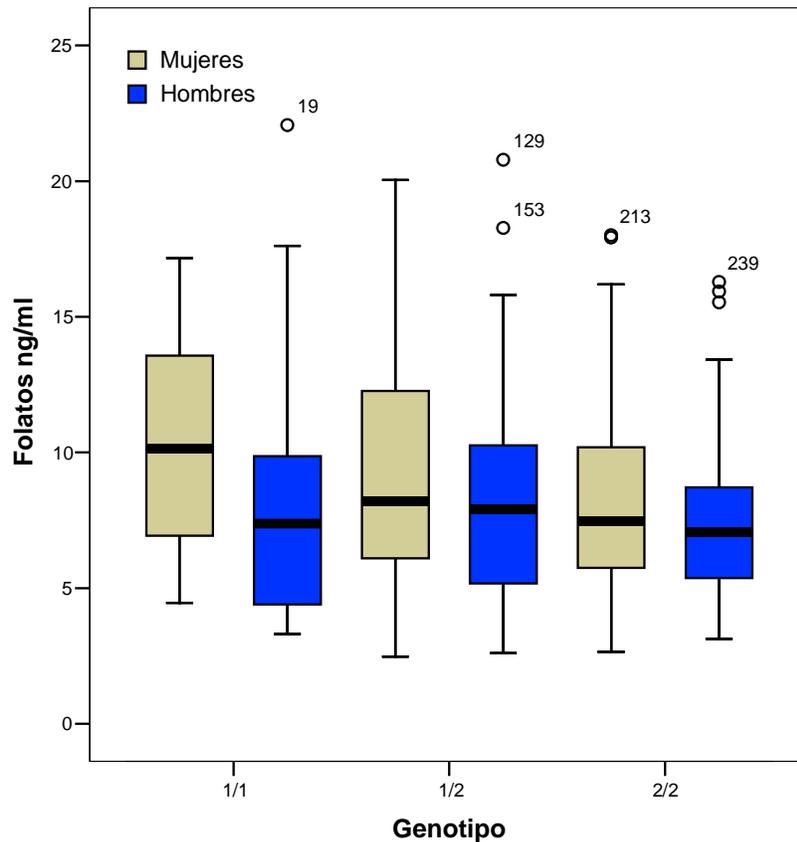


**Fig. 27.** Distribución de homocisteína en hombres y mujeres de acuerdo al genotipo para *DHFR*. Se observa que los hombres independientemente del genotipo registran los niveles más altos de Hcy que las mujeres, las diferencias entre estos dos grupos son significativas.

En esta gráfica se puede observar una correlación en mujeres entre los niveles de Hcy y el genotipo para *DHFR*, siendo el genotipo silvestre (1/1) el que cuenta con niveles inferiores ( $6.87\mu\text{mol/L}$ ), seguido del heterocigoto ( $8.78\mu\text{mol/L}$ ),

y el homocigoto mutante (2/2) el cual tiene los niveles de Hcy más elevados (8.81 $\mu$ mol/L).

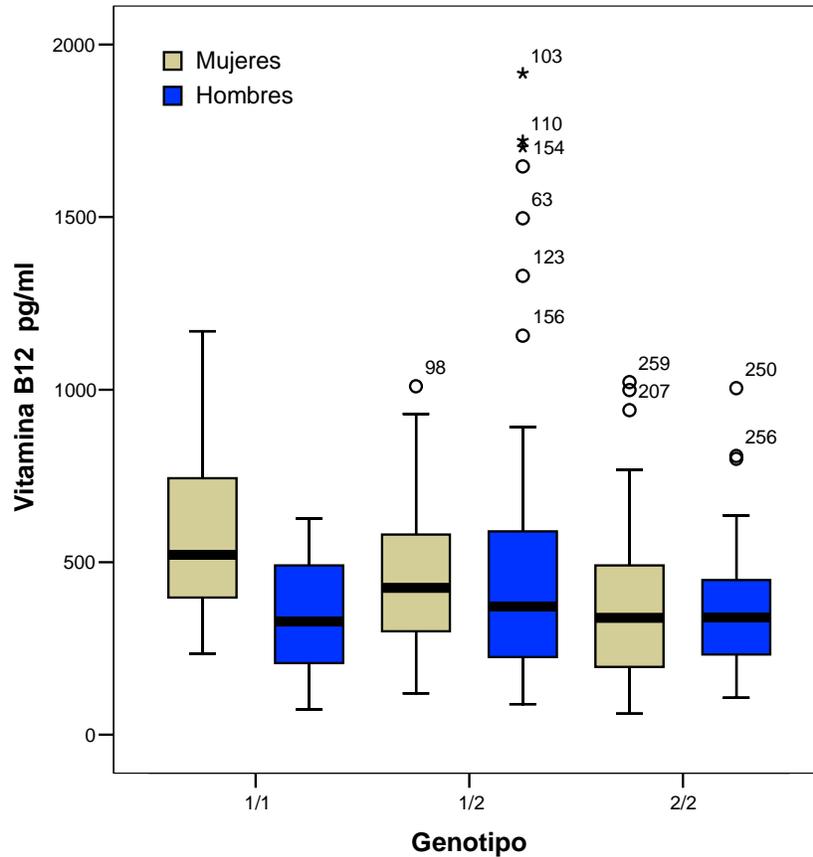
Se contó con 253 casos (126 mujeres y 127 hombres) que tenían valores de folatos, obteniendo la gráfica exhibida en la Fig. 28.



**Fig. 28.** Distribución de folatos en hombres y mujeres de acuerdo al genotipo para *DHFR*. No existen diferencias significativas entre los niveles generales de folatos de hombres y mujeres.

En la figura anterior se puede observar una correlación en mujeres entre el genotipo para *DHFR* y el nivel de folato sérico, siendo el genotipo silvestre (1/1) el que cuenta con niveles mayores (10.32ng/mL), seguido del heterocigoto (9.34 ng/mL), y el homocigoto mutante (2/2) el cual tiene los niveles de folatos más bajos (8.31 ng/mL).

En el caso de la vitamina B12 se contó con valores de 252 casos (125 mujeres y 127 hombres), los resultados se observan en la Fig. 29.



**Fig. 29.** Distribución de vitamina B12 en hombres y mujeres de acuerdo al genotipo para *DHFR*. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de vitamina B12 de hombres y mujeres.

En la gráfica anterior se puede observar una correlación en mujeres entre los niveles de vitamina B12 y el genotipo para *DHFR*, siendo el genotipo silvestre (1/1) el que cuenta con niveles más altos (583.49pg/mL), seguido del heterocigoto (465.48pg/mL), y el homocigoto mutante (2/2) el cual tiene los niveles más bajos de vitamina B12 (382.47pg/mL).

Se realizó una prueba t de student para comparar los niveles de metabolitos en un mismo sexo de acuerdo al genotipo para *DHFR*. Al igual que en *TYMS* se comparó el logaritmo de estos metabolitos con la finalidad de homogenizar varianzas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 17.

<b>Tabla 17. Prueba de t para comparar niveles de metabolitos entre sexos</b>				
Metabolito	Grupos a comparar	N	t	p
Log Hcy	Mujeres	129	-9.74	<b>2.84E-19</b>
	Hombres	129		
Log Folatos	Mujeres	126	1.95	<b>0.0522</b>
	Hombres	127		
Log Vitb12	Mujeres	125	0.89	0.3759
	Hombres	127		

Se observan diferencias significativas en los niveles de Hcy entre mujeres y hombres, siendo éstos últimos los que cuentan con una mayor lectura promedio (8.53 y 11.82  $\mu\text{mol/L}$  respectivamente), también existe una diferencia importante en cuanto a los niveles de folatos entre estos dos grupos, siendo la media de las mujeres de 9.03 ng/mL, mientras que la de los hombres es de 8.10, lo cual podría explicar en parte la diferencia en los niveles de Hcy entre los dos grupos, ya que los folatos y este metabolito guardan una relación inversamente proporcional, ya que según Hol y colaboradores (1998) al haber una mayor disponibilidad de folatos en la célula, se favorece la reacción de remetilación de la Hcy.

Debido a lo anterior, y al comprobarse diferencias significativas entre hombres y mujeres en cuanto a los niveles séricos de al menos uno de los

metabolitos medidos, las siguientes comparaciones (mostradas en las tablas 18 y 19) se realizaron por genotipo separando por sexo.

<b>Tabla 18.</b> Prueba de t para comparar niveles de Hcy, folatos y vitamina B12 en mujeres de acuerdo al genotipo							
Log Hcy							
Genotipos a comparar				N	t	p	
1/1	18	-4.06	<b>0.0002</b>	1/1 + 1/2	76	-0.87	0.3861
1/2	58			2/2	53		
1/1	18	-3.65	<b>0.0006</b>	1/1	18	-4.52	<b>0.0001</b>
2/2	53			1/2 + 2/2	111		
1/2	58	0.09	0.9287				
2/2	53						
Log Folatos							
Genotipos a comparar				N	t	p	
1/1	16	0.91	0.3667	1/1 + 1/2	73	1.74	0.0840
1/2	57			2/2	53		
1/1	16	1.81	0.0745	1/1	16	1.41	0.1597
2/2	53			1/2 + 2/2	110		
1/2	57	1.34	0.1825				
2/2	53						
Log Vit B12							
Genotipos a comparar				N	t	p	
1/1	16	1.74	0.0867	1/1 + 1/2	72	3.03	<b>0.0031</b>
1/2	56			2/2	53		
1/1	16	2.92	<b>0.0048</b>	1/1	16	2.41	<b>0.0174</b>
2/2	53			1/2 + 2/2	109		
1/2	56	2.43	<b>0.0169</b>				
2/2	53						

En la tabla 18 se observa que existen diferencias significativas en los niveles de Hcy entre los genotipos 1/1 y 2/2 y entre los genotipos 1/1 y 1/2. Al parecer, estas diferencias podrían estar determinadas por la variante alélica 2 para

*DHFR*, la cual causaría que los niveles de Hcy aumentarían. Asimismo, en el caso de la vitamina B12, existen diferencias significativas entre el genotipo homocigoto silvestre y el homocigoto mutante, así como entre éste último y el heterocigoto, siendo la variante 2/2 la que cuenta con los niveles séricos de vitamina B12 más bajos.

<b>Tabla 19. Prueba de t para comparar niveles de Hcy, folatos y vitamina B12 en hombres de acuerdo al genotipo</b>										
Log Hcy										
Genotipos a comparar				N	t	p	Genotipos a comparar			
Genotipos a comparar				N	t	p	Genotipos a comparar			
1/1				15	-0.54	0.5873	1/1 + 1/2			
1/2				70			2/2			
1/1				15	-0.25	0.8052	1/1			
2/2				44			1/2 + 2/2			
1/2				70	0.48	0.6315				
2/2				44						
Log Folatos										
Genotipos a comparar				N	t	p	Genotipos a comparar			
Genotipos a comparar				N	t	p	Genotipos a comparar			
1/1				16	-0.30	0.7640	1/1 + 1/2			
1/2				67			2/2			
1/1				16	-0.18	0.8564	1/1			
2/2				44			1/2 + 2/2			
1/2				67	0.20	0.8421				
2/2				44						
Log Vit B12										
Genotipos a comparar				N	t	p	Genotipos a comparar			
Genotipos a comparar				N	t	p	Genotipos a comparar			
1/1				16	-1.60	0.1136	1/1 + 1/2			
1/2				67			2/2			
1/1				16	-0.91	0.3714	1/1			
2/2				44			1/2 + 2/2			
1/2				67	1.32	0.1886				
2/2				44						

En el caso de los hombres, de acuerdo a lo mostrado en la tabla 19 no existen diferencias significativas entre los diversos genotipos y los distintos metabolitos medidos.

#### 7.2.4 Frecuencias genotípica y alélica con respecto a otras poblaciones

Para las variantes genéticas en *DHFR* se realizó una comparación entre las frecuencias genotípica y alélica reportadas en la literatura con las del presente estudio utilizando una prueba de Chi cuadrada. Los resultados se muestran en la tabla 20.

<b>Tabla 20.</b> Comparación entre las frecuencias genotípicas de la población estudiada y las reportadas en otras poblaciones.						
Población	N	Genotipo			$\chi^2$	p
		1/1	1/2	2/2		
INCMNSZ	300	39	149	112	Ref.	Ref.
Estadounidense <sup>5</sup>	219	61	120	38	32.63	<b>0.000001</b>
Caucásica holandesa <sup>6</sup>	330	114	150	66	47.33	<b>0.000001</b>
Población estadounidense: Nueva York y Nueva Jersey, el 88.1% caucásica, 5.9% hispánica, 5.9% asiática; Caucásica holandesa: La Haya, Holanda.						

La población mexicana difiere significativamente de las poblaciones americana y holandesa en el genotipo para la variante del 19 pb en *DHFR*.

Con estas mismas poblaciones se realizó un análisis en la distribución alélica, obteniendo los resultados presentados en la tabla 21.

<sup>5</sup> Referencia tomada de Johnson et al, 2004

<sup>6</sup> Referencia tomada de Gellekink et al, 2006

<b>Tabla 21.</b> Comparación entre las frecuencias alélicas de la población estudiada y la reportada en otras poblaciones.					
Población	N	Alelo		$\chi^2$	p
		1	2		
INCMNSZ	600	227	373	Ref.	Ref.
Estadounidense	438	242	196	30.31	<b>0.000001</b>
Caucásica holandesa	660	378	282	46.81	<b>0.000001</b>

El alelo con la delección de 19 pares de bases en el intrón 1 de *DHFR* es más común en la población mexicana que en las otras poblaciones, por lo cual, la población mexicana es diferente a las otras dos poblaciones reportadas.

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este estudio se caracterizaron las variantes alélicas para *TYMS* (repetidos en tándem de 28pb, incluido el SNP para el tercer repetido) y *DHFR* (delección de 19 pb en el intrón 1) con la finalidad de establecer la frecuencia con la que estos polimorfismos se encuentran presentes en la población mexicana mestiza.

Trescientos sujetos de estudio fueron analizados encontrando una frecuencia para los genotipos de *TYMS* de 10.33% para 2/2, 20.67% en 2/3G, 32.00% para 2/3C, 0.33% correspondiente a 2/9, 7.33% para 3G/3G, 15.33% en 3G/3C, 11.33% para 3C/3C, 0.67% para 3G/4, y 2.00% para 3C/4, mientras que en la literatura Mandola y colaboradores (2003) reportan en población hispana norteamericana (grupo de mayor similitud con el de este estudio) frecuencias de 17%, 26%, 25%, 10%, 13% y 7% para los genotipos 2/2, 2/3G, 2/3C, 3G/3G, 3G/3C y 3C/3C respectivamente, mientras que definen como “otros” a un porcentaje del 2%, correspondiente a las llamadas variantes “raras” de más de tres repetidos. No existieron diferencias estadísticas significativas entre estas dos poblaciones, sin embargo, cabe resaltar la alta frecuencia del SNP G→C en *TYMS*, lo que en la literatura citada no es reportado como tal. Una explicación a esta diferencia puede ser la citada por Marsh y colaboradores (1999) en donde mencionan que puede existir una ventaja selectiva en los alelos debida a factores ambientales y/o epigenéticos, los cuales tienen un papel importante en la influencia de estos polimorfismos. Es posible que las variaciones en la dieta de acuerdo a las regiones puedan tener una especificidad selectiva en la frecuencia

alélica de acuerdo a las diferentes poblaciones, confiriendo una ventaja selectiva a determinado alelo. Si la ingesta de timidina (sustrato de la ruta alterna en la síntesis de ADN) fuera baja en una población, los individuos con alta expresión de TS –debida a una triple repetición en *TYMS*- maximizaría la conversión de dUMP a dTMP, proporcionando un precursor importante en la síntesis de ADN, lo que daría a estos individuos una ventaja selectiva (Marsh et al, 1999).

Es importante destacar que en el presente estudio se encontró un sujeto con un genotipo de 2/9 para los repetidos en *TYMS*, lo que ha sido descrito únicamente en población africana (Ghana), encontrándose también un solo individuo con este genotipo de 249 analizados. Según Marsh y colaboradores (2000) los repetidos de más de 3 copias pueden ser característicos de determinadas regiones y grupos étnicos provenientes de África y que durante la migración en la evolución humana puede haberse perdido, asimismo proponen que la actividad de la enzima timidilato sintetasa puede aumentar de acuerdo al número de repetidos que se encuentren, sin embargo, es importante destacar que esta suposición no ha podido ser corroborada debido a la baja frecuencia con que estos genotipos se han encontrado.

Se ha reportado una correlación entre el homocigoto para tres repetidos y el incremento en la expresión de la TS (Horie et al, 1995), por lo que el homocigoto 3/3 se asocia con un pronóstico pobre en niños con leucemia aguda linfoblástica (LAL) en comparación con el homocigoto de dos repetidos o el heterocigoto 2/3 (Krajnovic et al, 2002), por lo cual es indispensable que se determine este genotipo a fin de tomar las medidas terapéuticas y de seguimiento correspondientes con el propósito de mejorar la calidad de vida de los individuos

que tienen este tipo de patologías. Cabe destacar que en este trabajo de tesis, la frecuencia para el homocigoto 3/3 fue del 34% por lo cual de acuerdo Krajinovic y colaboradores, se espera que los paciente mexicanos con LAL tengan un riesgo de presentar un pronóstico pobre en el desarrollo de esta enfermedad.

La importancia del estudio de *TYMS* también estriba en que la enzima codificada por este gen es inhibida por análogos químicos de nucleótidos o folatos en el tratamiento de padecimientos tales como cáncer de colon (Bertino, 1997). Uno de los fármacos más frecuentemente empleados es el 5-fluorouracilo, el cual es un potente inhibidor de la TS y que ha demostrado en diversos estudios (Yawata et al, 2005; Jakobsen et al, 2005; Lecomte et al, 2004; Tsuji et al, 2003; Pullarkat et al, 2001; Villafranca et al, 2001) que su actividad depende en gran medida del número de repetidos de 28 pb en tándem con los que cuenta el gen *TYMS*, ya que a mayor número de repetidos, mayor será la expresión de la enzima TS, por lo que el tratamiento con fármacos tendrá una respuesta diferente para cada genotipo, siendo menor la respuesta en aquel caso en el que *TYMS* sea homocigoto para tres repetidos debido a que el fármaco será metabolizado rápidamente sin que éste alcance la dosis efectiva dentro del organismo. Es importante aquí hacer dos precisiones, la primera de ellas estriba en que es necesario esclarecer el SNP en el segundo repetido de la variante 3, ya que si se es homocigoto 3G/3G, la actividad de la TS será muy similar a la de la enzima codificada por el homocigoto para dos repetidos, por lo que la respuesta a tratamientos farmacológicos variará significativamente del homocigoto 3C/3C (Yawata 2005). La segunda precisión que debe hacerse es que debido al bajo número de sujetos con genotipos “raros” no ha sido posible esclarecer qué tanto

pueden influir los alelos de más de tres repetidos en el tratamiento y expresión de la enzima TS, sin embargo se cree que este tipo de alelos deben tener una respuesta menor al tratamiento comparada con los homocigotos 2/2 (Mrsh et al, 2000).

Para el polimorfismo estudiado de dihidrofolato reductasa, se analizaron 300 individuos sanos del banco de sangre del INCMNSZ, obteniendo frecuencias de 13.00%, 49.67% y 37.33% para los genotipos 1/1, 1/2 y 2/2 respectivamente. Los datos con los que se cuenta en la literatura son reducidos (Jonson et al, 2004, 2005; Gellekink et al, 2006), por lo que este trabajo puede cooperar a incrementar la información en este rubro de la que se tiene disponible.

Se ha reportado que el polimorfismo consistente en una delección de 19pb en el intrón 1 de *DHFR* constituye un riesgo para defectos del tubo neural (Johnson y colaboradores, 2004), y se ha sugerido que puede ser un factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Gellekink et al, 2006), por lo que si esta información es corroborada en otros estudios, la población mestiza mexicana podría estar en riesgo debido a la frecuencia de 37.33% del homocigoto mutante, que es superior a la encontrada en población caucásica americana (17%) y la caucásica holandesa (20%). Asimismo, de ser confirmada una relación entre este polimorfismo y el desarrollo de patologías, es importante insistir en la suplementación de ácido fólico en mujeres embarazadas, sobre todo en aquellos casos en los que se es homocigoto para la delección de 19 pb lo que sin duda ayudaría a prevenir nacimientos de hijos con defectos del tubo neural (Johnson et al, 2004).

La importancia de caracterizar la variante alélica de *DHFR* se debe a que la enzima que codifica este gen es el blanco terapéutico del tratamiento en algunos padecimientos como el cáncer, ya que se ha descrito que la enzima dihidrofolato reductasa constituye una parte importante en el ciclo de los folatos. Un análogo del ácido fólico es el metrotexate, que actúa como inhibidor competitivo de la *DHFR*, y que se ha utilizado como fármaco anti-cáncer durante los últimos 50 años (Kamen, 1997).

El gen *DHFR* está estrechamente relacionado con el gen *TYMS*, ya que la enzima timidilato sintetasa provee el dihidrofolato que reducirá la *DHFR* a tetrahidrofolato en el ciclo del ácido fólico. Al realizar el análisis comparativo de la distribución de las variantes genotípicas y alélicas entre diversas poblaciones con respecto a la mexicana, se encontró que para los repetidos en TS, la distribución de los genotipos difiere significativamente de las poblaciones keniana, caucásica americana y caucásica británica reportadas por Marsh y colaboradores en el año 2000, así como también de la población china reportada por Zhai y colaboradores en el 2006. Lo anterior es un indicativo que la población mexicana mestiza cuenta con una distribución genotípica independiente de estas poblaciones, probablemente debido al origen étnico por lo que sería útil e interesante realizar este estudio en otras poblaciones relacionadas con la mexicana y principalmente, en grupos indígenas del país.

En el caso de *DHFR*, existen pocos estudios publicados hasta la fecha en donde se caracterice a la variante alélica del 19pb, sin embargo el análisis comparativo también se efectuó destacando que la población mexicana es diferente en su genotipo a las población estadounidense (Johnson et al, 2004) y

caucásica holandesa (Gellekink et al, 2006). En este rubro, es importante destacar la elevada frecuencia del alelo deletado, ya que esta variante es la más frecuente en la población mexicana mestiza, mientras que en las otras dos poblaciones referidas, este alelo no es tan común.

En este estudio también se analizó la influencia del genotipo para *TYMS* sobre los niveles de diversos metabolitos del ciclo de los folatos (homocisteína, folatos y vitamina B12). Como se puede observar en las tablas expuestas en la sección de resultados, la distribución alélica de las variantes estudiadas no presenta diferencias significativas en su distribución de acuerdo al sexo estudiado.

Uno de los resultados que llaman la atención, es la diferencia estadística existente entre los niveles de homocisteína entre hombres y mujeres, siendo los primeros aquellos que cuentan con los valores más altos. Esta diferencia era esperada, ya que existen diversos reportes que indican esta diferencia en la concentración sérica del metabolito, (Ho CH, 2000; Sassi et al, 2002) en donde se refiere que esta diferencia en los niveles de homocisteína pudiera estar propiciada por la mayor cantidad de estrógenos presentes en las mujeres. Sassi y colaboradores (2002) describen que los estrógenos parecen tener un efecto sobre regulador en la enzima hepática betaína homocisteína metiltransferasa, otra vía que participa en la remetilación de Hcy, la cual puede provocar un descenso en los niveles de Hcy en las mujeres.

De acuerdo al genotipo y al sexo, se realizó un análisis comparativo en cuanto a los niveles de homocisteína, folatos y vitamina B12. Para *TYMS* no se encontró correlación alguna entre el genotipo y los niveles de estos metabolitos, sin embargo, destacó que el genotipo 2/3C en mujeres tuviera la mayor cantidad

de homocisteína de todos los genotipos, y difiriera significativamente de todos ellos (exceptuando a 3C/3C), sin embargo, aquí se deben hacer varias consideraciones, en las que se tome en cuenta el genotipo para *MTHFR* (no caracterizado en este estudio), y sobre todo, el limitado número de individuos para realizar el análisis estadístico, ya que si bien el genotipo 2/3C fue frecuente, las mujeres que contaban con él y que contaban con valores de metabolito eran 34, mientras que en la mayoría de los otros genotipos, el número de individuos no excedía a 30. Por ello, las diferencias significativas encontradas en este estudio podrían estar sujetas a este último aspecto, lo cual debe ser corroborado con una muestra con mayor número de individuos.

En el caso de los hombres, tampoco existió correlación alguna entre el genotipo y los niveles de algún metabolito, que si bien existen diferencias significativas entre algunos genotipos para determinados metabolitos, no se pueden explicar por el genotipo.

También debe destacarse que si bien TS interviene en una parte del ciclo de los folatos, la acción principal de la enzima se da en la síntesis del ADN. Trinh y colaboradores publicaron en el año 2002 un artículo en donde mencionaban que el genotipo 3/3 en población china de Singapur se asocia a niveles plasmáticos reducidos de folato y con Hcy elevada, y que esta asociación es independiente de genotipo para *MTHFR*. Sin embargo, dos años más tarde Brown y colaboradores publican un artículo en donde destacan que no existe una asociación entre las variantes alélicas de repetidos en *TYMS* y los niveles de Hcy en individuos del noroeste de Europa (Norte de Irlanda). Esta disparidad en los resultados, explican los autores, puede deberse al origen étnico y la ingesta de folatos en la dieta, ya

que el folato ayuda a disminuir los niveles de Hcy. Además, es importante mencionar la elevada frecuencia del alelo de 3 repetidos en población china, y la baja proporción del genotipo 2/2 en esta misma, lo cual, al limitar el número de individuos pudo condicionar en la población china un resultado significativo que al aumentar el número de personas comparadas pudiera desaparecer.

De acuerdo a lo anterior, no existe evidencia clara de que las variantes para *TYMS* influyan en los niveles de Hcy, sin embargo no se ha publicado ningún reporte que considere el SNP G→C en el tercer repetido. En este estudio, aún incluyendo el SNP, no se observó ninguna tendencia que indique que algún alelo influya en mayor o en menor medida al incremento o descenso de los niveles de homocisteína en plasma.

En el caso de la *DHFR* se encontró que de acuerdo al genotipo en mujeres existe una tendencia en los valores de Hcy, ya que el genotipo silvestre (1/1) presenta los menores, mientras que en los individuos con las variantes heterocigota y homocigota mutante (1/2 y 2/2) se observan los valores intermedios y más altos respectivamente. Por lo tanto, el alelo deletado aparentemente es el responsable del aumento de niveles de Hcy. Asimismo, y en correspondencia con lo anterior, los niveles de folatos y vitamina B12 presentan la relación inversa (genotipo 1/1 mayor nivel plasmático de estos metabolitos y genotipo 2/2 menor nivel), lo que podría explicar la tendencia anteriormente mencionada. Por ello, sería importante determinar en otros estudios esta asociación.

Es importante considerar que en 2006, Gellekink y colaboradores estudiaron la variante alélica del 19pb con relación a la homocisteína en plasma en una muestra de población caucásica holandesa. Estos autores no encontraron la misma relación que se presenta en esta tesis, por el contrario, reportan que el genotipo 2/2 presenta los niveles más bajos de este metabolito. Estas diferencias pueden deberse a que en el estudio reportado no se divide al grupo estudiado entre hombres y mujeres, sino que consideran una media general, mientras que en este trabajo de tesis se divide a los grupos por sexo.

Una de las variantes alélicas que no fue considerada en este estudio es el cambio de una citosina por una timina en la posición 677 del gen *MTHFR*, la cual ha presentado en estudios de asociación un aumento en los niveles de Hcy si se es homocigoto mutante (677TT), por lo cual, sería importante establecer si los grupos caracterizados en el presente estudio están compuestos mayoritariamente de este genotipo, y entonces es éste el que confiere los niveles de Hcy elevados, y no propiamente el genotipo caracterizado, ya que la frecuencia del genotipo 677TT en población mexicana es de 34.8% según Mutchinick y colaboradores (1999).

## 9. CONCLUSIONES

- Se cumplió con el objetivo general al determinar las frecuencias de las variantes alélicas en *TYMS* y *DHFR* en la población mestiza mexicana, así como relacionar a las variantes con los niveles plasmáticos de Hcy, folatos y vitamina B12.
- La caracterización de variantes alélicas de diversos genes es un instrumento eficaz que nos permite conocer con mayor detalle las características genéticas de una población determinada, lo cual puede redundar en la utilización de este método para determinar una probable respuesta a tratamientos farmacológicos, o la susceptibilidad de un grupo étnico para desarrollar una patología determinada.
- Es importante señalar que no se encontraron individuos del sexo femenino con el genotipo 2/9 para *TYMS*, sin embargo esto puede deberse a que la frecuencia obtenida para este genotipo en el grupo de estudio es muy baja, además de ser catalogado este genotipo como “raro” por lo que se requiere aumentar el tamaño de muestra.
- Es necesario continuar con los estudios de caracterización de variantes alélicas en otro tipo de poblaciones, la caracterización en población indígena podría ser útil a fin de determinar las características genéticas de estas variantes que se han heredado de estas etnias a través del proceso de mestizaje.

- No existe relación entre el genotipo para *TYMS* y los niveles plasmáticos de homocisteína, folatos y vitamina B12 en la población mexicana mestiza.
- El alelo 2 de la variante del 19pb de *DHFR* aparentemente influye en los niveles elevados de Hcy en plasma de la población mexicana mestiza.
- La hipótesis del trabajo no se confirma debido a que aún cuando existe una frecuencia alélica mayor al 50% de las variantes mutantes para *TYMS* (alelo 3) y *DHFR* (alelo 2) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas relacionadas a los niveles plasmáticos de Hcy, folatos y vitamina B12.
- Los resultados de este estudio genético pueden utilizarse como referencia para las frecuencias de los polimorfismos estudiados de *TYMS* y *DHFR* en la población mexicana mestiza.

## 10. PERSPECTIVAS

- Sería interesante realizar el estudio actual en grupos de riesgo que presenten patologías como cáncer, defectos de tubo neural, entre otros, debido a que la frecuencia de los genotipos mutantes en *TYMS* y *DHFR* en la población mexicana estudiada es mayor al 15%, por lo tanto, de acuerdo a la literatura, esta frecuencia constituye un riesgo para el padecimiento de las enfermedades mencionadas.
- Podría realizarse un estudio complementario en el cual se efectuara la medición del impacto que tienen las variantes alélicas analizadas sobre la enzima para la cual codifican los genes *TYMS* y *DHFR*.
- Un estudio que englobe a una mayor cantidad de las enzimas involucradas en la ruta de los folatos sería importante y de gran utilidad a fin de lograr un mayor esclarecimiento de la funcionalidad de cada gen o sus polimorfismos implicados en el ciclo del ácido fólico, así como su aportación individual en una población determinada.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Anagnou NP, Antonarakis SE, O'Brien SJ, Modi WS, Nienhuis AW. *Chromosomal localization and racial distribution of the polymorphic human dihydrofolate reductase pseudogene (DHFRP1)*. Am J Hum Genet. 1988 Feb;42(2):345-52.
- 2) Anagnou NP, O'Brien SJ, Shimada T, Nash WG, Chen MJ, Nienhuis AW. *Chromosomal organization of the human dihydrofolate reductase genes: dispersion, selective amplification, and a novel form of polymorphism*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Aug;81(16):5170-4.
- 3) Bertino JR, Banerjee D. *Is the measurement of thymidylate synthase to determine suitability for treatment with 5-fluoropyrimidines ready for prime time?* Clin Cancer Res. 2003 Apr;9(4):1235-9.
- 4) Brosnan JT, Jacobs RL, Stead LM, Brosnan ME. *Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism*. Acta Biochim Pol. 2004;51(2):405-13.
- 5) Brown KS, Kluijtmans LA, Young IS, McNulty H, Mitchell LE, Yarnell JW, Woodside JV, Boreham CA, McMaster D, Murray L, Strain JJ, Whitehead AS. *The thymidylate synthase tandem repeat polymorphism is not associated with homocysteine concentrations in healthy young subjects*. Hum Genet. 2004 Jan;114(2):182-5.
- 6) Chen J, Kyte C, Chan W, Wetmur JG, Fuchs CS, Giovannucci E. *Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region and*

- risk of colorectal adenomas. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2004 Dec;13(12):2247-50.*
- 7)** Clark IM, Rowan AD, Edwards DR, Bech-Hansen T, Mann DA, Bahr MJ, Cawston TE. *Transcriptional activity of the human tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) gene in fibroblasts involves elements in the promoter, exon 1 and intron 1. Biochem J. 1997 Jun 1;324 ( Pt 2):611-7.*
  - 8)** Corre S, Galibert MD. *USF as a key regulatory element of gene expression. Med Sci (Paris). 2006 Jan;22(1):62-7.*
  - 9)** Eskes TK. *Possible basis for primary prevention of birth defects with folic acid. Fetal Diagn Ther. 1994 May-Jun;9(3):149-54.*
  - 10)** Gellekink H, Blom HJ, van der Linden IJ, den Heijer M. *Molecular genetic analysis of the human dihydrofolate reductase gene: relation with plasma total homocysteine, serum and red blood cell folate levels. Eur J Hum Genet. 2007 Jan;15(1):103-9.*
  - 11)** Glusker JP. *Vitamin B12 and the B12 coenzymes. Vitam Horm. 1995;50:1-76.*
  - 12)** Gos M Jr, Szpecht-Potocka A. *Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. J Appl Genet. 2002;43(4):511-24.*
  - 13)** 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, Guiland 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 Mar;83(3):701-7.

- 14) Guerin SL, Leclerc S, Verreault H, Labrie F, Luu-The V. *Overlapping cis-acting elements located in the first intron of the gene for type I 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase modulate its transcriptional activity.* Mol Endocrinol. 1995 Nov;9(11):1583-97.
- 15) Hishida A, Matsuo K, Hamajima N, Ito H, Ogura M, Kagami Y, Taji H, Morishima Y, Emi N, Tajima K. *Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma.* Haematologica. 2003 Feb;88(2):159-66.
- 16) Ho CH. *The influence of age, sex, vitamin B(12), folate levels and methylenetetrahydrofolate reductase C677T genetic mutations on plasma homocysteine in the Chinese population.* Haematologica. 2000 Oct;85(10):1051-4.
- 17) Hol FA, van der Put NM, Geurds MP, Heil SG, Trijbels FJ, Hamel BC, Mariman EC, Blom HJ. *Molecular genetic analysis of the gene encoding the trifunctional enzyme MTHFD (methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase, methenyltetrahydrofolate-cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase) in patients with neural tube defects.* Clin Genet. 1998 Feb;53(2):119-25.
- 18) Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. *Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase.* Cell Struct Funct. 1995 Jun;20(3):191-7.

- 19)** Iacopetta B, Grieu F, Joseph D, Elsaleh H. *A polymorphism in the enhancer region of the thymidylate synthase promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil.* Br J Cancer. 2001 Sep 14;85(6):827-30.
- 20)** Johnson WG, Scholl TO, Spychala JR, Buyske S, Stenroos ES, Chen X. *Common dihydrofolate reductase 19-base pair deletion allele: a novel risk factor for preterm delivery.* Am J Clin Nutr. 2005 Mar;81(3):664-8.
- 21)** Johnson WG, Stenroos ES, Spychala JR, Chatkupt S, Ming SX, Buyske S. *New 19 bp deletion polymorphism in intron-1 of dihydrofolate reductase (DHFR): a risk factor for spina bifida acting in mothers during pregnancy?* Am J Med Genet A. 2004 Feb 1;124(4):339-45.
- 22)** Kamen B. *Folate and antifolate pharmacology.* Semin Oncol. 1997 Oct;24(5 Suppl 18):S18-30-S18-39.
- 23)** Kawakami K, Graziano F, Watanabe G, Ruzzo A, Santini D, Catalano V, Bissoni R, Arduini F, Bearzi I, Cascinu S, Mureto P, Perrone G, Rabitti C, Giustini L, Tonini G, Pizzagalli F, Magnani M. *Prognostic role of thymidylate synthase polymorphisms in gastric cancer patients treated with surgery and adjuvant chemotherapy.* Clin Cancer Res. 2005 May 15;11(10):3778-83.
- 24)** Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, Omura K, Watanabe G, Danenberg PV. *Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression.* Clin Cancer Res. 2001 Dec;7(12):4096-101.

- 25)** Kawakami K, Watanabe G. *Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene*. *Cancer Res*. 2003 Sep 15;63(18):6004-7.
- 26)** Kisliuk, Roy (January 2005). *Thymidylate Synthesis*. En: Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester <http://www.els.net/> [doi: 10.1038/npg.els.0003923]
- 27)** Krajinovic M, Costea I, Chiasson S. *Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia*. *Lancet*. 2002 Mar 23;359(9311):1033-4.
- 28)** Lecomte T, Ferraz JM, Zinzindohoue F, Lorient MA, Tregouet DA, Landi B, Berger A, Cugnenc PH, Jian R, Beaune P, Laurent-Puig P. *Thymidylate synthase gene polymorphism predicts toxicity in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil-based chemotherapy*. *Clin Cancer Res*. 2004 Sep 1;10(17):5880-8.
- 29)** Lehninger, A. L. *Bioquímica*. 2ª ed. Editorial Omega, Barcelona, 1994
- 30)** Lightfoot TJ, Skibola CF, Willett EV, Skibola DR, Allan JM, Coppede F, Adamson PJ, Morgan GJ, Roman E, Smith MT. *Risk of non-Hodgkin lymphoma associated with polymorphisms in folate-metabolizing genes*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Dec;14(12):2999-3003.
- 31)** Liu J, Schmitz JC, Lin X, Tai N, Yan W, Farrell M, Bailly M, Chen T, Chu E. *Thymidylate synthase as a translational regulator of cellular gene expression*. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Jul 18;1587(2-3):174-82.
- 32)** Luo HR, Lu XM, Yao YG, Horie N, Takeishi K, Jorde LB, Zhang YP. *Length polymorphism of thymidylate synthase regulatory region in Chinese*

- populations and evolution of the novel alleles.* Biochem Genet. 2002 Feb;40(1-2):41-51
- 33)** Malerba M, Gisondi P, Radaeli A, Sala R, Calzavara Pinton PG, Girolomoni G. *Plasma homocysteine and folate levels in patients with chronic plaque psoriasis.* Br J Dermatol. 2006 Dec;155(6):1165-9.
- 34)** Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz HJ, Ladner RD. *A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity.* Cancer Res. 2003 Jun 1;63(11):2898-904.
- 35)** Marsh S, Ameyaw MM, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, McLeod HL. *Novel thymidylate synthase enhancer region alleles in African populations.* Hum Mutat. 2000 Dec;16(6):528.
- 36)** Marsh S, Collie-Duguid ES, Li T, Liu X, McLeod HL. *Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations.* Genomics. 1999 Jun 15;58(3):310-2.
- 37)** Marsh S. *Thymidylate synthase pharmacogenetics.* Invest New Drugs. 2005 Dec;23(6):533-7.
- 38)** Mutchinick OM, Lopez MA, Luna L, Waxman J, Babinsky VE. *High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects.* Mol Genet Metab. 1999 Dec;68(4):461-7.
- 39)** Myllykallio H, Leduc D, Filee J, Liebl U. *Life without dihydrofolate reductase FoIA.* Trends Microbiol. 2003 May;11(5):220-3.

- 40)** Nelson, D.L., Cox, M.M., *Lehninger. Principios de Bioquímica*. 3<sup>a</sup> ed. Editorial Omega, Barcelona, 2001
- 41)** Oterino A, Valle N, Pascual J, Bravo Y, Munoz P, Castillo J, Ruiz-Alegria C, Sanchez-Velasco P, Leyva-Cobian F, Cid C. *Thymidylate synthase promoter tandem repeat and MTHFD1 R653Q polymorphisms modulate the risk for migraine conferred by the MTHFR T677 allele*. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005 Sep 13;139(1):163-8.
- 42)** Papamichael D. *The use of thymidylate synthase inhibitors in the treatment of advanced colorectal cancer: current status*. *Stem Cells*. 2000;18(3):166-75.
- 43)** Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, Warren R, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ. *Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy*. *Pharmacogenomics J*. 2001;1(1):65-70.
- 44)** Rod TH, Radkiewicz JL, Brooks CL 3rd. *Correlated motion and the effect of distal mutations in dihydrofolate reductase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 10;100(12):6980-5.
- 45)** Sarbia M, Stahl M, von Weyhern C, Weirich G, Puhlinger-Oppermann F. *The prognostic significance of genetic polymorphisms (Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T, Methionine Synthase A2756G, Thymidilate Synthase tandem repeat polymorphism) in multimodally treated oesophageal squamous cell carcinoma*. *Br J Cancer*. 2006 Jan 30;94(2):203-7.

- 46)** Sassi S, Cosmi B, Palareti G, Legnani C, Grossi G, Musolesi S, Coccheri S. *Influence of age, sex and vitamin status on fasting and post-methionine load plasma homocysteine levels.* Haematologica. 2002 Sep;87(9):957-64.
- 47)** Shi Q, Zhang Z, Neumann AS, Li G, Spitz MR, Wei Q. *Case-control analysis of thymidylate synthase polymorphisms and risk of lung cancer.* Carcinogenesis. 2005 Mar;26(3):649-56.
- 48)** Skibola CF, Forrest MS, Coppede F, Agana L, Hubbard A, Smith MT, Bracci PM, Holly EA. *Polymorphisms and haplotypes in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma.* Blood. 2004 Oct 1;104(7):2155-62.
- 49)** Tamura T, Picciano MF. *Folate and human reproduction.* Am J Clin Nutr. 2006 May;83(5):993-1016. Review.
- 50)** Tan W, Miao X, Wang L, Yu C, Xiong P, Liang G, Sun T, Zhou Y, Zhang X, Li H, Lin D. *Significant increase in risk of gastroesophageal cancer is associated with interaction between promoter polymorphisms in thymidylate synthase and serum folate status.* Carcinogenesis. 2005 Aug;26(8):1430-5.
- 51)** Trinh BN, Ong CN, Coetzee GA, Yu MC, Laird PW. *Thymidylate synthase: a novel genetic determinant of plasma homocysteine and folate levels.* Hum Genet. 2002 Sep;111(3):299-302.
- 52)** Uchida K, Hayashi K, Kawakami K, Schneider S, Yochim JM, Kuramochi H, Takasaki K, Danenberg KD, Danenberg PV. *Loss of heterozygosity at the thymidylate synthase (TS) locus on chromosome 18 affects tumor response and survival in individuals heterozygous for a 28-bp polymorphism in the TS gene.* Clin Cancer Res. 2004 Jan 15;10(2):433-9.

- 53)** Ulrich CM, Bigler J, Velicer CM, Greene EA, Farin FM, Potter JD. *Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000 Dec;9(12):1381-5.
- 54)** Villafranca E, Okruzhnov Y, Dominguez MA, Garcia-Foncillas J, Azinovic I, Martinez E, Illarramendi JJ, Arias F, Martinez Monge R, Salgado E, Angeletti S, Brugarolas A. *Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer.* J Clin Oncol. 2001 Mar 15;19(6):1779-86.
- 55)** Volcik KA, Shaw GM, Zhu H, Lammer EJ, Laurent C, Finnell RH. *Associations between polymorphisms within the thymidylate synthase gene and spina bifida.* Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2003 Nov;67(11):924-8.
- 56)** Wilding CS, Relton CL, Sutton MJ, Jonas PA, Lynch SA, Tawn EJ, Burn J. *Thymidylate synthase repeat polymorphisms and risk of neural tube defects in a population from the northern United Kingdom.* Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2004 Jul;70(7):483-5.
- 57)** Yawata A, Kim SR, Miyajima A, Kubo T, Ishida S, Saito Y, Nakajima Y, Katori N, Matsumoto Y, Fukuoka M, Ohno Y, Ozawa S, Sawada J. *Polymorphic tandem repeat sequences of the thymidylate synthase gene correlates with cellular-based sensitivity to fluoropyrimidine antitumor agents.* Cancer Chemother Pharmacol. 2005 Nov;56(5):465-72.

- 58)** Zhai X, Gao J, Hu Z, Tang J, Qin J, Wang S, Wang X, Jin G, Liu J, Chen W, Chen F, Wang X, Wei Q, Shen H. *Polymorphisms in thymidylate synthase gene and susceptibility to breast cancer in a Chinese population: a case-control analysis*. BMC Cancer. 2006 May 25;6:138.
- 59)** Zhang J, Cui Y, Kuang G, Li Y, Wang N, Wang R, Guo W, Wen D, Wei L, Yu F, Wang S. *Association of the thymidylate synthase polymorphisms with esophageal squamous cell carcinoma and gastric cardiac adenocarcinoma*. Carcinogenesis. 2004 Dec;25(12):2479-85.
- 60)** Zhang YW, Luo HR, Ryder OA, Zhang YP. *Evolution of the tandem repeats in thymidylate synthase enhancer region (TSER) in primates*. Gene. 2004 Aug 18;338(1):47-54.
- 61)** Zhang Z, Shi Q, Sturgis EM, Spitz MR, Hong WK, Wei Q. *Thymidylate synthase 5'- and 3'-untranslated region polymorphisms associated with risk and progression of squamous cell carcinoma of the head and neck*. Clin Cancer Res. 2004 Dec 1;10(23):7903-10.
- 62)** Zhang Z, Xu Y, Zhou J, Wang X, Wang L, Hu X, Guo J, Wei Q, Shen H. *Polymorphisms of thymidylate synthase in the 5'- and 3'-untranslated regions associated with risk of gastric cancer in South China: a case-control analysis*. Carcinogenesis. 2005 Oct; 26(10):1764-9.

**ANEXOS**

## ANEXO I. Cálculos para la obtención de frecuencias genotípica y alélica y equilibrio de Hardy-Weinberg

- **Frecuencia genotípica:**

$$\left( \frac{\# \text{ individuos con el genotipo analizado}}{\# \text{ total de individuos analizados}} \right) * 100 = \% \text{ del genotipo}$$

- **Ejemplo de cálculo para de frecuencia genotípica en DHFR**

- **Genotipo 1/1**

$$(39 / 300) * 100 = 13.00 \%$$

- **Genotipo 1/2**

$$(149 / 300) * 100 = 49.67 \%$$

- **Genotipo 2/2**

$$(112 / 300) * 100 = 37.33 \%$$

- **Frecuencia alélica:**

$$\# \text{ total de alelos} = \# \text{ total individuos analizados} * 2$$

$$\# \text{ de alelo N} = (\# \text{ individuos homocigotos para el alelo} * 2) + \# \text{ heterocigotos}$$

$$\left( \frac{\# \text{ individuos con el alelo analizado}}{\# \text{ total de alelos analizados}} \right) * 100 = \% \text{ del alelo}$$

- **Ejemplo de cálculo para de frecuencia alélica en DHFR**

- **Alelo 1**

Total de alelo 1

$$(39 * 2) + 149 = 227$$

Frecuencia alélica

$$(227 / 600) * 100 = 37.83 \%$$

- **Alelo 2**

Total de alelo 2

$$(112 * 2) + 149 = 373$$

Frecuencia alélica

$$(373 / 600) * 100 = 62.17 \%$$

- **Equilibrio de Hardy-Weinberg:**

- **Frecuencias esperadas**

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

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

**Donde**

**p**= Frecuencia del alelo silvestre

**q**= Frecuencia del alelo mutante

**p<sup>2</sup>\*N**= # esperado de homocigotos silvestres

**2pq\*N**= # esperado de heterocigotos

**q<sup>2</sup>\*N**= # esperado de homocigotos mutantes

**N**= número de individuos de la muestra

- **Ejemplo de cálculo para de frecuencia esperada en DHFR**

**Total**

**p**= Frecuencia del alelo silvestre (1) = **0.3783**

**q**= Frecuencia del alelo mutante (2) = **0.6217**

$$p^2 = (0.3783)^2 = \mathbf{0.1431}$$

$$2pq = 2 (0.3783) (0.6217) = \mathbf{0.4704}$$

$$q^2 = (0.6217)^2 = \mathbf{0.3865}$$

$$p^2 (300) = (0.3783)^2 (300) = \mathbf{42.94} \text{ (genotipo 1/1)}$$

$$2pq (300) = 2 (0.3783) (0.6217) (300) = \mathbf{141.12} \text{ (genotipo 1/2)}$$

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

- Cálculo de  $\chi^2$

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

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

$$\chi^2 = 0.9358$$

$$\chi^2 \text{ de tablas} = p > 0.05$$

- **Ejemplo de cálculo para de frecuencia esperada en TS**

- **Frecuencias esperadas**

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

$$p^2 + q^2 + r^2 + s^2 + 2pq + 2pr + 2ps + 2qr + 2rs = 1$$

**Donde**

**p**= Frecuencia del alelo 2

**q**= Frecuencia del alelo 3G

**r**= Frecuencia del alelo 3C

**s**= Frecuencia de otros alelos

**p<sup>2</sup>\*N**= # esperado de genotipo 2/2

**q<sup>2</sup>\*N**= # esperado de genotipo 3G/3G

**r<sup>2</sup>\*N**= # esperado de genotipo 3C/3C

**2pq\*N**= # esperado de genotipo 2/3G

**2pr\*N**= # esperado de genotipo 2/3C

**2qr\*N**= # esperado de genotipo 3G/3C

**(2ps + 2rs + s<sup>2</sup>)\*N**= # esperado de otros genotipos

**N**= número de individuos de la muestra

**Total**

**p**= Frecuencia del alelo 2 = **0.3667**

**q**= Frecuencia del alelo 3G = **0.2533**

**r**= Frecuencia del alelo 3C = **0.3500**

**s**= Frecuencia de otros alelos = **0.0300**

$$p^2 = (0.3667)^2 = 0.1345$$

$$2pq = 2 (0.3667) (0.2533) = \mathbf{0.1858}$$

$$2pr = 2 (0.3667) (0.3500) = \mathbf{0.2567}$$

$$q^2 = (0.2533)^2 = \mathbf{0.0642}$$

$$2qr = 2 (0.2533) (0.3500) = \mathbf{0.1773}$$

$$r^2 = (0.3500)^2 = \mathbf{0.1225}$$

$$(2ps + 2rs + s^2) = \mathbf{0.0590}$$

$$p^2 (300) = (0.3667)^2 (300) = \mathbf{40.33} \text{ (genotipo 2/2)}$$

$$2pq (300) = 2 (0.3667) (0.2533) (300) = \mathbf{55.73} \text{ (genotipo 2/3G)}$$

$$2pr (300) = 2 (0.3667) (0.3500) (300) = \mathbf{77.00} \text{ (genotipo 2/3C)}$$

$$q^2 (300) = (0.2533)^2 (300) = \mathbf{19.25} \text{ (genotipo 3G/3G)}$$

$$2qr (300) = 2 (0.2533) (0.3500) (300) = \mathbf{53.20} \text{ (genotipo 2/3C)}$$

$$r^2 (300) = (0.3500)^2 (300) = \mathbf{36.75} \text{ (genotipo 3C/3C)}$$

$$(2ps + 2rs + s^2) (300) = (0.0590) (300) = \mathbf{17.73} \text{ (Otros genotipos)}$$

○ Cálculo de  $\chi^2$

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

$$\chi^2 = ((31 - 40.33)^2 / 40.33) + ((62 - 55.73)^2 / 55.73) + ((96 - 77.00)^2 / 77.00) + ((22 - 19.25)^2 / 19.25) + ((46 - 53.20)^2 / 53.20) + ((34 - 36.75)^2 / 36.75) + ((9 - 17.73)^2 / 17.73)$$

$$\chi^2 = \mathbf{13.4233}$$

$$\chi^2 \text{ de tablas} = \mathbf{p < 0.005}$$

## ANEXO II. Listado descriptivo de las muestras empleadas en el estudio

Código	Sexo	Edad	TS SNP en 3R (G→C)	DHFR	Homocisteína (μmol/L)	Folatos (ng/mL)	Vitamina B12 (pg/mL)
BS001	M	54	3G/3C	1/2	9.88	7.68	4743.83
BS002	M	40	2/3C	1/2	9.76	6.53	211.44
BS003	F	40	3C/4	1/2	23.22	2.82	306.32
BS004	M	23	3G/3C	2/2	8.06	4.24	107.08
BS005	M	21	2/3G	1/2	8.62	6.44	195.17
BS007	F	45	3G/3C	1/2	7.03	5.08	273.79
BS008	M	38	2/3G	2/2	10.53	6.84	437.79
BS009	M	21	3C/3C	1/2	84.75	2.30	111.14
BS011	F	27	2/3C	1/2	7.20	6.89	544.86
BS012	F	20	2/3C	1/1	8.25	7.19	528.60
BS013	F	43	2/2	1/2	9.46	8.96	306.32
BS014	M	26	3G/3C	1/2	11.92	10.77	177.55
BS015	F	20	2/3C	1/2	4.97	5.78	310.38
BS016	M	21	2/2	1/2	11.64	8.17	626.19
BS017	M	36	2/3G	1/2	10.20	8.34	807.81
BS018	M	30	2/3C	1/2	11.84	8.30	239.90
BS019	M	30	3C/3C	1/2	12.90	5.61	333.42
BS020	F	24	3G/3G	1/2	8.89	6.00	388.99
BS021	M	28	2/3C	1/2	14.00	5.21	630.25
BS022	M	22	2/3C	1/2	14.2	4.46	439.14
BS023	M	46	2/2	1/2	13.49	4.99	112.50
BS024	M	30	3G/3G	1/2	16.74	3.31	120.63
BS025	F	30	3G/3C	1/2	7.63	9.31	128.76
BS026	M	32	3G/3C	1/2	9.18	6.62	326.65
BS027	M	37	2/3G	1/2	15.58	3.88	1702.36
BS028	M	57	2/3G	1/2	16.31	9.09	505.56
BS029	M	43	2/3C	1/2	12.18	7.19	280.56
BS030	M	31	3G/3C	1/2	10.30	5.03	315.80
BS031	M	41	2/3G	1/2	12.30	10.68	1646.79
BS032	F	41	2/3G	1/2	11.15	3.84	115.21
BS033	M	20	3C/3C	1/2	14.79	8.08	368.66
BS034	M	42	3G/3G	1/2	13.35	12.93	355.11
BS036	M	36	2/3C	1/2	13.76	3.35	508.27
BS037	F	30	2/3G	1/2	16.59	3.53	398.48
BS038	M	43	2/3C	1/2	17.66	5.47	153.16
BS039	F	39	2/2	1/2	11.76	5.78	157.22
BS040	M	41	2/3C	1/2	14.41	7.37	197.89
BS041	F	26	2/2	1/2	11.59	7.24	222.28
BS042	M	27	3G/3C	1/2	14.03	8.08	592.30
BS044	M	37	2/3C	1/2	13.66	5.25	256.17
BS045	M	23	3G/3G	1/2	10.90	5.39	351.04
BS046	M	37	2/3G	1/2	13.44	3.35	115.21
BS047	M	40	3G/3C	1/2	12.62	5.52	1156.14

Código	Sexo	Edad	TS SNP en 3R (G→C)	DHFR	Homocisteína (μmol/L)	Folatos (ng/mL)	Vitamina B12 (pg/mL)
BS048	M	30	2/3C	1/2	11.42	9.05	432.37
BS049	M	54	2/3C	1/2	14.51	13.07	295.47
BS050	F	33	2/3C	1/1	14.23	9.09	490.65
BS051	M	42	2/3G	1/2	15.89	9.00	195.17
BS052	F	20	3G/3C	1/2	9.68	12.89	418.81
BS053	M	22	2/3G	1/2	14.98	8.87	628.90
BS054	M	20	2/3C	1/2	21.88	6.58	509.62
BS055	M	19	2/3C	2/2	12.03	7.42	204.66
BS056	M	48	2/3C	1/2	15.16	10.64	2033.07
BS057	M	26	3C/3C	1/2	12.67	6.05	287.34
BS058	M	23	3G/3G	1/2	10.47	7.90	504.20
BS059	M	37	2/3C	1/2	10.10	7.11	218.22
BS060	M	25	2/3C	1/2	9.69	6.22	325.29
BS061	M	43	2/3G	2/2	24.09	3.58	145.03
BS062	M	19	3C/3C	1/2	16.02	3.40	326.65
BS063	M	52	3G/4	1/2	11.68	6.14	559.77
BS064	M	26	2/3G	1/2	7.26	5.34	840.34
BS066	F	32	2/3C	1/2	6.38	6.71	510.98
BS067	M	37	2/3C	1/2	11.98	7.46	211.44
BS068	M	42	3G/3G	1/2	12.06	8.25	448.63
BS069	M	27	3C/3C	1/2	13.54	6.36	222.28
BS071	F	35	2/3G	1/2	9.63	5.96	595.01
BS072	M	38	3G/3C	1/2	8.24	9.75	580.10
BS073	M	34	2/3G	1/2	7.16	10.68	506.91
BS074	M	26	3C/3C	1/2	11.26	4.77	635.67
BS075	M	34	3C/3C	1/2	11.00	11.79	765.79
BS076	M	36	3C/3C	1/2	9.90	7.02	799.67
BS077	M	37	3G/3C	1/2	12.80	5.47	626.19
BS078	M	54	2/3C	1/2		3.31	73.19
BS079	M	43	2/3G	1/2	23.06	7.11	638.38
BS081	M	43	3C/3C	1/2	9.01	8.03	337.49
BS082	M	23	3C/3C	1/2	13.41	4.86	126.05
BS083	F	20	2/3G	1/2	11.07	13.90	490.65
BS085	M	43	2/3G	1/2	7.04	3.71	489.29
BS086	F	30	3G/3C	1/2	13.98	12.36	520.47
BS088	M	35	2/3C	1/2	10.34	6.75	184.33
BS089	F	31	2/2	1/1	7.23	11.61	391.70
BS091	M	54	2/3G	1/2	11.18	11.04	398.48
BS092	F	40	3C/4	1/1	6.08	12.40	940.63
BS093	M	25	2/3C	1/2	10.81	3.13	506.91
BS096	M	46	3C/3C	2/2	10.38	8.70	424.23
BS097	M	36	2/3G	1/2	8.95	5.78	1721.33
BS098	M	20	3C/3C	1/2	16.27	8.25	447.28
BS099	M	50	2/3G	1/2	14.05	4.15	329.36
BS100	M	30	2/3G	1/2	16.07	3.93	371.37

Código	Sexo	Edad	TS SNP en 3R (G→C)	DHFR	Homocisteína (μmol/L)	Folatos (ng/mL)	Vitamina B12 (pg/mL)
BS101	M	25	2/3C	2/2	12.40	4.72	395.77
BS103	M	32	2/3G	1/2	21.45	4.50	151.80
BS104	M	25	2/3C	1/1	12.89	4.77	204.66
BS105	M	47	2/3C	1/2	10.83	9.53	246.68
BS106	F	32	3G/3C	1/2	8.26	7.59	1009.76
BS107	M	33	2/3C	2/2	10.23	6.67	231.77
BS108	M	22	3G/3C	1/2	17.15	3.71	220.93
BS109	F	26	2/3C	1/2	8.07	9.75	725.13
BS110	F	37	2/3C	1/2	10.61	8.70	177.55
BS111	F	18	2/3C	1/2			
BS112	F	62	2/3G	2/2	13.56	7.90	140.96
BS117	M	53	2/3C	2/2	20.16	4.41	246.68
BS119	M	34	2/3C	2/2	8.80	8.12	356.46
BS120	M	48	2/3G	2/2	9.88	15.93	1004.34
BS121	M	44	3C/4	1/2	11.86	13.68	432.37
BS122	M	21	2/2	1/2	11.56	10.64	329.36
BS123	F	20	2/3C	1/2	7.23	13.68	242.61
BS124	M	50	2/3C	1/2	10.95	10.24	182.98
BS125	M	57	3C/3C	2/2	9.10	16.29	131.47
BS126	F	51	3G/3G	2/2	7.07	39.73	864.73
BS127	M	24	2/3G	1/2	10.53	13.51	592.30
BS128	M	27	2/2	1/2	10.52	22.69	660.07
BS129	F	48	2/3G	1/2	8.10	14.30	599.08
BS130	M	32	3G/3G	2/2	8.31	5.96	359.18
BS132	M	30	2/2	1/2	10.46	20.79	483.87
BS133	F	28	2/3G	1/2	7.99	11.43	242.61
BS134	M	23	2/3G	1/2	7.98	11.48	712.93
BS135	M	23	3C/3C	1/2	6.01	18.98	657.36
BS136	M	51	2/3G	1/2	9.87	8.39	643.81
BS137	F	23	3G/3G	1/1	7.52		
BS138	F	22	2/3C	1/2	7.68	4.77	454.05
BS140	M	19	3G/3C	2/2	15.29	6.22	341.56
BS141	M	30	2/2	1/2	8.19	15.49	891.84
BS142	F	25	2/3C	1/2	7.19	14.92	868.80
BS143	M	28	3G/3G	1/2	7.36	7.46	279.21
BS144	M	32	2/3C	2/2	18.18	8.70	145.03
BS145	M	23	3G/4	1/2	10.87	2.60	229.06
BS146	M	43	3G/3G	1/2	8.69	11.12	218.22
BS147	M	29	3G/3C	1/2	6.68	15.80	590.95
BS148	M	39	2/3C	2/2	5.72	7.86	914.88
BS149	M	50	2/2	2/2	8.30	12.76	27.11
BS150	M	27	2/3C	1/2	6.13	8.87	1496.34
BS151	M	32	2/2	1/2	13.04	8.43	132.83
BS152	M	21	2/3C	1/2	11.47	8.74	147.74
BS153	F	30	3G/3G	1/2	10.98	5.25	120.63
BS154	M	34	2/3C	1/1	11.95	15.01	295.47

Código	Sexo	Edad	TS SNP en 3R (G→C)	DHFR	Homocisteína (μmol/L)	Folatos (ng/mL)	Vitamina B12 (pg/mL)
BS155	M	34	2/2	1/2	12.14	18.27	559.77
BS156	M	37	3C/3C	2/2	12.28	11.96	342.91
BS158	M	55	3G/3C	1/2	14.49	14.39	332.07
BS159	M	50	3C/3C	1/2	12.13	9.84	721.06
BS160	M	57	2/3G	1/2	10.11	9.58	1329.63
BS161	F	21	3C/3C	2/2	19.14	6.71	113.85
BS162	M	26	2/3C	1/2	25.48	5.96	126.05
BS163	F	29	3C/4	1/2	15.69	9.62	494.71
BS164	M	42	3G/3C	1/2	19.64	4.02	224.99
BS165	F	21	2/3G	1/2	18.03	5.87	60.99
BS166	M	40	2/3C	1/2	15.88	8.17	542.15
BS168	M	40	3C/4	2/2	15.25	15.54	547.57
BS169	F	46	3G/3C	1/1	9.89	9.89	646.52
BS170	F	38	2/3G	1/2	10.16	5.56	243.97
BS171	M	42	2/3G	2/2	13.15	7.81	447.28
BS172	M	51	2/3G	1/2	11.19	4.59	249.39
BS173	M	36	3G/3C	1/2	9.89	13.68	134.18
BS174	M	43	3G/3G	1/2	7.48		
BS175	F	42	2/3G	1/2	8.15	11.74	509.62
BS176	F	19	3G/3G	2/2	10.27	5.87	250.75
BS177	F	18	3G/3C	1/2	7.63	22.07	1843.32
BS178	M	34	2/3C	1/2	8.53	4.63	1916.51
BS179	M	26	2/2	1/2	9.54	2.56	4743.83
BS180	M	28	2/3G	1/2	17.33	3.88	273.79
BS181	M	37	2/3C	1/2	19.17	6.75	89.46
BS182	M	33	2/3C	1/2	13.47	8.33	584.17
BS183	M	58	3C/3C	1/2	10.37		
BS184	M	30	3C/3C	1/2	15.20	13.07	588.23
BS186	M	34	3G/3C	2/2	9.77	4.41	234.48
BS187	M	37	2/3G	1/2	10.15	4.50	322.58
BS188	M	18	2/3C	1/2	9.99	5.39	124.69
BS189	M	23	2/3C	1/2	11.99	6.84	460.83
BS190	M	29	3G/3C	1/2	9.13	8.96	468.96
BS191	F	29	3C/4	1/1	6.54	10.28	235.84
BS192	F	33	3G/3C	2/2	6.71	12.67	108.43
BS193	M	57	2/3G	1/2	10.61	4.24	210.08
BS194	F	20	2/2	1/1	12.92	5.39	295.47
BS195	F	22	3G/3C	1/2	12.61	18.58	727.84
BS196	M	22	2/3C	2/2	13.39	7.15	330.71
BS197	M	21	2/2	2/2	9.08	6.80	6776.90
BS198	M	20	3G/3C	1/1	8.53	5.39	142.31
BS199	M	34	3C/3C	1/2	7.53	17.61	477.09
BS200	M	27	2/3C	2/2	9.05	12.40	448.63
BS201	F	24	2/2	2/2	9.16	6.44	60.99
BS202	F	18	2/3C	1/2	6.15	15.67	409.32
BS203	M	32	3G/3C	1/2	4.46	8.70	2710.76

Código	Sexo	Edad	TS SNP en 3R (G→C)	DHFR	Homocisteína (μmol/L)	Folatos (ng/mL)	Vitamina B12 (pg/mL)
BS204	M	31	3C/3C	1/1	7.25	22.07	613.99
BS205	M	39	2/3C	1/1	7.52	7.95	115.21
BS206	M	56	2/3G	1/2	14.63	5.83	368.66
BS207	M	37	2/3C	2/2	8.90	13.15	303.61
BS209	F	42	3G/3G	2/2	4.86	9.45	157.22
BS210	F	55	2/3C	2/2	8.97	16.20	558.42
BS211	F	49	2/3G	2/2	11.10	6.18	338.85
BS212	F	20	2/3C	1/2	6.66	13.60	802.38
BS213	F	18	2/3G	1/1	5.51	9.98	882.35
BS214	M	49	2/3C	2/2	6.57	22.07	249.39
BS217	M	23	2/3C	1/1	9.19	7.55	359.18
BS218	F	30	3G/3C	1/2	7.78	4.50	365.95
BS219	M	38	2/2	1/2	20.47	4.50	471.67
BS220	M	28	3G/3C	1/2	9.93	8.43	570.61
BS221	F	26	2/2	1/2	10.38	5.65	485.23
BS222	M	25	2/9	2/2	9.93	13.42	531.31
BS223	F	57	2/3C	1/2	10.01	10.51	544.86
BS225	F	28	2/3C	1/2	10.77	11.48	182.98
BS226	M	32	3G/3C	2/2	8.56	3.13	246.68
BS227	F	50	2/2	1/2	8.21	6.40	177.55
BS228	F	31	2/3C	1/2	7.80	10.68	586.88
BS229	F	35	3C/3C	2/2	4.82	5.39	298.18
BS230	F	27	2/3C	2/2	6.06	14.35	246.68
BS231	M	60	3G/3C	1/2	8.23		
BS232	M	25	3G/3G	1/1	9.87	5.83	345.62
BS245	F	28	2/3C	1/2	5.50	7.55	441.85
BS248	F	33	2/2	2/2	7.81	9.75	203.31
BS249	F	59	3G/3G	1/2	11.44	6.84	2575.22
BS255	F	41	2/3C	1/2	5.32	5.21	502.85
BS263	F	59	2/2	1/1	7.32	7.15	1169.69
BS269	F	38	2/2	1/2	6.42	7.46	414.75
BS272	F	29	2/3G	1/2	7.24	15.98	176.20
BS273	F	22	2/2	1/1	5.40	17.17	313.09
BS274	F	52	2/3C	1/2	6.43	18.54	620.76
BS275	F	31	2/3G	1/1	5.49	12.71	1023.31
BS276	F	27	3G/3G	1/2	6.38	20.04	525.89
BS278	F	45	2/3C	1/2	6.67	18.01	553.00
BS279	F	39	2/3G	1/2	8.88	14.52	458.12
BS280	F	26	3G/3C	1/2	6.97	7.77	117.92
BS281	F	47	2/3C	1/1	6.65	15.98	516.40
BS282	F	49	2/3G	1/2	9.08	12.27	432.37
BS283	F	54	2/2	1/2	8.12	10.24	645.16
BS284	F	35	2/3C	2/2	5.67	7.59	328.00
BS286	F	20	3G/3G	1/2	9.59	2.82	142.31
BS288	F	31	3C/3C	1/1	5.95	14.43	403.90
BS293	F	37	2/3G	1/2	8.47	7.95	569.26

Código	Sexo	Edad	TS SNP en 3R (G→C)	DHFR	Homocisteína (μmol/L)	Folatos (ng/mL)	Vitamina B12 (pg/mL)
BS298	F	35	3G/3C	1/2	6.54	5.56	298.18
BS301	F	44	3C/3C	1/2	8.75	6.97	48.79
BS305	F	25	2/3C	1/2	10.13	9.93	1833.83
BS309	F	26	2/3C	2/2	9.11	9.23	388.99
BS315	F	39	2/3G	1/2	7.85	8.25	333.42
BS318	F	49	2/2	2/2	6.36	5.39	416.10
BS319	F	21	3G/3C	1/2	10.09	6.89	246.68
BS322	F	56	2/3C	1/1	5.90	10.86	538.09
BS328	F	33	3G/3C	1/2	9.20	7.06	196.53
BS332	F	39	3G/3G	1/2	13.22	10.28	573.33
BS340	F	35	3G/3C	1/2	11.89	10.02	323.94
BS346	F	53	2/3G	1/2	9.71		
BS352	F	32	3G/3C	1/2	5.49	5.30	302.25
BS354	F	25	2/3C	1/1	6.50	5.39	445.92
BS355	F	22	3C/3C	1/1	6.62		
BS356	F	46	2/3C	2/2	6.67	7.19	691.24
BS362	F	38	2/3C	2/2	4.82	10.68	704.80
BS366	F	32	3G/3C	1/1	7.17	16.20	840.34
BS368	F	25	2/3G	1/2	6.97	6.71	243.97
BS371	F	30	2/3C	2/2	4.83	10.20	998.92
BS372	F	39	3C/3C	2/2	5.54	9.67	454.05
BS379	F	32	2/3G	2/2	16.46	2.65	290.05
BS384	F	45	2/3C	1/2	5.40	16.51	929.79
BS390	F	35	2/3G	1/2	4.62	6.84	407.97
BS392	F	34	2/3C	2/2	10.28	12.67	1021.96
BS403	F	26	2/3G	1/2	7.08	4.50	230.41
BS404	F	27	3C/3C	2/2	10.70	7.59	84.03
BS405	F	50	2/2	1/2	8.76	7.59	841.69
BS409	M	24	2/3G	2/2			
BS410	M	27	2/3C	1/2			
BS411	F	21	3C/3C	2/2	6.44	5.34	383.57
BS413	F	31	2/3C	1/2	8.34	3.75	379.51
BS414	F	31	2/2	1/2	9.98	4.86	1873.14
BS415	F	49	2/3C	1/2	5.35	6.05	859.31
BS419	F	29	2/3G	2/2	9.30	4.28	523.18
BS420	M	28	2/3C	1/2			
BS422	M	31	2/3C	2/2			
BS423	F	37	2/2	2/2	10.62	11.30	471.67
BS424	F	50	3G/3C	1/1	15.00	5.78	216.86
BS425	F	24	3C/3C	1/2	10.04	3.66	234.48
BS426	F	50	3C/3C	1/2	10.39	7.81	184.33
BS430	F	31	2/3C	2/2	16.09	5.74	111.14
BS431	F	32	2/3G	1/1	8.30	4.46	615.34
BS434	M	42	2/3C	1/2			
BS436	F	28	2/3C	2/2			
BS439	F	23	3C/3C	1/2	8.21	6.18	478.45

<b>Código</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad</b>	<b>TS SNP en 3R (G→C)</b>	<b>DHFR</b>	<b>Homocisteína (μmol/L)</b>	<b>Folatos (ng/mL)</b>	<b>Vitamina B12 (pg/mL)</b>
BS440	F	23	2/3G	1/2	10.14	5.21	772.57
BS441	F	57	2/3G	1/2	16.08	4.02	
BS442	F	40	2/3C	1/2	13.08	2.47	437.79
BS443	F	18	2/3G	2/2	9.02	3.22	214.15
BS445	F	35	3C/3C	1/2	5.75	5.03	10843.04
BS449	F	20	2/3G	1/2	7.81	8.08	393.06
BS455	F	40	2/2	1/2	7.67	12.89	294.12
BS456	F	23	2/3C	1/2	8.30	10.51	397.13
BS476	F	17	2/2	1/2	7.38	17.92	460.83
BS478	F	44	2/3C	1/2	6.94	8.56	553.00
BS479	F	22	2/3C	1/2	6.64	10.42	490.65
BS480	F	29	3G/3C	1/2	6.41	7.77	355.11
BS481	F	29	3G/3C	1/2	8.56	6.53	317.16
BS482	F	32	2/3C	1/2	7.91	5.16	479.80
BS490	F	39	3G/3C	1/2	9.66	4.50	2168.61
BS494	F	23	3C/3C	1/2	8.74	8.21	374.08
BS496	F	36	2/3G	1/2	9.80	7.28	768.50
BS498	F	29	3G/3C	1/2	8.91	13.64	803.74
BS499	F	30	3G/3C	1/2	8.88	4.94	184.33
BS500	F	38	2/3C	1/2	8.79	10.64	2846.30
BS501	F	20	3G/3G	1/2	6.82	4.24	626.19
BS502	F	45	3G/3C	1/2	10.83	6.09	416.10
BS503	F	34	3G/3G	2/2	6.59	15.14	479.80
BS599	F	24	2/3C	1/2			
BS600	F	34	2/3C	1/2			
BS601	F	28	2/3C	2/2			
BS602	F	49	2/3C	2/2			
BS603	F	21	2/3G	1/2			

### ANEXO III. Niveles de metabolitos por genotipos y por sexo

#### TIMIDILATO SINTETASA

Hombres y Mujeres: Todos los Genotipos							
		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	250	250	245	245	245	245
	Sin Dato	50	50	55	55	55	55
Media		10.30	0.99	8.75	0.89	434.58	2.56
Mediana		9.87	0.99	7.77	0.89	388.99	2.59
DE		3.59	0.14	4.20	0.20	277.45	0.27
Varianza		12.88	0.02	17.66	0.04	76979.20	0.08
Mínimo		4.82	0.68	2.60	0.42	27.11	1.43
Máximo		24.09	1.38	22.69	1.36	1843.32	3.27
Percentilas	25	7.68	0.89	5.54	0.74	241.26	2.38
	50	9.87	0.99	7.77	0.89	388.99	2.59
	75	12.04	1.08	10.81	1.03	553.00	2.74

Mujeres: Todos los Genotipos							
		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	121	121	118	118	118	118
	Sin Dato	29	29	32	32	32	32
Media		8.51	0.91	9.20	0.92	447.78	2.58
Mediana		8.07	0.91	7.86	0.90	416.10	2.62
DE		2.77	0.12	4.22	0.20	257.88	0.26
Varianza		7.65	0.02	17.80	0.04	66503.86	0.07
Mínimo		4.82	0.68	2.82	0.45	48.79	1.69
Máximo		23.22	1.37	22.07	1.34	1843.32	3.27
Percentilas	25	6.65	0.82	5.78	0.76	246.68	2.39
	50	8.07	0.91	7.86	0.90	416.10	2.62
	75	9.76	0.99	11.87	1.07	554.35	2.74

Hombres: Todos los Genotipos							
		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	129	129	127	127	127	127
	Sin Dato	21	21	23	23	23	23
Media		11.98	1.06	8.33	0.87	422.32	2.54
Mediana		11.42	1.06	7.46	0.87	351.04	2.55
DE		3.47	0.12	4.16	0.20	294.96	0.29
Varianza		12.02	0.01	17.30	0.04	87002.64	0.08
Mínimo		6.01	0.78	2.60	0.42	27.11	1.43
Máximo		24.09	1.38	22.69	1.36	1721.33	3.24
Percentilas	25	9.82	0.99	5.39	0.73	222.28	2.35
	50	11.42	1.06	7.46	0.87	351.04	2.55
	75	13.71	1.14	10.24	1.01	547.57	2.74

## Metabolitos en Mujeres por Genotipo

Genotipo 2/2							
		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	16	16	16	16	16	16
	Sin Dato	3	3	3	3	3	3
Media		8.76	0.93	9.42	0.94	381.03	2.54
Mediana		8.17	0.91	8.28	0.92	352.40	2.54
DE		2.17	0.11	3.96	0.17	179.49	0.20
Varianza		4.70	0.01	15.65	0.03	32216.28	0.04
Mínimo		5.40	0.73	5.39	0.73	157.22	2.20
Máximo		12.92	1.11	17.92	1.25	841.69	2.93
Percentilas	25	7.27	0.86	5.94	0.77	240.24	2.38
	50	8.17	0.91	8.28	0.92	352.40	2.54
	75	10.56	1.02	11.53	1.06	468.96	2.67

Genotipo 2/3G							
		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	23	23	22	22	22	22
	Sin Dato	8	8	9	9	9	9
Media		9.15	0.96	8.34	0.87	409.39	2.56
Mediana		9.02	0.96	7.59	0.88	412.71	2.62
DE		1.58	0.07	3.93	0.21	196.21	0.24
Varianza		2.49	0.01	15.45	0.04	38497.76	0.06
Mínimo		6.97	0.84	3.22	0.51	115.21	2.06
Máximo		13.56	1.13	15.98	1.20	772.57	2.89
Percentilas	25	7.99	0.90	5.03	0.70	239.56	2.38
	50	9.02	0.96	7.59	0.88	412.71	2.62
	75	10.14	1.01	11.87	1.07	575.70	2.76

Genotipo 2/3C							
		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	34	34	34	34	34	34
	Sin Dato	13	13	13	13	13	13
Media		6.94	0.83	10.32	0.98	564.00	2.72
Mediana		6.67	0.82	10.31	1.01	533.34	2.73
DE		1.42	0.09	4.19	0.19	201.58	0.16
Varianza		2.01	0.01	17.57	0.03	40634.63	0.02
Mínimo		4.82	0.68	3.75	0.57	242.61	2.38
Máximo		10.28	1.01	18.54	1.27	1021.96	3.01
Percentilas	25	5.84	0.77	6.84	0.84	433.72	2.64
	50	6.67	0.82	10.31	1.01	533.34	2.73
	75	7.95	0.90	13.85	1.14	694.63	2.84

Genotipo 3G/3G							
		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	10	10	9	9	9	9
	Sin Dato	2	2	3	3	3	3
Media		8.51	0.91	8.79	0.87	362.79	2.49
Mediana		8.21	0.91	6.00	0.78	388.99	2.59
DE		2.54	0.13	5.64	0.27	198.98	0.28
Varianza		6.45	0.02	31.83	0.07	39593.13	0.08
Mínimo		4.86	0.69	2.82	0.45	120.63	2.08
Máximo		13.22	1.12	20.04	1.30	626.19	2.80
Percentilas	25	6.54	0.82	4.75	0.67	149.77	2.17
	50	8.21	0.91	6.00	0.78	388.99	2.59
	75	10.45	1.02	12.71	1.10	549.61	2.74

Genotipo 3G/3C							
		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	23	23	23	23	23	23
	Sin Dato	1	1	1	1	1	1
Media		9.01	0.94	9.50	0.93	463.60	2.55
Mediana		8.56	0.93	7.77	0.89	323.94	2.51
DE		2.48	0.11	4.71	0.20	389.46	0.31
Varianza		6.17	0.01	22.17	0.04	151681.87	0.10
Mínimo		5.49	0.74	4.50	0.65	108.43	2.04
Máximo		15.00	1.18	22.07	1.34	1843.32	3.27
Percentilas	25	7.03	0.85	5.78	0.76	216.86	2.34
	50	8.56	0.93	7.77	0.89	323.94	2.51
	75	10.09	1.00	12.67	1.10	646.52	2.81

Genotipo 3C/3C							
		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	11	11	10	10	10	10
	Sin Dato	2	2	3	3	3	3
Media		9.04	0.93	6.75	0.82	265.38	2.33
Mediana		8.74	0.94	6.84	0.84	266.33	2.42
DE		3.89	0.16	1.71	0.12	155.68	0.34
Varianza		15.11	0.03	2.91	0.01	24237.61	0.11
Mínimo		4.82	0.68	3.66	0.56	48.79	1.69
Máximo		19.14	1.28	9.67	0.99	478.45	2.68
Percentilas	25	6.44	0.81	5.37	0.73	106.40	2.02
	50	8.74	0.94	6.84	0.84	266.33	2.42
	75	10.39	1.02	7.91	0.90	401.19	2.60

## Metabolitos en Hombres por Genotipo

		Genotipo 2/2					
		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	8	8	8	8	8	8
	Sin Dato	4	4	4	4	4	4
Media		11.39	1.05	13.34	1.08	366.46	2.40
Mediana		11.60	1.06	11.70	1.07	406.61	2.60
DE		1.65	0.07	6.50	0.23	250.84	0.49
Varianza		2.71	0.00	42.21	0.05	62919.62	0.24
Mínimo		8.30	0.92	4.99	0.70	27.11	1.43
Máximo		13.49	1.13	22.69	1.36	660.07	2.82
Percentilas	25	10.48	1.02	8.23	0.92	117.58	2.07
	50	11.60	1.06	11.70	1.07	406.61	2.60
	75	12.82	1.11	20.16	1.30	609.58	2.78

		Genotipo 2/3G					
		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	30	30	30	30	30	30
	Sin Dato	1	1	1	1	1	1
Media		12.79	1.08	7.20	0.82	599.39	2.67
Mediana		11.19	1.05	6.64	0.82	468.28	2.67
DE		4.50	0.14	3.28	0.19	459.02	0.32
Varianza		20.29	0.02	10.76	0.04	210699.77	0.10
Mínimo		7.04	0.85	3.35	0.53	115.21	2.06
Máximo		24.09	1.38	15.93	1.20	1721.33	3.24
Percentilas	25	9.88	0.99	4.22	0.62	267.69	2.43
	50	11.19	1.05	6.64	0.82	468.28	2.67
	75	15.66	1.19	9.21	0.96	736.65	2.87

		Genotipo 2/3C					
		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	38	38	39	39	39	39
	Sin Dato	11	11	10	10	10	10
Media		12.65	1.09	7.38	0.84	299.75	2.42
Mediana		11.99	1.08	7.15	0.85	256.17	2.41
DE		3.30	0.11	2.69	0.16	145.52	0.23
Varianza		10.86	0.01	7.23	0.02	21174.82	0.05
Mínimo		7.52	0.88	3.13	0.50	73.19	1.86
Máximo		21.88	1.34	15.01	1.18	630.25	2.80
Percentilas	25	10.20	1.01	5.39	0.73	197.89	2.30
	50	11.99	1.08	7.15	0.85	256.17	2.41
	75	14.05	1.15	8.33	0.92	432.37	2.64

Genotipo 3G/3G							
		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	9	9	8	8	8	8
	Sin Dato	1	1	2	2	2	2
Media		9.83	0.98	8.11	0.89	357.65	2.54
Mediana		9.87	0.99	7.68	0.89	353.08	2.55
DE		2.07	0.09	2.68	0.14	89.08	0.11
Varianza		4.27	0.01	7.16	0.02	7935.26	0.01
Mínimo		7.36	0.87	5.39	0.73	218.22	2.34
Máximo		13.35	1.13	12.93	1.11	504.20	2.70
Percentilas	25	7.90	0.90	5.86	0.77	295.81	2.47
	50	9.87	0.99	7.68	0.89	353.08	2.55
	75	11.48	1.06	10.41	1.01	426.27	2.63

Genotipo 3G/3C							
		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	20	20	19	19	19	19
	Sin Dato	2	2	3	3	3	3
Media		11.22	1.03	7.56	0.83	388.92	2.51
Mediana		9.91	1.00	6.22	0.79	326.65	2.51
DE		3.43	0.12	3.80	0.21	254.60	0.27
Varianza		11.78	0.02	14.47	0.04	64820.17	0.07
Mínimo		6.68	0.82	3.13	0.50	107.08	2.03
Máximo		19.64	1.29	15.80	1.20	1156.14	3.06
Percentilas	25	8.54	0.93	4.41	0.64	220.93	2.34
	50	9.91	1.00	6.22	0.79	326.65	2.51
	75	13.72	1.14	9.75	0.99	580.10	2.76

Genotipo 3C/3C							
		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	19	19	18	18	18	18
	Sin Dato	2	2	3	3	3	3
Media		11.45	1.04	10.44	0.97	471.15	2.63
Mediana		11.26	1.05	8.47	0.93	435.75	2.64
DE		2.96	0.12	5.30	0.22	195.78	0.21
Varianza		8.75	0.01	28.07	0.05	38330.72	0.04
Mínimo		6.01	0.78	3.40	0.53	131.47	2.12
Máximo		16.27	1.21	22.07	1.34	799.67	2.90
Percentilas	25	9.10	0.96	6.28	0.80	331.73	2.52
	50	11.26	1.05	8.47	0.93	435.75	2.64
	75	13.54	1.13	13.87	1.14	641.09	2.81

## DIHIDROFOLATO REDUCTASA

Mujeres y Hombres: Todos los Genotipos							
		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	258	258	253	253	252	252
	Sin Dato	42	42	47	47	48	48
Media		10.17	0.98	8.56	0.89	443.23	2.56
Mediana		9.84	0.99	7.59	0.88	392.38	2.59
DE		3.38	0.14	4.01	0.20	291.74	0.27
Varianza		11.40	0.02	16.05	0.04	85109.67	0.07
Mínimo		4.62	0.66	2.47	0.39	60.99	1.79
Máximo		21.45	1.33	22.07	1.34	1916.51	3.28
Percentilas	25	7.61	0.88	5.43	0.73	240.58	2.38
	50	9.84	0.99	7.59	0.88	392.38	2.59
	75	12.04	1.08	10.68	1.03	553.00	2.74

Mujeres: Todos los Genotipos							
		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	129	129	126	126	125	125
	Sin Dato	21	21	24	24	25	25
Media		8.53	0.91	9.03	0.91	445.39	2.58
Mediana		8.07	0.91	7.86	0.90	416.10	2.62
DE		2.73	0.13	4.06	0.20	238.53	0.26
Varianza		7.45	0.02	16.51	0.04	56897.03	0.07
Mínimo		4.62	0.66	2.47	0.39	60.99	1.79
Máximo		19.14	1.28	20.04	1.30	1169.69	3.07
Percentilas	25	6.61	0.82	5.78	0.76	246.68	2.39
	50	8.07	0.91	7.86	0.90	416.10	2.62
	75	9.95	1.00	11.64	1.07	555.71	2.74

Hombres: Todos los Genotipos							
		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	129	129	127	127	127	127
	Sin Dato	21	21	23	23	23	23
Media		11.82	1.06	8.10	0.86	441.11	2.55
Mediana		11.42	1.06	7.42	0.87	351.04	2.55
DE		3.15	0.11	3.91	0.20	336.96	0.28
Varianza		9.95	0.01	15.27	0.04	113540.81	0.08
Mínimo		6.13	0.79	2.60	0.42	73.19	1.86
Máximo		21.45	1.33	22.07	1.34	1916.51	3.28
Percentilas	25	9.77	0.99	5.21	0.72	222.28	2.35
	50	11.42	1.06	7.42	0.87	351.04	2.55
	75	13.60	1.13	9.75	0.99	547.57	2.74

## Metabolitos en Mujeres por genotipo

Genotipo 1/1

		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	18	18	16	16	16	16
	Sin Dato	4	4	6	6	6	6
Media		6.87	0.83	10.32	0.98	583.49	2.72
Mediana		6.64	0.82	10.13	1.01	522.50	2.72
DE		1.14	0.07	4.14	0.19	269.57	0.20
Varianza		1.31	0.00	17.17	0.04	72669.24	0.04
Mínimo		5.40	0.73	4.46	0.65	235.84	2.37
Máximo		9.89	1.00	17.17	1.23	1169.69	3.07
Percentilas	25	5.94	0.77	6.82	0.83	394.75	2.60
	50	6.64	0.82	10.13	1.01	522.50	2.72
	75	7.37	0.87	14.00	1.15	791.88	2.90

Genotipo 1/2

		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	58	58	57	57	56	56
	Sin Dato	12	12	13	13	14	14
Media		8.78	0.93	9.34	0.93	465.48	2.62
Mediana		8.18	0.91	8.21	0.91	425.59	2.63
DE		2.69	0.12	4.18	0.20	217.96	0.22
Varianza		7.24	0.02	17.51	0.04	47506.03	0.05
Mínimo		4.62	0.66	2.47	0.39	120.63	2.08
Máximo		16.59	1.22	20.04	1.30	1009.76	3.00
Percentilas	25	7.05	0.85	6.07	0.78	299.20	2.48
	50	8.18	0.91	8.21	0.91	425.59	2.63
	75	10.10	1.00	12.32	1.09	583.49	2.77

Genotipo 2/2

		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	53	53	53	53	53	53
	Sin Dato	5	5	5	5	5	5
Media		8.81	0.92	8.31	0.87	382.47	2.50
Mediana		8.89	0.95	7.46	0.87	338.85	2.53
DE		2.98	0.14	3.84	0.20	232.66	0.29
Varianza		8.88	0.02	14.74	0.04	54131.02	0.08
Mínimo		4.82	0.68	2.65	0.42	60.99	1.79
Máximo		19.14	1.28	18.01	1.26	1021.96	3.01
Percentilas	25	6.66	0.82	5.65	0.75	190.43	2.28
	50	8.89	0.95	7.46	0.87	338.85	2.53
	75	10.28	1.01	10.31	1.01	506.91	2.70

## Metabolitos en Hombres por genotipo

Genotipo 1/1

		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	15	15	16	16	16	16
	Sin Dato	2	2	1	1	1	1
Media		11.68	1.04	8.26	0.85	332.58	2.45
Mediana		11.56	1.06	7.37	0.87	328.00	2.52
DE		3.95	0.14	5.19	0.25	173.65	0.27
Varianza		15.62	0.02	26.92	0.06	30152.65	0.07
Mínimo		7.16	0.85	3.31	0.52	73.19	1.86
Máximo		19.64	1.29	22.07	1.34	626.19	2.80
Percentilas	25	7.53	0.88	4.20	0.62	206.36	2.31
	50	11.56	1.06	7.37	0.87	328.00	2.52
	75	16.02	1.20	10.25	1.01	498.44	2.70

Genotipo 1/2

		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	70	70	67	67	67	67
	Sin Dato	9	9	12	12	12	12
Media		11.98	1.06	8.22	0.87	508.71	2.59
Mediana		11.85	1.07	7.90	0.90	371.37	2.57
DE		3.17	0.11	3.94	0.21	418.15	0.32
Varianza		10.03	0.01	15.53	0.04	174851.41	0.10
Mínimo		6.13	0.79	2.60	0.42	89.46	1.95
Máximo		21.45	1.33	20.79	1.32	1916.51	3.28
Percentilas	25	9.92	1.00	4.99	0.70	222.28	2.35
	50	11.85	1.07	7.90	0.90	371.37	2.57
	75	13.83	1.14	10.68	1.03	590.95	2.77

Genotipo 2/2

		Homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ )	LogHcy	Folatos (ng/ml)	LogFol	Vitamina B12 (pg/ml)	LogB12
N	Con Dato	44	44	44	44	44	44
	Sin Dato	10	10	10	10	10	10
Media		11.63	1.05	7.85	0.86	377.63	2.52
Mediana		10.74	1.03	7.06	0.85	339.52	2.53
DE		2.89	0.10	3.38	0.18	195.39	0.22
Varianza		8.35	0.01	11.42	0.03	38178.29	0.05
Mínimo		7.04	0.85	3.13	0.50	107.08	2.03
Máximo		20.16	1.30	16.29	1.21	1004.34	3.00
Percentilas	25	9.71	0.99	5.31	0.72	232.45	2.37
	50	10.74	1.03	7.06	0.85	339.52	2.53
	75	13.33	1.12	8.73	0.94	448.63	2.65

## ANEXO IV. Reactivos y soluciones

### REACTIVOS

-GoTaq Flexi DNA Polymerase. PROMEGA. Madison, USA. No de catálogo M8295. 5U/ $\mu$ L.500U. Lote 18657925. Fecha de caducidad 11 Mayo 2008.

-Oligonucleótidos TS. SIGMA GENOSYS.

Sentido (F) 3057-007

Antisentido (R) 3057-008

-Oligonucleótidos DHFR. SIGMA GENOSYS.

Sentido (F<sub>1</sub>) 3065-052

Sentido (F<sub>1</sub>) 3057-010

Antisentido (R) 3057-011

-Nucleótidos. PCR nucleótide Mix. PROMEGA. Madison, USA. No. de catálogo C1141.Lote 224002.Fecha de caducidad 15 de Septiembre 2007.

-*Enzima de restricción Hae III* .PROMEGA. Madison, USA. No de catálogo R6171 10U/ $\mu$ L (2500U)

- Agarosa grado analítico. PROMEGA. Madison, USA. No. de catálogo V3125. 500g. Lote 227315. Fecha de caducidad julio 2011.

- Marcador de peso molecular DNA Molecular Weight Marker VIII (0.019-1.11 kbp). ROCHE. Penzberg, Alemania. No. de catálogo 1336045. 25 $\mu$ g/ $\mu$ L (50  $\mu$ g). Lote . Fecha de caducidad 31 de octubre 2006

### EQUIPOS

Termociclador *Mastercycler gradient* marca Eppendorf

Transiluminador Spectroline.Modelo TR-312A .Ultravioleta 312 nm.

Biophotometre Eppendorf. AG 22331.

## SOLUCIONES

<b>Solución EDTA 0.5M pH 8.0</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Etilendiaminotetraacetato de sodio dihidratado (EDTA)	186.1g
Agua destilada	c.b.p. 1000 mL

Añadir 186.1g de EDTA a 800 mL de agua destilada. Homogeneizar agitando vigorosamente. Ajustar el pH a 8.0 si es necesario con aproximadamente 20 g de NaOH en lenteja, aforar con agua destilada hasta 1 L.

<b>Solución Bromuro de Etidio 1%</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Bromuro de Etidio	1g
Agua destilada	c.b.p 100mL

Añadir 1g de bromuro de etidio en 100mL 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.

<b>Solución amortiguadora Tris-Boratos (TBE) 10x</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Trisma Base	108g
Acido Bórico	55g
Solución EDTA 0.5M pH 8.0	40mL
Agua destilada	c.b.p. 1000 mL

En 800 mL agua destilada añadir la trisima base y el ácido bórico. Mantener en agitación magnética durante varios minutos, agregar 40 mL de Solución EDTA 0.5M pH 8.0, y continuar con la agitación. Una vez disueltos los reactivos, llevar al aforo con agua destilada a un volumen de 1000 mL.

Almacenar en frascos de vidrio o plástico a temperatura ambiente.

<b>Solución amortiguadora Tris-Boratos (TBE) 1x</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
TBE 10x	100 mL
Agua destilada	c.b.p. 1000 mL

En un matraz aforado añadir 100 mL de TBE 10x y llevarlo al aforo de 1 L con agua destilada.

Almacenar en frascos de vidrio o plástico a temperatura ambiente.

<b>Gel de agarosa al 3%</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Agarosa	3.0 g
TBE 1x	100 mL
Bromuro de etidio	2 $\mu$ L

Agregar a 100 mL de TBE 1x, 3.0g de agarosa, calentar en un horno de microondas durante 1 minuto. Agitar la mezcla y calentar nuevamente en horno de microondas durante dos minutos (tiempo en el que la agarosa ya debió homogenizarse con el agua). Adicionar 2.0  $\mu$ L de bromuro de etidio y homogenizar. Verter en un molde para gel.

#### **Precauciones.**

El bromuro de etidio es un potente mutágeno moderadamente tóxico. Su manipulación requiere el uso de guantes.

<b>Gel de agarosa al 1%</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Agarosa	1.0 g
TBE 1x	100 mL
Bromuro de etidio	2 $\mu$ L

Agregar a 100 mL de TBE 1x, 1.0g de agarosa, calentar en un horno de microondas durante 1 minuto. Agitar la mezcla y calentar nuevamente en horno de microondas durante dos minutos (tiempo en el que la agarosa ya debió homogenizarse con el agua). Adicionar 2.0  $\mu$ L de bromuro de etidio y homogenizar. Verter en un molde para gel.

**Precauciones.**

El bromuro de etidio es un potente mutágeno moderadamente tóxico. Su manipulación requiere el uso de guantes.