



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUIMICA

"DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA PARA LA  
MUTACIÓN Rs 2236225 (1958 G>A) EN POBLACIÓN  
MESTIZA MEXICANA SANA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

LENA HERNÁNDEZ SERRANO



MÉXICO, D. F.

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:**

<b>Presidente</b>	<b>Profra.</b>	<b>Marisol López López</b>
<b>Vocal</b>	<b>Profra.</b>	<b>Herminia de Jesús Loza Tavera</b>
<b>Secretario</b>	<b>Profr.</b>	<b>Osvaldo M. Mutchinick Baringoltz</b>
<b>1er.Suplente</b>	<b>Profr.</b>	<b>Eleazar Martínez Barajas</b>
<b>2º.Suplente</b>	<b>Profr.</b>	<b>León Patricio Martínez Castilla</b>

**Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán**  
**Departamento de Genética Médica Rubén Lisker**

---

**Osvaldo M. Mutchinick Baringoltz**  
**Asesor**

---

**Nancy Monroy Jaramillo**  
**Supervisora Técnica**

---

**Lena Hernández Serrano**  
**Sustentante**

*Ésta Tesis está dedicada a todas las personas que de alguna manera me acompañaron en esto.*

*A mi familia:*

*Roberto Hernández*

*Toño*

*Aída*

*Tania*

*Mónica*

*Aimeé*

# ÍNDICE

	<b>Pág.No.</b>
1. - Antecedentes	<b>1-2</b>
2.-Hipótesis	<b>3</b>
3.- Objetivos	<b>3</b>
4.-Introducción	
4.1. Bioquímica del ciclo de los folatos	<b>4-6</b>
4.2. Metabolismo de los folatos y enzimas involucradas	<b>7-8</b>
4.3. Metabolismo de la homocisteína y sus alteraciones	<b>9-10</b>
4.4. Folatos, Vitamina B <sub>12</sub> y Homocisteína en el desarrollo embrionario	<b>10-12</b>
4.5. La enzima metilén tetrahidrofolato deshidrogenasa ( MTHFD1)	<b>13-17</b>
4.6. El gen <i>MTHFD1</i>	<b>17-18</b>
4.8. El polimorfismo <i>MTHFD1</i> 1958 G>A	<b>18-21</b>
4.9. Asociación de enfermedades con el alelo <i>MTHFD1</i> 1958 A	<b>22-24</b>
5. Materiales	<b>25</b>
6.Métodos	<b>26-32</b>
7.Resultados	<b>33-46</b>
8.Discusión	<b>47-51</b>
9.Conclusiones	<b>52-53</b>
10.Perspectivas	<b>54</b>
10.Abreviaturas	<b>55</b>
11.Bibliografía	<b>56- 59</b>
Apéndice 1. Tablas	<b>60-66</b>
Apéndice 2. Reactivos y soluciones	<b>67-71</b>

## ANTECEDENTES

En 1928 Lucy Wills observó una elevada incidencia de anemia macrocítica en mujeres embarazadas habitantes de una comunidad en la India y que el consumo de extractos de hígado o de levadura eran un tratamiento efectivo contra dicha enfermedad. Más tarde se descubriría el mismo efecto con una vitamina presente en hojas de espinaca y otros vegetales, motivo por el cual se le nombró ácido fólico (de *folium*) (Carpenter, 2003).

En los años 70 se estableció la suplementación con ácido fólico durante el embarazo como medida de salud pública (Carpenter, 2003).

A partir de 1990 se demostró que una dieta baja en folatos así como alteraciones en algunas de sus enzimas son asociadas a enfermedades como síndrome de Down, cáncer, enfermedades vasculares, leucemias y defectos del tubo neural (NTDs) (Nijhout et al., 2004).

La presentación de NTDs varía dependiendo del grupo étnico, factores genéticos, ambientales y estatus nutricional de la mujer gestante principalmente (van Der Put et al., 2001); en México la prevalencia de NTDs es de 1 en 250 a 1 en 300 (Mutchinick et al., 1999; Van Der Put, 2001).

Trastornos en el metabolismo de los folatos pueden provocar elevaciones en los niveles de homocisteína afectando las vías metabólicas relacionadas y como consecuencia la disminución en la biodisponibilidad de grupos metilo, bases púricas y pirimídicas entre otros efectos.

Los genes que codifican las enzimas que intervienen en el metabolismo de los folatos son candidatos principales en la búsqueda de mutaciones relacionadas a hiperhomocisteinemia, disminución en la síntesis de purinas y pirimidinas así como diversas enfermedades

Los polimorfismos de un solo nucleótido (Single nucleotide polymorphisms o SNPs) en un gen pueden alterar la expresión génica, la estructura tridimensional de las enzimas, la afinidad al sustrato, a su(s) cofactore(s), e incluso disminuir su actividad por alteración del sitio catalítico.

Dentro del metabolismo de los folatos, destaca la enzima trifuncional Metilén Tetrahidrofolato Deshidrogenasa (MTHFD1). Existen 5 SNPs identificados en el banco de datos del OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) para el gen *MTHFD1*, de los cuales el polimorfismo *MTHFD1 G1958A* (con número de acceso Rs 2236225) es asociado a NTDs y abortos recurrentes.

## **HIPÓTESIS:**

La población mestiza mexicana sana presenta una alta frecuencia del alelo *MTHFD1* 1958A, éste polimorfismo puede afectar el balance de la ruta metabólica de los folatos y por lo tanto las concentraciones séricas de folatos, homocisteína y vitamina B12.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo principal:**

-Determinar la frecuencia para el polimorfismo *MTHFD1* G1958A en el gen que codifica para la metilén tetrahidrofolato deshidrogenasa en población mestiza mexicana sana.

### **Objetivo Secundario:**

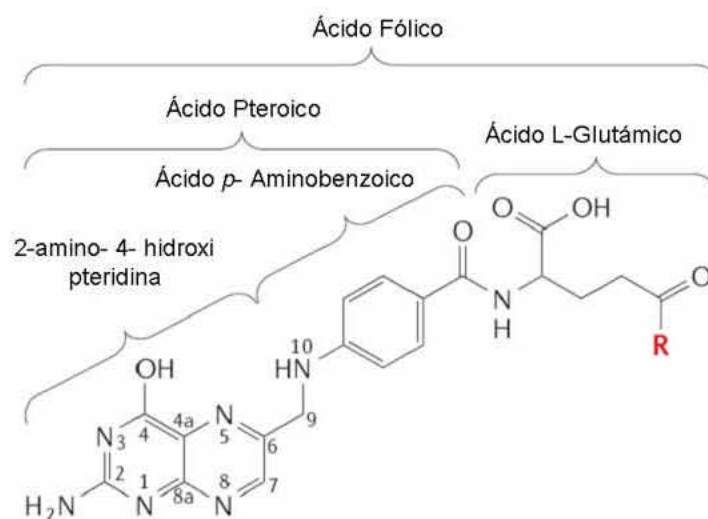
-Determinar si existe alguna relación entre los niveles plasmáticos de folatos, homocisteína y vitamina B12 con los genotipos de *MTHFD1* G1958A en la población en estudio.



## INTRODUCCIÓN

### BIOQUÍMICA DE LOS FOLATOS

En 1946 Robert Stokstad caracterizó la molécula del ácido fólico (Carpenter, 2003), que está formado por un residuo de 6-metilpterina enlazado secuencialmente a una molécula de ácido *p*-amino benzoico y una cadena de hasta 5 moléculas de glutamato unidas entre sí por enlaces isopeptídicos (fig. 1).



**Figura 1.** Estructura química del ácido fólico, se indican las subunidades moleculares que forman el ácido fólico, el anillo de aminopterina está unido mediante su carbono 6 al ácido *p*-amino benzoico y éste a su vez enlazado al ácido L- glutámico mediante un enlace peptídico. Los nitrógenos 5 y 10 constituyen la parte químicamente activa de la molécula a los cuales se unen los radicales sustituibles a lo largo de su metabolismo. R es la cadena glutámica de longitud variable. Los carbonos 5, 6, 7 y 8 son reducidos para formar el THF activando biológicamente al ácido fólico. (Modificada de Henk et al., 2006).

Tabla 1. Radicales sustituibles unidos al ácido fólico			
POSICIÓN		RADICAL (Unidad C1)	GRADO DE OXIDACIÓN DE LA UNIDAD C <sub>1</sub>
N <sup>5</sup>	N <sup>10</sup>		
-CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -	-H -CH <sub>2</sub> -	5-METIL 5,10-METILÉN	REDUCIDA ↓
=CH=	=CH=	5,10-METENIL	
-H	-CHO	10-FORMIL	OXIDADA

A lo largo de la ruta metabólica se llevan a cabo diversas modificaciones en la molécula de folato, en esta tabla se indican las posiciones en las que se puede encontrar cada radical y el nombre que recibe cada molécula así como su grado de oxidación. (Basada en Van Der Put et al., 2001).

El ácido fólico es un micro nutriente que pertenece al grupo de las vitaminas B, representa un sustrato esencial para la biosíntesis de nucleótidos, precursores en la generación de ADN y reacciones de metilación; los mamíferos no pueden sintetizarlo por lo que debe ser provisto en la dieta por la ingesta de alimentos como espinacas, frijol, hígado o por los microorganismos intestinales (Van Der Put et al., 2001).

Los folatos proporcionados por la dieta se encuentran en forma de poliglutamatos, los cuales son hidrolizados a folatos simples en el estómago, éstos son absorbidos en el duodeno, una vez en el intestino delgado son transportados al hígado donde se convierten en 5- metil tetrahydrofolato, la forma principal en el torrente sanguíneo (Van Der Put et al., 2001).

El ácido fólico no es biológicamente activo, se requiere en su forma reducida, el tetrahydrofolato (THF) a través de la catálisis enzimática realizada por la metilén THF reductasa (MTHFR).

El THF es un cofactor importante, ya que sirve para transferir unidades C<sub>1</sub> (unidades de 1 carbono) en diversos estados de oxidación. Las unidades C<sub>1</sub> están covalentemente unidas al THF en sus posiciones N (5) y/o N (10), estas unidades C<sub>1</sub> pueden encontrarse en un nivel de oxidación de metilo, metenil o formato (tabla 1) mediante reacciones enzimáticas de óxido-reducción y participar en más de 100 reacciones metabólicas (Van Der Put et al., 2001).

Otra molécula importante en la transferencia de grupos C<sub>1</sub> es la vitamina B12 o cobalamina, ésta vitamina realiza sus funciones al unirse a tres proteínas en distintas etapas, se libera de los alimentos en el estómago para unirse a la haptocorrina, una vez en el duodeno se une al factor intrínseco secretado en el estómago, este complejo se absorbe por unión a un receptor en el *ileum* para entrar a las células entéricas, donde la vitamina B12 se une a la transcobalamina II, en esta forma es transportada a través de la circulación portal hacia los tejidos.

Una reacción importante para la síntesis de ADN es la formación de metionina, la cual requiere como cofactores a la Vitamina B12 y 5-metil THF.

## **Metabolismo del folato y enzimas involucradas**

Una unidad C<sub>1</sub> dentro del sistema de los folatos puede tener distintos destinos:

- 1.- Puede ser utilizada como 5,10- metilén THF en la conversión del desoxinucleótido dUMP a dTMP por la Timidilato Sintetasa.
- 2.- Reducirse a 5 -metil THF para la síntesis de metionina a partir de homocisteína. La metionina sintetasa (MS) dependiente de vitamina B12 cataliza la transferencia de un grupo metilo a la homocisteina para generar metionina.
- 3.-Oxidarse a 10-formil THF, a partir de 5,10-metenil THF, para ser usado en la síntesis de purinas (Fig. 2).

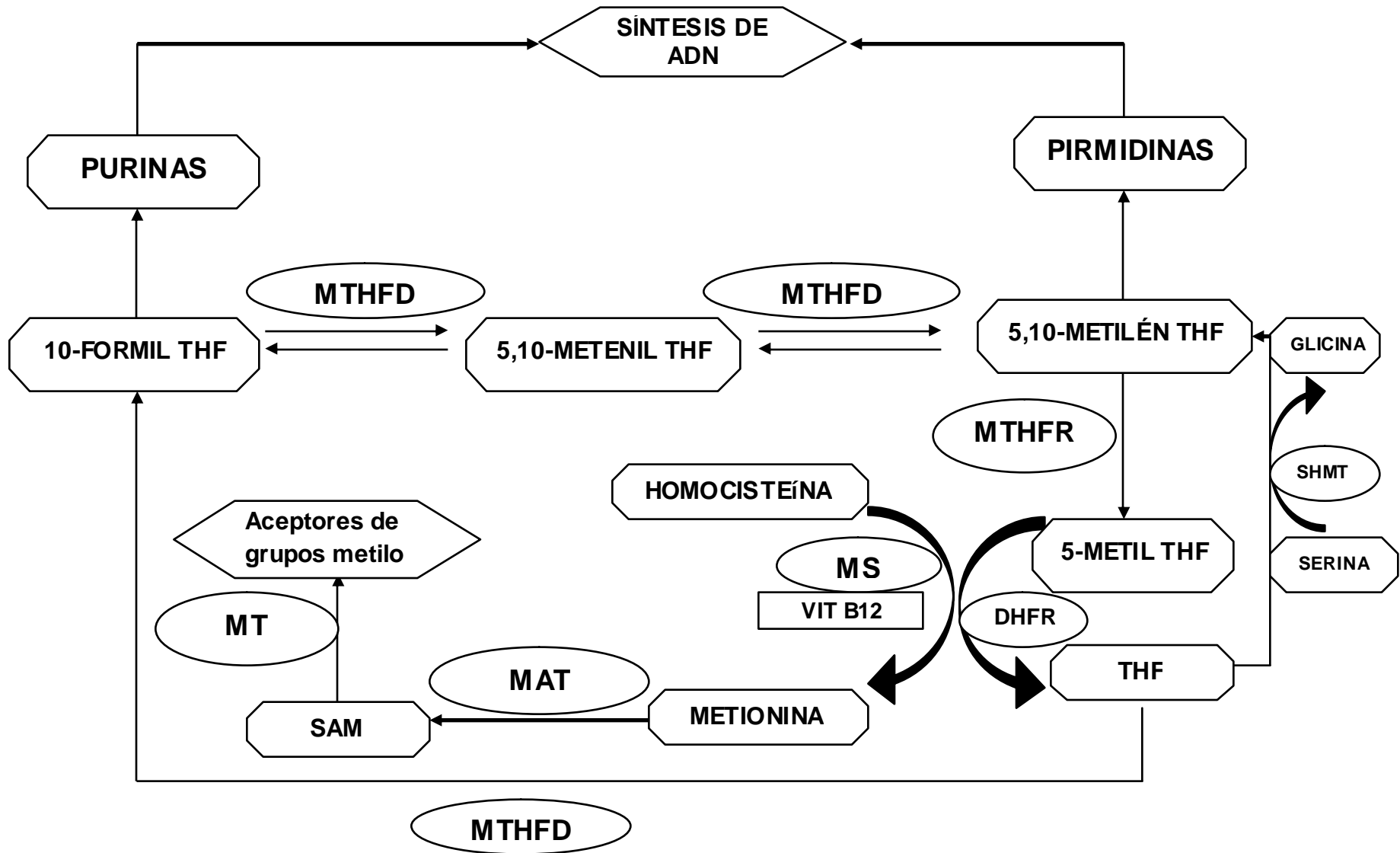


Figura 2. Esquema de la ruta de los folatos. Se muestran las enzimas principales en la ruta de los folatos y su conexión con la ruta de la metionina, síntesis de nucleótidos y metabolismo de algunos aminoácidos. (**MTHFD**) Metilén THF Deshidrogenasa; (**MTHFR**) Metilén THF reductasa; (**MS**) Metionina Sintetasa; (**DHFR**) Dihidrofolato reductasa; (**SHMT**) Serina Hidroximetil Transferasa; (**MAT**) Metionina Adenosil Transferasa; (**SAM**) S-adenosilmetionina; (**MT**) Metil transferasas. Los óvalos indican las enzimas que realizan la conversión bioquímica de los distintos sustratos. Las metil transferasas pueden actuar en una gran variedad de sustratos como DNA, histonas, etc.

## Metabolismo de la homocisteína y sus alteraciones

La homocisteína es un aminoácido empleado como biomarcador del funcionamiento en las vías metabólicas de transmetilación (conversión de homocisteína en metionina) y la de transulfuración (a través de la generación de cistationina) generando los grupos metilo (fig.2) esenciales en diversos procesos biológicos (Dimitrova, et al., 2002).

La metionina proveniente de la dieta es convertida en S-adenosilmetionina (SAM), este sustrato es el donador universal de grupos metilo requeridos para la síntesis de fosfolípidos, mielina, colina, catecolaminas y destoxificación de xenobióticos; además los grupos metilo participan en la regulación de la expresión génica y modificación postraduccional de proteínas como las histonas. Durante las reacciones de transmetilación la SAM es metabolizada en cisteína, el precursor del glutatión que además de servir como antioxidante llevar a cabo la destoxificación intracelular (Dimitrova, et al., 2002).

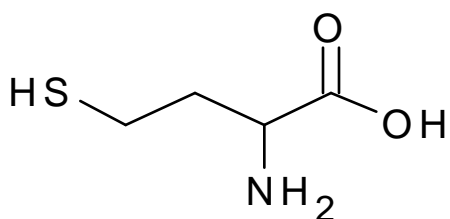


Figura 3 .Estructura química de la homocisteína.

La hiperhomocisteinemia genera especies reactivas de oxígeno, donde el mecanismo propuesto es la auto-oxidación del grupo tiol (fig. 3), en presencia de ceruloplasmina, una proteína sérica a la que se une principalmente el cobre, de modo que se lleva a cabo la reacción que rinde homocisteína y peróxido de hidrógeno ocasionando estrés oxidativo

celular (Priyanka et al., 2006). Además la acumulación de homocisteína contribuye al estrés celular por inhibición de la síntesis de glutatión (Dimitrova, et al., 2002).

Se ha observado que niveles elevados de homocisteína ocasionan alteraciones en las vías de inflamación y apoptosis, la cascada de coagulación, regulación del colesterol y daño en células neuronales (Priyanka et al. 2006).

La hiperhomocisteinemia puede llevar a condiciones de hipometilación del ADN y en consecuencia generar inestabilidad global del epigenoma, activando elementos móviles como transposones, que normalmente permanecen estables o alterar la conformación de la heterocromatina.

Diversos estudios de asociación indican que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente para enfermedades vasculares, Alzheimer, esquizofrenia, enfermedad renal terminal, osteoporosis y diabetes no insulino dependiente (Priyanka et al., 2006).

### **Folatos, vitamina B<sub>12</sub> y homocisteína en el desarrollo embrionario**

La disminución de folatos en eritrocitos y en plasma de mujeres gestantes se asocian con mayor riesgo de tener productos con NTDs (Brody et al., 2002).

El término NTDs se aplica a malformaciones embrionarias del cerebro y/o cordón espinal, éstas enfermedades se caracterizan por el desarrollo incompleto del sistema nervioso central y de las estructuras cercanas relacionadas (Van Der Put et al., 2001).

Las NTDs se manifiestan principalmente como anencefalia o espina bífida con mielocèle acompañadas de alteraciones del esqueleto axial, cubierta meningovascular y tejidos dérmicos (canalización). Aunque los NTD's están entre las malformaciones congénitas más comunes, es poco lo que se conoce sobre los mecanismos que los producen (Van Der Put et al., 2001).

Una posible explicación se basa en que se ha comprobado que la síntesis de ARN puede mantenerse en concentraciones deficientes de ácido fólico o de vitamina B<sub>12</sub>, pero no la de ADN por la falta de dTMP (Rodríguez, 1998).

Los requerimientos de folato durante el embarazo aumentan entre 5 y 10 veces, lo que indica la importancia de una ingesta adecuada de este nutriente para el desarrollo embrionario.

Las concentraciones bajas de folatos también pueden producir hiperhomocisteinemia, al disminuir los grupos metilo para la regeneración de metionina, en mujeres gestantes, la hiperhomocisteinemia se asocia con abortos, insuficiencia placentaria, restricción del crecimiento del embrión, preeclampsia, pérdida placentaria abrupta y muerte fetal. (Parle-McDermott et al., 2005)

Datos recientes indican la disminución entre el 45-55 % en la incidencia de NTDs con un régimen de 0.4-5 mg/día de ácido fólico en el primer trimestre de gestación y la suplementación periconcepcional de 0.4 mg/día (Henk et al., 2006).



Los eventos moleculares que producen NTDs por deficiencia de folatos no han sido del todo esclarecidos, sin embargo la hipótesis más consistente propone que se genera metilación deficiente de metabolitos cruciales para el desarrollo embrionario, llevando a la desregulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis de células neuronales, causada parcialmente por la incorporación errónea de nucleótidos durante la síntesis de ADN que se observa en la células con actividad proliferativa deficientes de folatos, lo que disminuye la viabilidad del embrión (Brody et al., 2006).

Adicionalmente, existen estudios que muestran una elevada frecuencia de abortos espontáneos en mujeres con bajos niveles de folatos en plasma (McDermott et al., 2005).

#### **Factores que alteran los niveles de Homocisteína.**

Se ha demostrado en diversos estudios que los niveles de homocisteína son dependientes de algunos factores como:

- Origen étnico
- Sexo
- Edad
- Masa corporal
- Gestación
- Dieta
- Ingesta de Vitamina B12 y folatos
- Estatus de estrógenos
- Mutaciones en genes relacionados al ciclo de la metionina y los folatos

(Savaria et.al., 2000)

## **La enzima MTHFD1 (Metilén Tetrahidrofolato Deshidrogenasa)**

El genoma humano contiene cuatro secuencias parálogas del gen *MTHFD*:

- El gen que codifica la MTHFD1 trifuncional (citoplasmática) en el cromosoma 14
- El gen que codifica la MTHFD2 (mitocondrial) en el cromosoma 6
- El gen que codifica la enzima bifuncional metilénTHF deshidrogenasa/ metenil THF ciclohidrolasa en el cromosoma 2
- El pseudo gen en el cromosoma X

## **Función de la enzima Metilén tetrahidrofolato deshidrogenasa**

La MTHFD citosólica (MTHFD1) es una proteína con tres actividades catalíticas:

- 1.-N5, N10- metilén THF deshidrogenasa (MTHFD)
- 2.-N5, N10- metenil THF ciclohidrolasa (MTHFC)
- 3.-N10 -formilTHF sintetasa (FTHFS)

La MTHFD2 (MTHFD mitocondrial) realiza dos actividades dentro del ciclo del ácido fólico:

- 1.-N5, N10 -metilén THF deshidrogenasa (MTHFDm)
- 2.-N5, N10 -metenil THF ciclohidrolasa (MTHFCm)

La MTHFD1 dependiente de folato, NADP<sup>-</sup> citoplasmático y de Mg<sup>2+</sup>, cataliza tres reacciones consecutivas. Convierte el 5,10-metilén THF (sustrato para la síntesis de pirimidinas) en 5,10-metenil THF, éste a su vez en 10- formil THF (sustrato para la síntesis de purinas) esenciales para la síntesis de ADN (figs. 2 y 4).

La MTHFD1 tiene como función mantener el equilibrio entre THF, 10-Formil THF, 5,10-metilenil THF y 5,10-metilén THF (sustrato para la síntesis de timidilato), regulando la disponibilidad de sustratos para la síntesis de timidilato y purinas (Tonkinson et al., 1998).

Al catalizar múltiples reacciones importantes en la ruta de los folatos, se piensa que mutaciones en esta enzima pueden afectar la tasa de síntesis de ADN por disminución en la síntesis *de novo* de nucleótidos, generar carencia de cofactores derivados del ácido fólico y por lo tanto acumulación de homocisteína por carencia de grupos metilo.

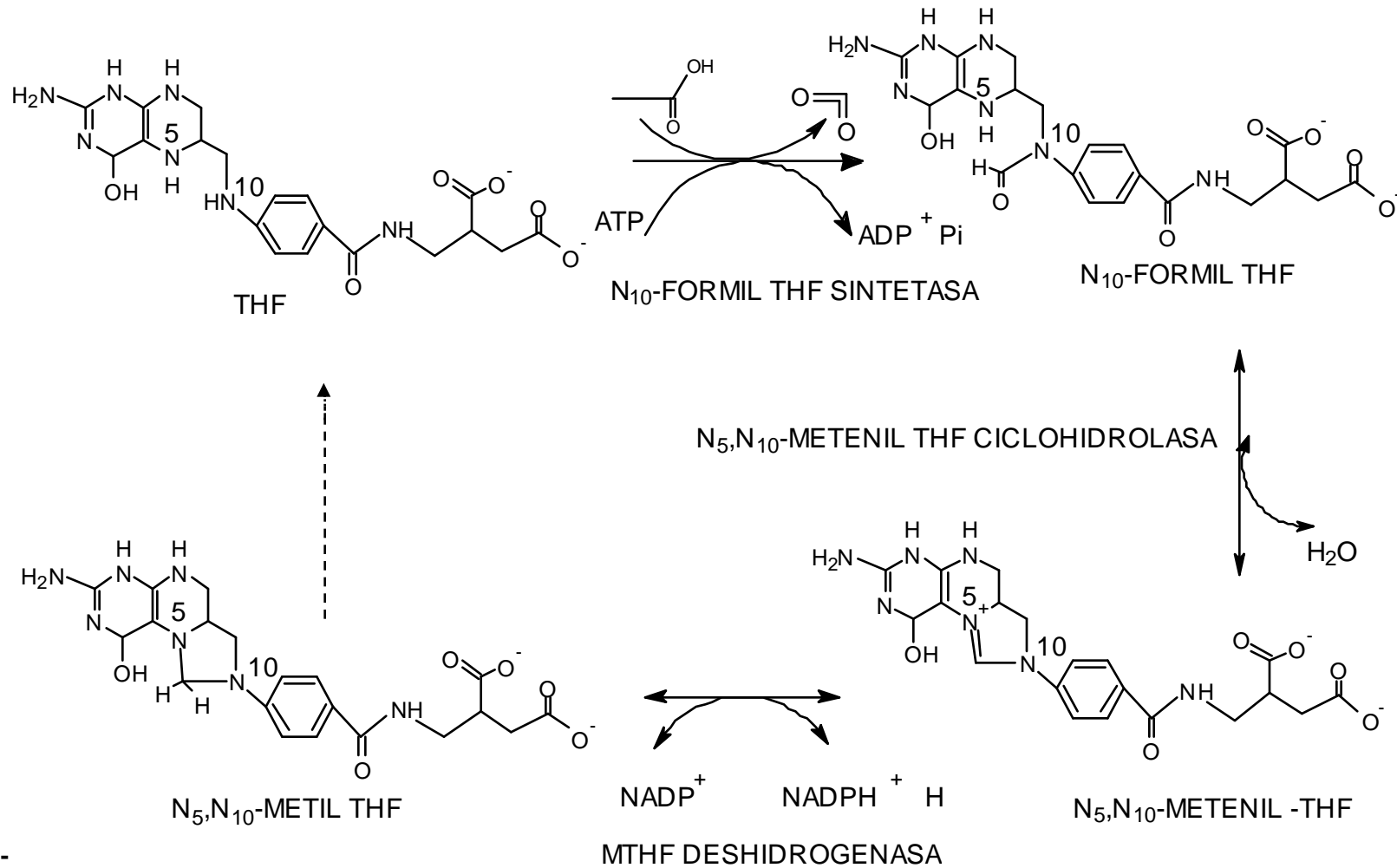


Figura 4. Reacciones catalizadas por la MTHFD1. Se indican la actividad catalítica de cada reacción, los sustratos y productos de cada una. La enzima MTHFD1 cataliza tres reacciones consecutivas, deshidrogenación del 5,10-Metilén THF, Hidrólisis del anillo formado por los átomos N5 y N10 del 5,10-Metenil THF, ambas reacciones catalizadas en el dominio N terminal de la enzima y finalmente en el dominio carboxilo terminal se lleva a cabo la incorporación de un grupo formilo al N10 de la molécula de 5,10-Metenil THF para formar el 10 -fomil THF.

El dominio bifuncional en el extremo N-terminal de la MTHFD1 abarca aproximadamente una tercera parte del polipéptido, contiene el sitio catalítico con actividad MTHFD y FTHFC, que actúa en forma NADP<sup>-</sup> dependiente, mientras que el dominio carboxilo terminal que constituye aproximadamente dos tercios de la proteína posee la actividad FTHFS dependiente de ATP (Van der Put et al., 1998) (fig 5).

Esta proteína puede encontrarse como una enzima bifuncional (mitocondrial) o como parte de la enzima trifuncional citosólica (Van der Put, 1998).

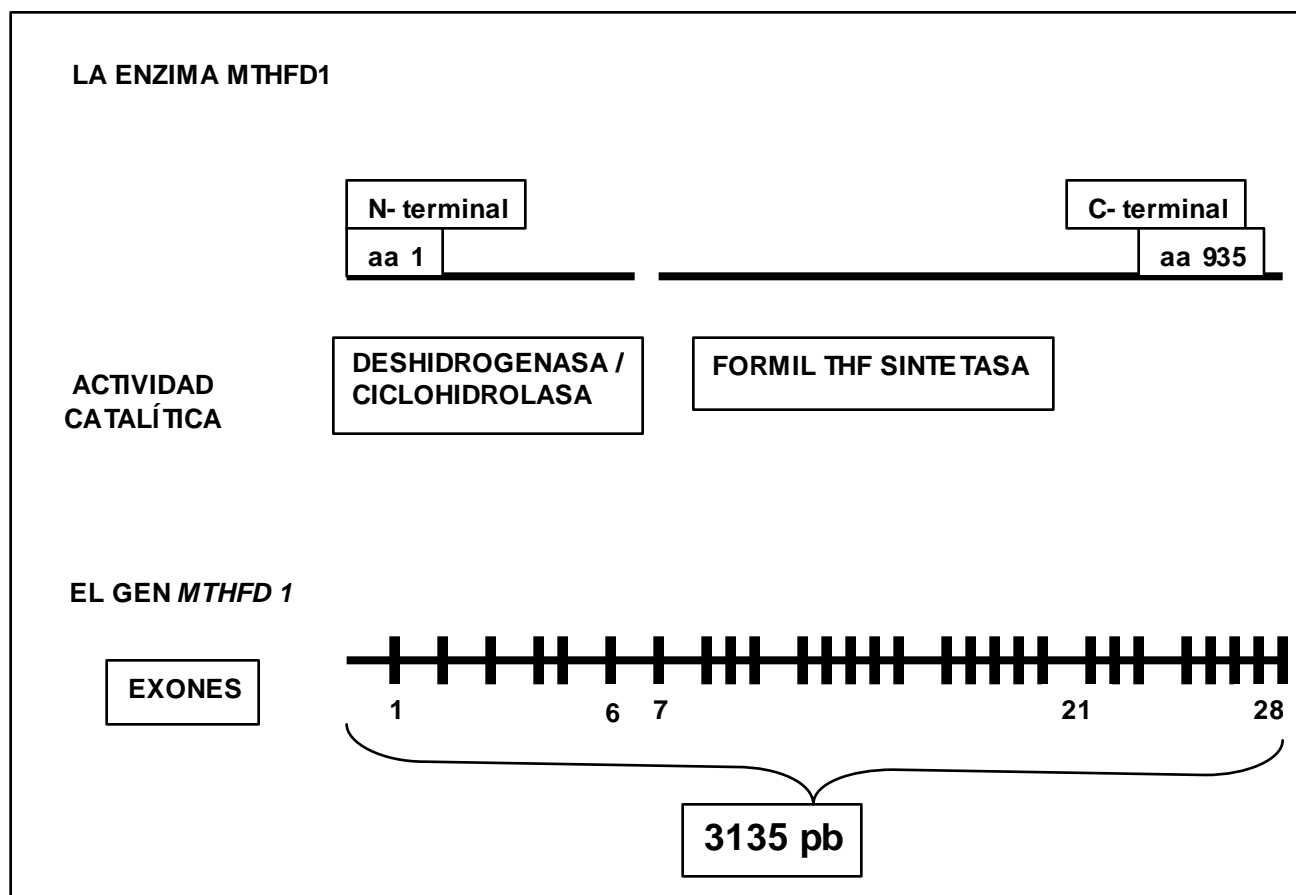


Figura 5. Esquema de los dominios en la MTHFD1 y su función catalítica. En la parte superior se muestra que el dominio N-terminal realiza las actividades Deshidrogenasa/Ciclohidrolasa y el dominio C-terminal que posee la actividad 10-Formil-THF sintetasa. El dominio N terminal es codificado en los exones 1-6 y el dominio C-terminal se codifica en los exones 7-28. En la parte inferior se muestran los 28 exones que componen el gen intercalados por sus respectivos intrones. El gen abarca una región de 3135 pb.

El sustrato 10-Formil THF (CH<sub>2</sub>THF) proporciona dos átomos de carbono (C<sub>2</sub> y C<sub>8</sub>) del anillo purínico (Van Der Put et al., 2001); las purinas forman parte de las cadenas de RNA, DNA, ATP y GTP. El 10-Formil THF se requiere para la formilación del tRNA (RNA de transferencia) iniciador empleado para la síntesis de proteínas, y en general, las moléculas producto de la oxidación de bases púricas (Radivoyevitch et al., 2005).

Se ha demostrado que el intercambio de metabolitos del folato entre las mitocondrias y el citoplasma afecta significativamente la cantidad de folatos en el citoplasma, en este caso, el 5,10-metilén THF puede ser generado tanto por la MTHFD1, la MTHFD2 o la SHMT.

### **El gen *MTHFD1***

El gen *MTHFD1* se encuentra en la región cromosómica 14q24, contiene 28 exones, la longitud del transcrito es de 3135 pb (fig.5). El cDNA humano para *MTHFD1* tiene un tamaño de 2805 pb con marco abierto de lectura que codifica una proteína de 935 aminoácidos (fig 5).

Éste gen se encuentra altamente conservado a lo largo de la evolución, ya que se presentan genes ortólogos en diversas especies procariones, insectos, plantas y hongos, así como rata, ratón, primates y otras (Brody et al., 2002).

El SNP MTHFD1 G1958A es asociado con mujeres que presentan abortos recurrentes (Mc Dermott et al., 2005) o con mayor incidencia de productos con NTDs (Brody et al., 2002), sin embargo no se ha descrito la forma en que este polimorfismo afecta el desarrollo embrionario o confiere mayor riesgo para algunos padecimientos.

La presencia del alelo mutante o algún genotipo particular para MTHFD1 1958 no se ha relacionado con hiperhomocisteinemia, bajos niveles de folato en plasma o eritrocitos, ni se han reportado datos sobre alteraciones en la actividad de esta enzima. Por lo tanto, es necesario establecer si este SNP altera el equilibrio en la ruta de folatos o disminuye la disponibilidad de metabolitos relacionados a otras rutas convergentes que puedan afectar el desarrollo embrionario.

### **El polimorfismo MTHFD1 G1958A**

La variante alélica G1958A, codifica una Arginina en la posición 653 del polipéptido, se localiza en el exón 21, dentro del dominio catalítico con actividad FTHFS. Dado que la mutación se encuentra en la región que codifica para la función FTHFS se propone que la deficiencia de 10-Formil-THF, sustrato para la síntesis de purinas, puede afectar tanto la tasa de síntesis de ácidos nucleicos como para reacciones de metilación; ambos procesos esenciales durante el desarrollo fetal. Además se sugiere que esto puede aumentar la incorporación errónea de nucleótidos durante la replicación.

Esta mutación reemplaza un residuo de Arginina (R) con carácter básico y carga positiva por una Glutamina (Q) que es un aminoácido polar sin carga, lo que podría alterar la estructura o la actividad de la enzima (Brody et al., 2002) (figs.6 y 7)

Especie	aminoácido	653
HUMANO	6 3 2 F V H A G P F A N I A H G N S S I I A D <b>R</b> I A L K L V G P E G F V V T E A G F G A	6 7 2
RATA	6 3 3 F V H A G P F A N I A H G N S S I I A D <b>R</b> I A L K L V G P E G F V V T E A G F G A	6 7 3
RATÒN	6 3 3 F V H A G P F A N I A H G N S S I I A D <b>R</b> I A L K L V G P E G F V V T E A G F G A	6 7 3
PONPY	6 3 3 F V H A G P F A N I A H G N S S I I A D <b>R</b> I A L K L V G P E G F V V T E A G F G A	6 7 3
XENTR	6 3 2 F V H A G P F A N I A H G N S S I I A D <b>K</b> I A L K L V G P E G F V V T E A G F G A	6 7 2
XENLA	6 3 2 F V H A G P F A N I A H G N S S I I A D <b>K</b> I A L K L V G P E G F V V T E A G F G A	6 7 2
TETNG	6 0 7 F V H A G P F A N I A H G N S S I I A D <b>K</b> I A L K L V G P E G Y V V T E A G F G A	6 4 7
BRARE	6 3 2 F V H A G P F A N I A H G N S S I I A D <b>K</b> I A L K L V G P Q G F V V T E A G F G A	6 7 2

Figura 6. El residuo R (Arginina) 653, marcado en negrita esta altamente conservado en distintas especies, en algunas especies el residuo encontrado es K (Lisina). R y K son aminoácidos con carga positiva de carácter básico, lo que sugiere que un cambio de polaridad en este residuo podría alterar la estructura de la enzima.

Abreviaciones: (PONPY) *Pongo pygmaeus*; (XENTR) *Xenopus tropicalis*; (TETNG) *Tetraodon nigroridias* (BRARE) *Brachydanio rerio* (pez zebra).

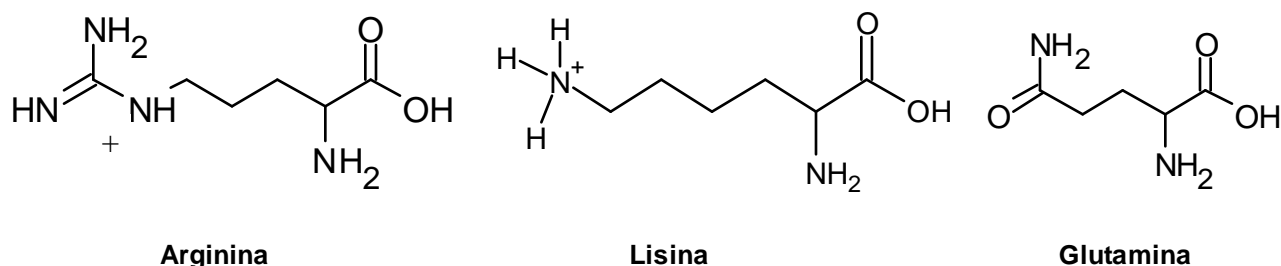


Figura 7. Estructura química de los aminoácidos involucrados en la mutación producida por el SNP MTHFD1 G1958A, la Glutamina (Q) es un aminoácido polar sin carga, mientras que la Arginina (R) y Lisina (K) tienen carga positiva, éste cambio de carga y el tamaño podrían alterar la estructura de la enzima y por lo tanto, su actividad.



Se realizó el análisis computacional para determinar si la mutación produce alteraciones conformacionales en la proteína mediante el programa *mut-SCRATCH*, donde se encontró que R es un residuo expuesto (fig. 8) y forma parte de una  $\alpha$ -hélice dentro de la estructura de la proteína. Por este método no se detectan cambios que puedan afectar la estructura secundaria de la enzima por el cambio a Q, aunque no está descrita en la literatura alguna referencia de la actividad enzimática con respecto al SNP en estudio (fig.8).

## RESULTADO DEL ANÁLISIS COMPUTACIONAL

**S.** -SILVESTRE

**M.** - MUTANTE

### 1. - Secuencia primaria.

653

**S.** -DLGVSGALTVLMKDAIKPNLMQTLEGTPVVFVHAGPFANIAHGNSSI IAD**R**I ALKLVGPXX

**M.** -DLGVSGALTVLMKDAIKPNLMQTLEGTPVVFVHAGPFANIAHGNSSI IAD**Q**I ALKLVGPXX

### 2. - Predicción de la estructura secundaria:

**H.** Hélice

**E.** Cadena

**C.** El Resto

**T.** Giro

653

**S.** -HCCCHHHHHHHHHHHHHCCCHHHHCCCEEE ECCCCHHHCCCCCHHHHHHH**H**HHHHCCCC

**M.** -HCCCHHHHHHHHHHHHHCCCHHHHCCCEEE ECCCCHHHCCCCCHHHHHHH**H**HHHHCCCC

### 3. - Predicción del tipo de estructura secundaria

**H.**  $\alpha$ -Hélice

**E.** Cadena extendida

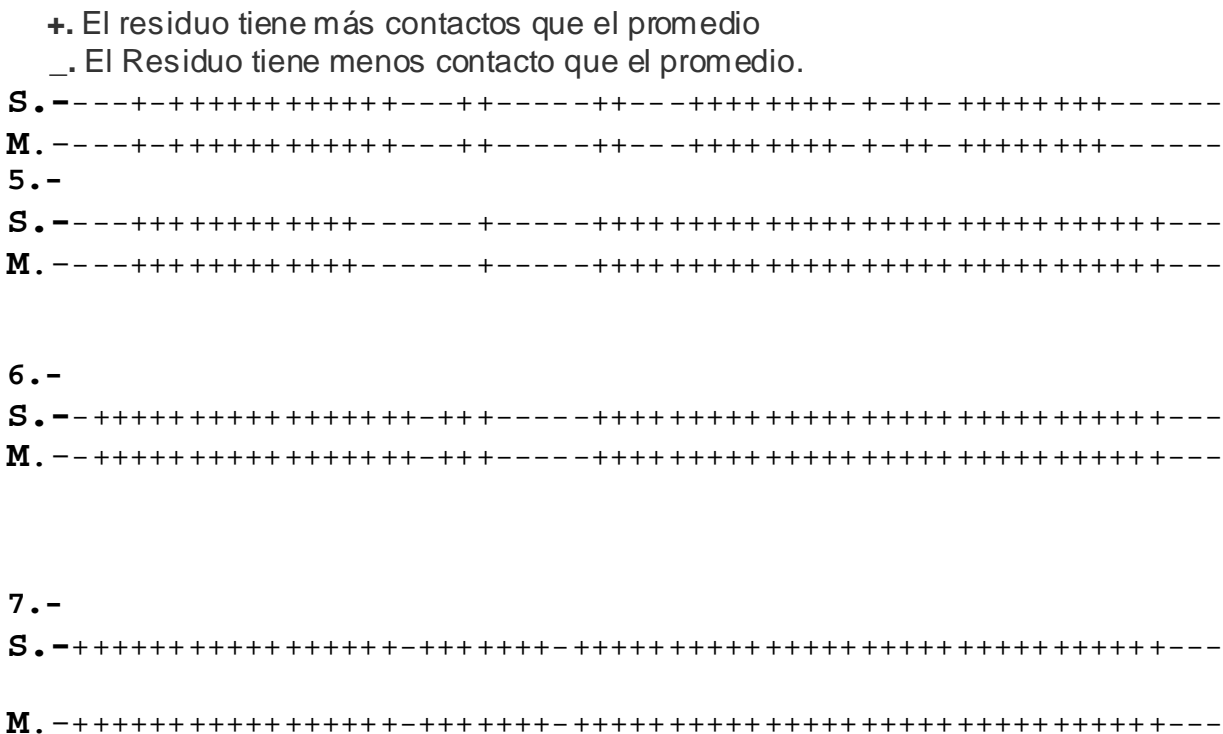
**C.** El Resto

**T.** Giro

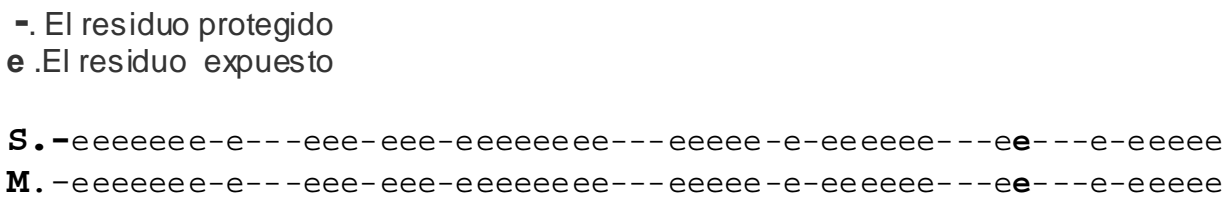
**S.** -HHT. .HHHHHHHHHH .HHHHHHHTT . .EEEE. . .HHHHHTT .HHHHHHHHHHHHHHHH

**M.** -HHT. .HHHHHHHHHH .HHHHHHHTT . .EEEE. . .HHHHHTT .HHHHHHHHHHHHHHHH

4-7.- Predicción del número de residuos en contacto a 6, 8,10 y 12 Å



8.- Predicción de la accesibilidad relativa.



**Figura 8.** Resultado del análisis computacional para predecir los efectos del cambio de aminoácido 653 R - Q en la enzima MTHFD1. No se observan cambios en el tipo de estructura secundaria (2 y 3), la disposición o interacción de aminoácidos expuestos (4-7), la exposición relativa de los residuos (8).

## **ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO MTHFD1 G1958A CON ENFERMEDADES**

La presencia del alelo *MTHFD1* 1958 A puede tener relación con la presentación de NTD's como se ha observado en poblaciones turca, alemana e irlandesa. Se ha descrito una elevada frecuencia del alelo *MTHFD1* 1958A en población mexicana (tabla 4) en forma similar a lo encontrado en otras poblaciones (Min Shi et al., 2003).

Un estudio en población irlandesa observó que el genotipo AA materno es un factor de riesgo para el desarrollo de NTDs en sus hijos (Brody et.al 2002 y 2006).

Por otro lado se ha reportado que mujeres homocigotas para este alelo presentan un mayor riesgo de presentar pérdida abrupta placentaria en población alemana (Mc Dermott et al., 2005).

Un modelo matemático que simula el funcionamiento de metabolitos de los folatos con base en el comportamiento de las diversas enzimas relacionadas indica que la homeostasis de los folatos depende principalmente de las enzimas SHMT, FTHFS y FTHFD (Formil THF Deshidrogenasa) (Nijhout et al., 2004).

La variante *MTHFD1* 1958A en interacción con un polimorfismo en el gen de la Timidilato Sintasa (TS) que se encuentra en la región no traducida de repetidos 5', son factor de riesgo para la disminución de sobrevida libre de enfermedad en pacientes pediátricos con leucemia linfocítica aguda (LLA) tratados con metotrexate (De Jorge, et al., 2005).

Diversos autores han propuesto que algunos SNPs en genes que pertenecen al metabolismo de los folatos pueden aumentar la demanda de colina como grupo donador de unidades C1 al disminuir su biodisponibilidad ya que se encuentran en diversas formas unidas a folatos. (Kohlmeier et al., 2005).

Experimentos realizados por Kohlmeier y colaboradores (2005) donde humanos son sometidos a la deprivación de colina a largo plazo, muestran una rápida disminución de folatos séricos durante semanas o meses, la variante MTHFD1 1958A es el mejor predictor para susceptibilidad a desarrollar signos clínicos característicos de la carencia de colina.

Un hallazgo importante es una significativa disminución de SAH en los sujetos GG en comparación con los portadores del alelo mutante. La acumulación de SAH actúa como un potente inhibidor de diversas metiltransferasas, de modo que representa un indicador del balance entre las rutas de transmetilación y transulfuración.

La elevación de S-adenosil homocisteína (SAH) perturba el equilibrio entre 5-metilén THF y 10-formil THF disminuyendo la disponibilidad de 5-metil THF para la síntesis de metionina, colina y en general el flujo de grupos metilo (Kohlmeier et al., 2005).

Asimismo la deficiencia de colina muestra dificultad en la remoción de homocisteína, lo que lleva al desarrollo de hiperhomocisteinemia debido a que el metabolismo de colina, metionina y metilfolatos se unen mediante la formación de metionina a partir de la homocisteína. (Kohlmeier et al., 2005).

En condiciones de bajas concentraciones de SAM se llevan a cabo modificaciones en la metilación y desaminación de nucleótidos, de manera que las citosinas son convertidas en uracilos provocando también uniones aberrantes de proteínas con dominios de unión al ADN, éstas proteínas reconocen regiones con secuencias ricas en C y G, importantes en la regulación epigenética (Dimitrova, et al., 2002).

Los datos antes mencionados indican que la genotipificación del alelo *MTHFD1* G1958A es importante para la investigación de polimorfismos que confieren un mayor riesgo a desarrollar diversas enfermedades.

## **MATERIALES**

### **DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS**

300 muestras de ADN genómico de la población mexicana reportada por Guéant-Rodríguez y colaboradores en el 2006; incluye 150 individuos femeninos y 150 masculinos.

Ésta muestra proviene de donadores que acuden al banco de sangre del INCMNSZ, los cuales son mexicanos de nacimiento con ascendencia mexicana de al menos dos generaciones.

De las 300 muestras se cuenta con 287 valores de homocisteína, 282 de folatos y 281 de vitamina B12 para el análisis (Anexo 1 Tabla 18).

Para el análisis del efecto de los genotipos en las concentraciones de folatos, homocisteína y vitamina B12 se excluyeron 27 datos que se encontraban fuera del intervalo de confianza del 95% (Anexo 1 tabla 19)

Los datos disponibles acerca de las muestras son:

- Código de identificación
- Sexo
- Edad (Años)
- Concentración de homocisteína plasmática (HCY mmol/L)
- Concentración de folatos en plasma (ng/L)
- Concentración de Vitamina B12 (pg/ml) (Anexo 1 Tabla 18)

## **METODOLOGÍA:**

La genotipificación de la variante MTHFD1 G1958A se realizó mediante la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y posterior análisis de los fragmentos de restricción (RFLP o Restriction fragment length polymorphisms) con la enzima *HpaII*, identificando los genotipos de cada individuo por observación de los patrones de migración de electroforesis en gel de poliacrilamida.

Las determinaciones de homocisteína, folatos y vitamina B12 se obtuvieron del estudio reportado por Guéant-Rodríguez (2006) con la colaboración del departamento de genética médica del INCMNSZ (Consultar la referencia).

## **CUANTIFICACIÓN DEL ADN GENÓMICO**

A partir del ADN genómico se realizó la cuantificación diluyendo 1  $\mu\text{L}$  de la muestra de ADN en 999  $\mu\text{L}$  de agua estéril midiendo la absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 260 nm para ácidos nucleicos y 280 nm para proteínas, el factor de las lecturas a 260/280 nm  $\geq 1.7$  corresponde a un ADN no degradado y libre de proteínas. Cada determinación se realizó con el promedio del triplicado de las lecturas homogeneizando la dilución entre cada lectura y empleando como blanco agua estéril para cada muestra.

A partir de las concentraciones obtenidas en la cuantificación se realizó la dilución necesaria para obtener una solución con una concentración final de 100 ng/ $\mu\text{L}$  de ADN para cada muestra.

## REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para determinar las condiciones óptimas de la amplificación se realizó una PCR con gradiente de temperaturas de alineamiento empleando el siguiente par de oligonucleótidos cebadores:

F- 5'-CACTCCAGTGTTTGTCCATG-3' y R- 5'-GCATCTTGAGAGCCCTGAC-3' (Van der Put et al., 1998).

Los oligonucleótidos seleccionados flanquean el exón 21 del gen *MTHFD1* humano y generan un producto de PCR de 330 pb.

### Secuencia de la región amplificada del gen *MTHFD1*

```
CACTCCAGTGTTTGTCCA TGCTGGCCCGTTTGCCAA CATCGCACATGGCAA TTCCTCC  
ATCATTGCAGA c↓ cGg GTCGCACTCAAGCTTGTGGCCAGAAGGGTTTGTAG  
1958  
gtagtggtttttgcaaaaccagtgaa tagactgtatgtttcttttaacatcaggggaat  
tgggatggcatttttactgttgctttcctctttacag  
  
TGACGGAAGCAGGATTTGGAGCAGACATTGGAATGGAAAAGTTTTTTAACATCAAATG c↓  
CGG TATT c↓ CGG CCTCTGCCCCACGTGGTGG TGCTTGTGCCACT  
GTCAGGG CTCTCA AGATGC
```

Figura 9. Se muestra en mayúsculas la secuencia exónica y en minúsculas el intrón localizado entre los exones 21 y 22 correspondientes a la región amplificada.

La secuencia reconocida por los oligonucleótidos se indica subrayada en la figura. La secuencia reconocida por la enzima *Hpa II* se indica en negritas (que induce el SNP *MTHFD1* G1958A con letra de mayor tamaño) y las flechas señalan los 3 sitios de corte realizados por la enzima.

### CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

Por cada muestra se realizó una PCR en 25  $\mu$ L, para cada una se emplearon 100 ng de ADN genómico, amortiguador 1X,  $MgCl_2$  1.5 mM, dNTPs 100  $\mu$ M, oligonucleótidos iniciadores sentido (F), antisentido (R) 10  $\mu$ M cada uno y ADN *Taq* polimerasa (1U).



El programa de PCR consistió en:

1. Desnaturalización previa a 94°C 5 min 1 ciclo
2. Desnaturalización 94°C 1 min.
3. Tm de prueba 1 min
4. 72°C 1 min ( 35 ciclos pasos 2-4)
5. 72°C 5 min
6. 4°C∞

### **ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE PCR**

Las temperaturas de prueba se eligieron de acuerdo a la Tm (temperatura de desnaturalización) incluida en el inserto del proveedor de los oligonucleótidos y el calculado por la fórmula:

$$T_m = (2 \times AT) + (4 \times GC)$$

$$\text{Para F } T_m = (2 \times 10) + (4 \times 10) = 60 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$\text{Para R } T_m = (2 \times 8) + (4 \times 11) = 60 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Las temperaturas de prueba para la fase de alineamiento fueron 53.0, 53.3, 54.5, 56.3, 58.6, 61.1, 63.9, 66.5, 69.0 °C para cada tubo de reacción, respectivamente.

Los resultados obtenidos fueron:

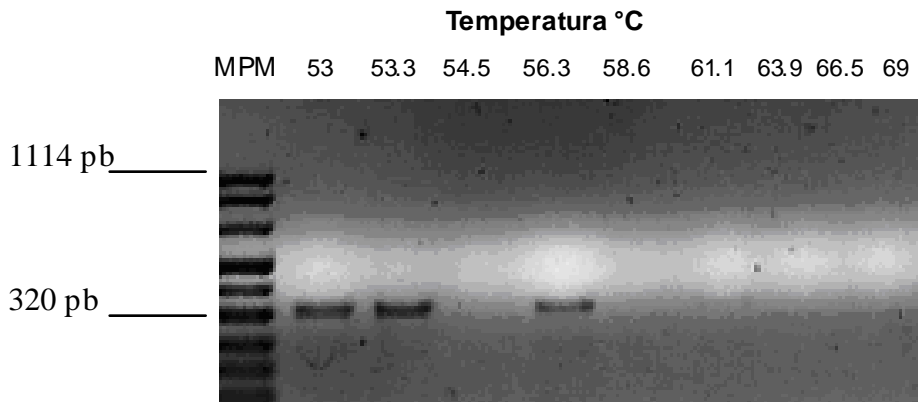


Figura 10. Fotografía de las bandas de amplificadas resultantes de la PCR con gradiente de temperaturas. Del lado izquierdo se muestran los tamaños de las bandas correspondientes al marcador de pesos moleculares (MPM) y en la parte superior las temperaturas empleadas en el gradiente.

Los productos de amplificación obtenidos se visualizaron en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se observó que a las temperaturas de 53, 53.3 y 56.3 °C se obtuvieron amplificadas intensos con un tamaño de 330 bp en la región que abarca los nucleótidos localizados en la posición 1888-2218 del gen *MTHFD1*. La banda que mostró mayor intensidad correspondió a una  $T_m$  de 53.3 °C (Fig. 10).

Con los resultados anteriores se eligió la temperatura de alineamiento de 53.3 °C para realizar la PCR de todas las muestras (Fig.11)

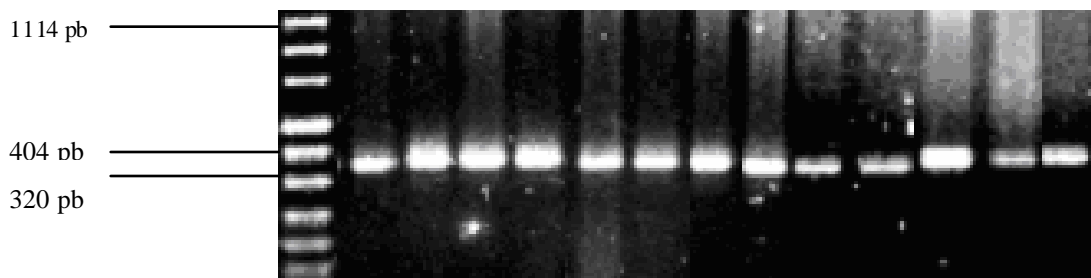
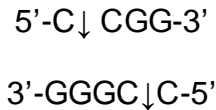


Figura11. Productos de amplificación empleando las condiciones indicadas a una  $T_m$  de 53.3°C

## GENOTIPIFICACIÓN

El polimorfismo MTHFD1 G1958A se detectó mediante la digestión del producto de PCR con la enzima de restricción *Hpa II* que realiza un corte de doble cadena en la secuencia:



Con la presencia del alelo MTHFD 1958A se pierde el sitio de restricción:

Alelo Silvestre	Alelo mutante
C $\downarrow$ CGG	CCAG

La digestión se llevó a cabo con un volumen de 13 –20  $\mu\text{L}$  del producto de PCR, 1U de *Hpa II*, 2.5  $\mu\text{L}$  de buffer 10X y  $\text{H}_2\text{O}$  estéril cbp 25  $\mu\text{L}$  por reacción.

Los productos de digestión se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 20% teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), donde se identificaron las bandas esperadas para los diferentes genotipos y no se observaron bandas adicionales.

En la electroforesis, los patrones de migración de los productos de digestión esperados son de los siguientes tamaños:

- Homocigoto mutante (**Ho**) [1958 AA]: 266, 56 y 8 pb
- Heterocigoto (**Het**) [1958 GA]: 266, 196, 70,56 y 8 pb
- Homocigoto silvestre (**S**) [1958 GG]: 196, 70, 56 y 8 pb

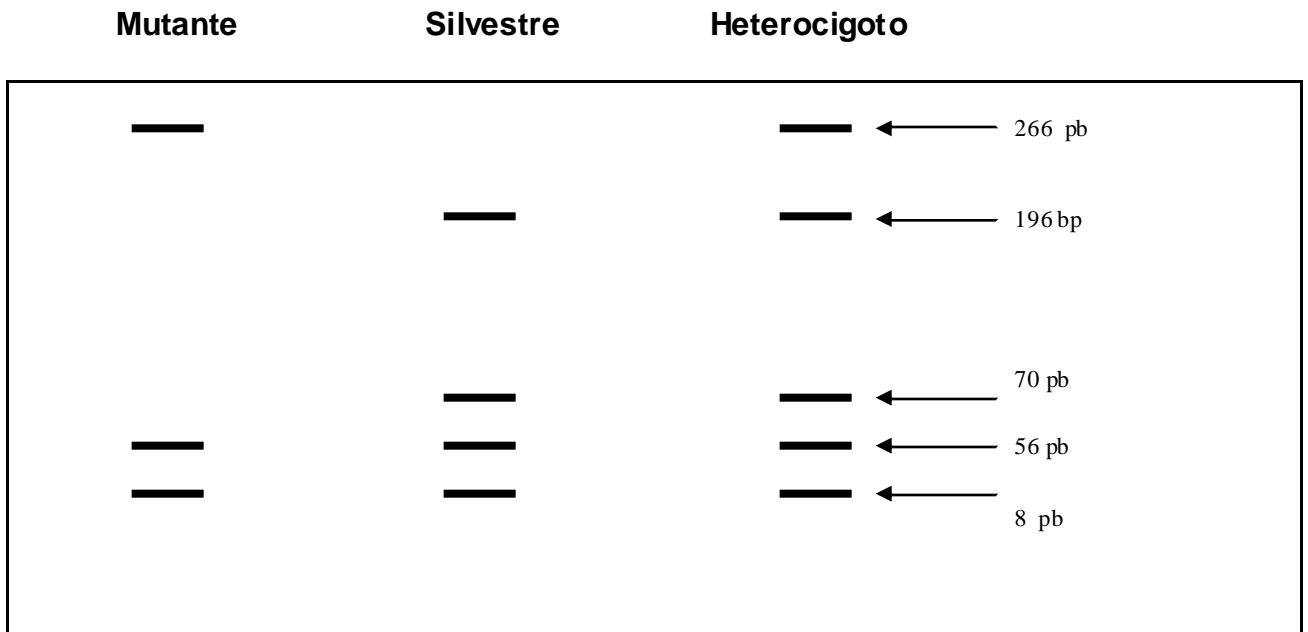


Figura 12. Bandas esperadas para los productos de digestión en distintos genotipos.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de las frecuencias genotípicas para el equilibrio de Hardy - Weinberg se llevó a cabo con la prueba  $X^2$  de bondad y ajuste.

El análisis estadístico de los niveles de folatos, Vitamina B12 y homocisteína en relación a los genotipos se realizó con el programa estadístico SPSS 13.0 empleando la prueba de t de Student para la comparación de promedios.

Se considera diferencia estadísticamente significativa una significancia ( $p$ )  $\leq 0.05$  en un intervalo de confianza del 95%.

## CÁLCULOS

### Frecuencia de genotipos (%)

$F = \text{No. de individuos con el genotipo X} / \text{No. total de individuos analizados}$

Total = 300 individuos (150 hombres + 150 mujeres)

### Frecuencia alélica

No. de cromosomas totales = 2 x # Individuos analizados

$G = p = (\text{\# de Homocigotos silvestres} + (\text{\# de heterocigotos} / 2)) / \text{\# de cromosomas totales}$

$A = q = (\text{\# de Homocigotos mutantes} + (\text{No. de heterocigotos} / 2)) / \text{No. de cromosomas totales}$

### Cálculo de $X^2$ para la prueba de bondad y ajuste del equilibrio de Hardey -Weinberg

#### Calculo de Frecuencias esperadas

$$X^2 = \sum [(\text{Observados} - \text{Esperados})^2 / \text{Esperados}]$$

$p$  = Frecuencia observada del alelo silvestre (MTHFD1 1958G)

$q$  = Frecuencia observada del alelo mutante (MTHFD 1958 A)

$p^2$  = Frecuencia Esperada de individuos GG

$2pq$  = Frecuencia Esperada de individuos GA

$q^2$  = Frecuencia Esperada de individuos AA

### Prueba de t de Student

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S \cdot \sqrt{\frac{1}{X_1} + \frac{1}{X_2}}}$$

$\bar{X}_1$  = Promedio del primer grupo a comparar

$\bar{X}_2$  = Promedio del segundo grupo

S = Varianza

$(S \cdot \sqrt{\frac{1}{X_1} + \frac{1}{X_2}})$  = Error estándar combinado

**RESULTADOS:**

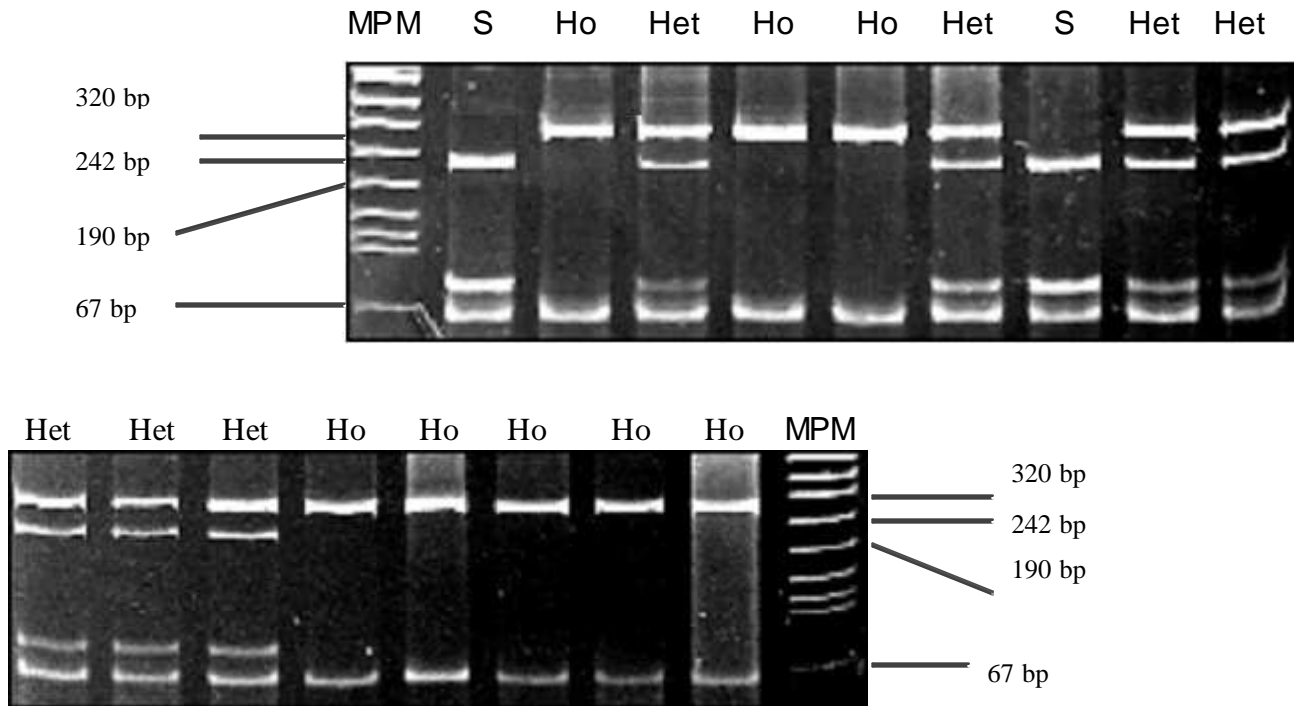


Figura 13. Muestra dos fotografías (no se muestran todas) obtenidas de los geles donde se pueden observar los diferentes patrones de bandas para los productos de digestión enzimática. A los costados se muestran señaladas las bandas del Marcador de Pesos Moleculares (MPM) y en la parte superior los genotipos correspondientes a cada muestra. La banda de 8 pb no se observa por ser muy pequeña. **Abreviaciones S:** Silvestre, **Het:** Heterocigoto y **Ho:** Homocigoto.

**Tabla 2. Frecuencia de Genotipos**

	Total	M	F
	No. (%)	No. (%)	No. (%)
<b>GG</b>	48 (16)	22 (14.7)	26 (17.3)
<b>GA</b>	164 (54.7)	83 (55.3)	81 (54.0)
<b>AA</b>	88 (29.3)	45 (30.0)	43 (28.7)
<b>Frecuencia G</b>	0.43	0.42	0.44
<b>Alélica A</b>	0.57	0.58	0.56

Se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas en la muestra total y para cada sexo. Tanto las frecuencias genotípicas como alélicas son muy parecidas en individuos del sexo masculino **M**, como femenino **F**.

FRECUENCIAS DE GENOTIPOS PARA EL POLIMORFISMO MTHFD1 G1958A

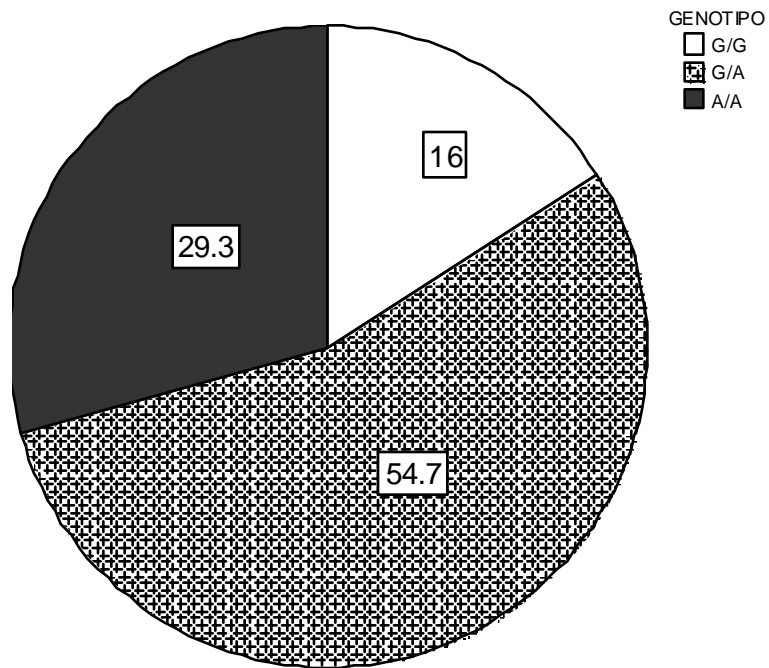
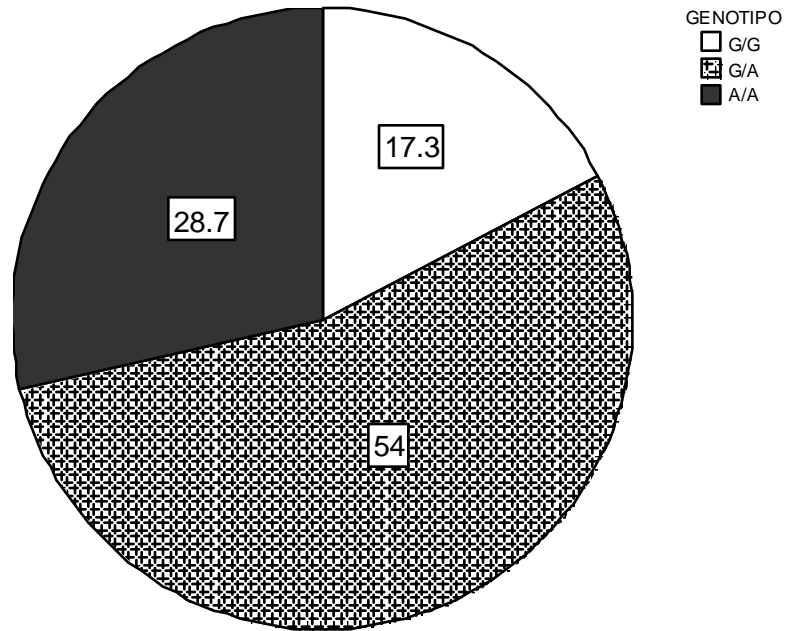


Figura 14. Distribución de los genotipos en la población total.

FRECUENCIAS DE GENOTIPOS EN MUJERES PARA EL POLIMORFISMO MTHFD1 G1958A



FRECUENCIAS DE GENOTIPOS EN HOMBRES PARA EL POLIMORFISMO MTHFD1 G1958A

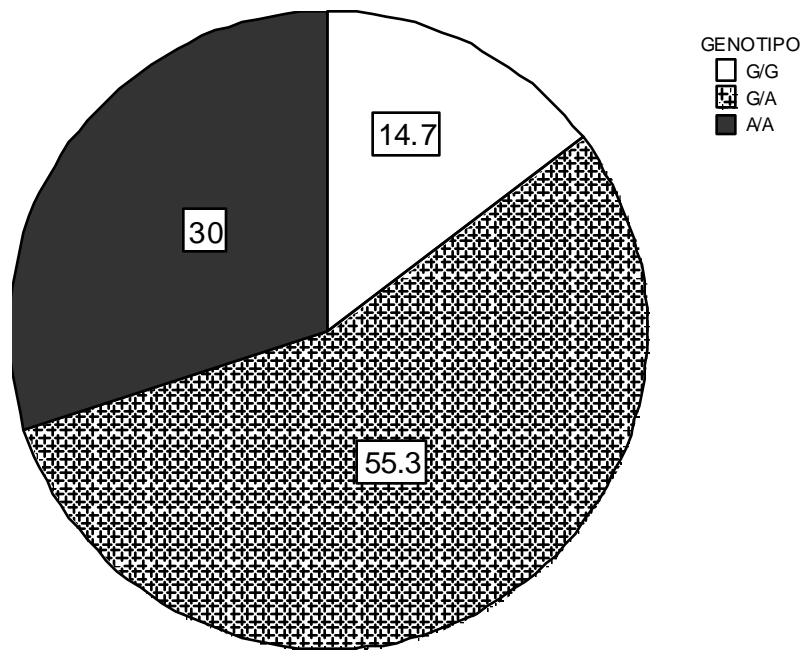


Figura 15. Distribución de los genotipos en la población Femenina y masculina



**Tabla 3. Frecuencias de genotipos observados y esperados para el equilibrio de Hardey- Weinberg**

<b>Genotipo</b>	<b>Esperados</b>	<b>Observados</b>
<b>GG</b>	56.33	<b>44</b>
<b>GA</b>	147.33	<b>168</b>
<b>AA</b>	96.33	<b>88</b>

Valores esperados calculados para la prueba de bondad y ajuste de Hardey-Weinberg. M: Masculino; F:Femenino.

$$X^2 = 3.83$$

$$X^2 (\text{de tablas}) = 3.84 \quad p > 0.05$$

Tabla 4. Frecuencia alélica y de genotipos para MTHFD 1958 G-A en distintas poblaciones

Población	Frecuencias alélicas			Frecuencia del genotipo (%)		
	Tamaño de la muestra	Frecuencia alélica (G)	Frecuencia alélica (A)	GG	GA	AA
Israel	148	0.53	0.47	31.08	44.6	24.32
Pakistan	200	0.51	0.49	27	47	26
China	183	0.81	0.19	65	31.15	3.82
Liberia	23-25	0.92	0.08			
Japón	27-31	0.74	0.26			
Francia	50-53	0.49	0.51			
Italia	44-50	0.61	0.39			
Rusia	23-25	0.56	0.44			
Estados Unidos	54	0.63	0.37	37	52	11
Colombia	12-13	0.35	0.65			
Brasil	45	0.2	0.8	6.66	26.6	66.6
Europa (Grupo)	117	0.55	0.44	33.3	44.4	22.2
África (grupo)	127	0.83	0.16	69.29	28.34	2.36
México (CEPH)	50	0.39	0.61	12	54	34
México (IMEGEN)	1100	0.42	0.58	18	48.6	33.4
México	300	0.43	0.57	16	55	29
Estudio presente						

Se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas para el polimorfismo MTHFD1 G1958A (basada en datos publicados por Min Shi et al., 2003; Zolezzi et al., 2006). Un estudio en el *Human Diversity Panel of Variants in Folate Pathway Genes* reporta una frecuencia del 61% para alelo 1958A en 50 muestras de población mexicana sana, de las diversas poblaciones analizadas, México ocupa el sexto lugar con mayor frecuencia para el alelo mutante de un total de 24 países de América, Europa, Asia y África.

Tabla 5. Prueba de  $\chi^2$  Comparación del número de individuos de cada genotipo con lo observado en otras poblaciones (2 g.l.)

Población comparada	$\chi^2$	<i>p</i>
Mexicana (CEPH)	0.40	0.8183
Mexicana (IMEGEN)	3.43	0.1798
Pakistán	8.96	0.01132
Israel	13.59	0.0011
Estadounidense	16.33	0.00028
Europa	15.37	0.000458
Brasil	24.26	$1 \times 10^{-6}$
África	123.21	$1 \times 10^{-6}$
China	130.36	$1 \times 10^{-6}$

Resultados de la prueba de  $\chi^2$  para la comparación de las frecuencias genotípicas en la población mexicana vs datos reportados en la literatura en la misma población y con poblaciones de origen étnico distinto. Se considera una  $p < 0.05$  como diferencia significativa.

## EDAD

Se analizó la distribución de las edades para hombres y mujeres, ya que está documentado que entre los factores que alteran los niveles de homocisteína, se encuentran la edad y el sexo, se realizó una prueba de t de Student para determinar si hay diferencias de edad entre hombres y mujeres.

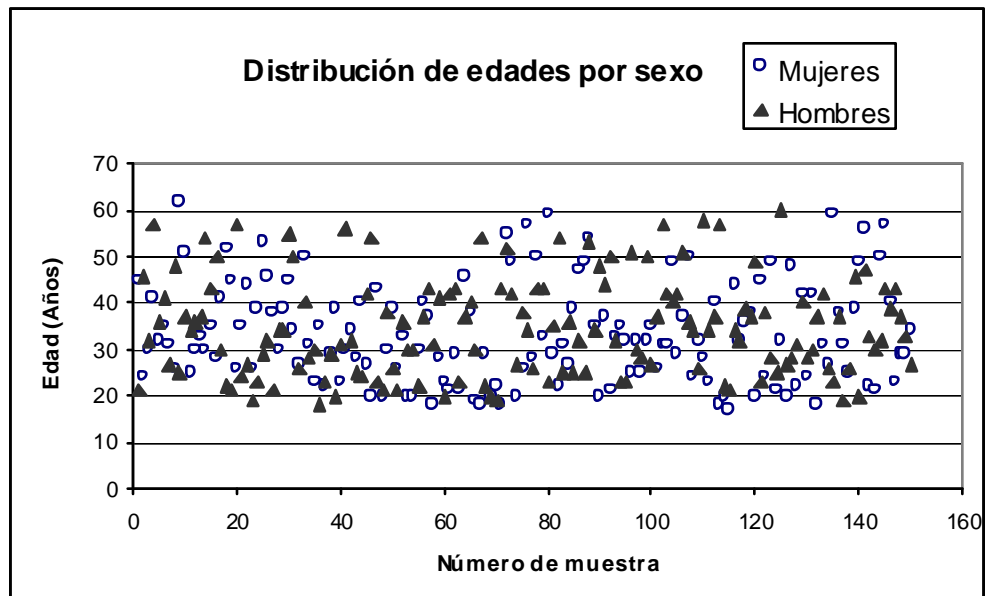


Figura 16. Gráfica de distribución de edades por sexo, se puede observar que la distribución para ambos sexos no difiere.

Tabla 6. Prueba de t para igualdad de promedios comparación de edades por sexo

		NUMERO	PROMEDIO	DESVIACIÓN STD
EDAD	F	150	33.37	10.77
	M	150	34.72	10.66
		t	g.l	Sig.
		1.088	298	0.277

Se muestran el número, los promedios y la desviación estándar para las edades de individuos del sexo femenino y masculino. Los resultados para la prueba de t de Student comparando los promedios de edad entre sexos, no muestran diferencia significativa. F.Sexo femenino M.Sexo Masculino

		Homocisteína F	Homocisteína M	Folatos F	Folatos M	VitB12 F	VitB12 M
N	Muestras con dato	128	132	125	130	125	130
	Promedio	8.547	11.79	8.860	7.772	452.511	439.7938
	Mediana	8.100	11.340	7.810	7.370	416.100	342.910
	Desviación Std.	2.689	3.1943	3.895	3.440	236.319	343.381
	Varianza	7.233	10.20	15.178	11.834	55846.843	117910.5
	Mínimo	4.62	5.72	2.47	2.30	108.43	73.19
	Máximo	19.14	25.48	20.04	18.27	1169.69	1916.51

Niveles de homocisteína, folatos y vitamina B12 por sexo. Existe una notable diferencia entre sexos para concentraciones de homocisteína así como las pequeñas variaciones en niveles de folatos y vitamina B12 entre sexos, donde las mujeres tienden a presentar mayores concentraciones de folatos y vitamina B12. F.Sexo femenino M.Sexo Masculino

	Homocisteína ( $\mu\text{Mol/L}$ ) G/G	Homocisteína ( $\mu\text{Mol/L}$ ) G/A	Homocisteína ( $\mu\text{Mol/L}$ ) A/A
N	41	143	76
Muestras con dato			
Muestras S/ Dato	3	9	5
Promedio	9.633	10.262	10.277
Mediana	8.260	9.970	9.675
Desviación Std.	3.758	3.007	3.761
Varianza	14.124	9.041	14.145
Mínimo	4.86	4.62	4.82
Máximo	19.17	20.16	25.48

Los niveles de homocisteína para los distintos genotipos muestran que el genotipo GG presenta niveles menores que los individuos GA y los niveles mas altos son para los AA.

		G/G	G/A	A/A
N	Muestras con dato	39	140	76
	Promedio	8.942	8.525	8.915
	Mediana	8.250	7.505	7.57
	Desviación Std.	2.848	4.145	4.639
	Varianza	8.110	17.178	21.527
	Mínimo	4.77	2.47	2.60
	Máximo	14.43	22.07	22.69

Los niveles de folatos en los individuos GG se encuentran ligeramente elevados en comparación de los portadores del alelo mutante (GA y AA) aunque los GA son los que presentan los niveles mas bajos.

		G/G	G/A	A/A
N	Muestras con dato	39	140	76
	Promedio	442.966	464.488	425.304
	Mediana	397.1300	397.1250	372.7250
	Desviación St.	257.561	325.558	232.386
	Varianza	66337.810	105987.852	54003.161
	Mínimo	89.46	107.08	73.19
	Máximo	1169.69	1916.51	1021.96

Las concentraciones séricas de vitamina B12 para los distintos genotipos muestran que los individuos AA presentan menores niveles que aquellos que poseen el alelo silvestre (GG o GA).

Tabla 11. Prueba de t de Student para niveles de Homocisteína, Folatos y vitamina B12 por sexo

	SEXO	N	Promedio	t	$p$
Homocisteína ( $\mu\text{Mol/L}$ )	F	128	8.51	9.166	1.6E-17
	M	132	11.80		
Folatos (ngl/mL)	F	125	9.08	1.590	0.113
	M	130	8.34		
Vitamina B12 (ngl/mL)	F	125	451.36	1.139	0.256
	M	130	447.74		

Se muestran los resultados del análisis de comparación de promedios para los niveles de homocisteína, folatos y vitamina B12 entre sexos, las mujeres tienen niveles significativamente menores de homocisteína que los hombres, además tienen niveles un poco mayores de folatos y vitamina B12 aunque no existe diferencias estadísticamente significativas. Se toma en cuenta un intervalo de confianza del 95% y una p significativa menor a 0.05. (**M**) Masculino; (**F**) Femenino; (**N**) Número de datos; (**P**) Promedio; (**t**) t de Student; (**p**) Significancia.

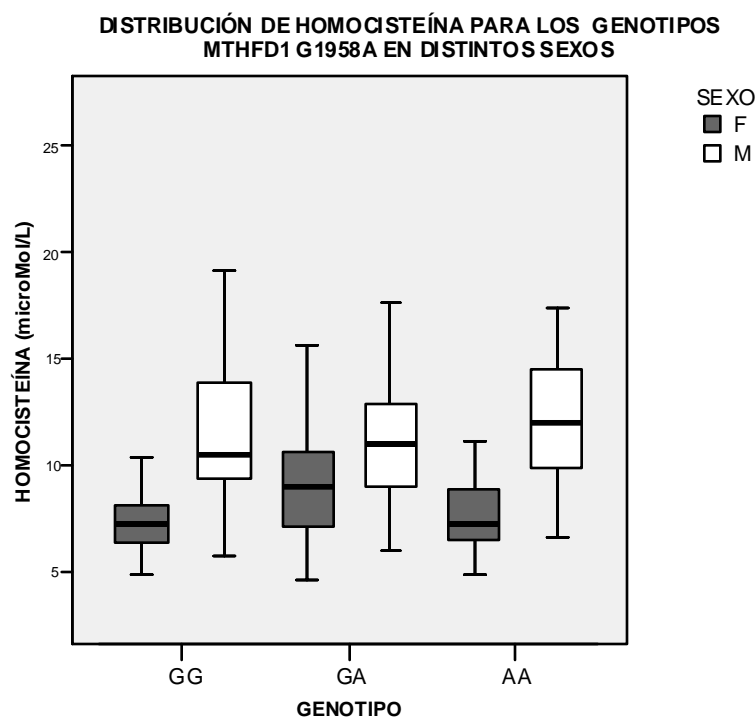


Figura 17. Distribución de los niveles de Homocisteína por sexo y genotipo

Tabla 12. Valores de Homocisteína por sexo y genotipo

	Mujeres G/G	Hombres G/G	Mujeres G/A	Hombres G/A	Mujeres A/A	Hombres A/A
Muestras Con Dato	22	19	70	73	36	40
Promedio	7.190	11.752	9.305	11.520	7.790	12.346
Mediana	7.275	10.83	8.995	10.855	7.230	12.13
Desviación Std	1.275	3.7361	3.013	3.469	2.182	3.517
Varianza	1.625	13.958	9.078	12.037	4.762	12.367
Mínimo	4.86	5.72	4.62	6.01	4.82	6.68
Máximo	10.39	19.17	19.14	21.88	13.56	25.48

Los valores de homocisteína por sexo para cada genotipo muestran que las mujeres mantienen menores niveles de homocisteína que los hombres para los tres genotipos. En mujeres los niveles menores de homocisteína se encuentran en los individuos GG y las portadoras del alelo mutante los niveles mayores, aunque aquellas con genotipo GA tienen los niveles más elevados de los 3 genotipos. En hombres los portadores del alelo silvestre tienen niveles menores que los individuos AA, estos últimos son los que poseen los valores más altos de homocisteína en general.

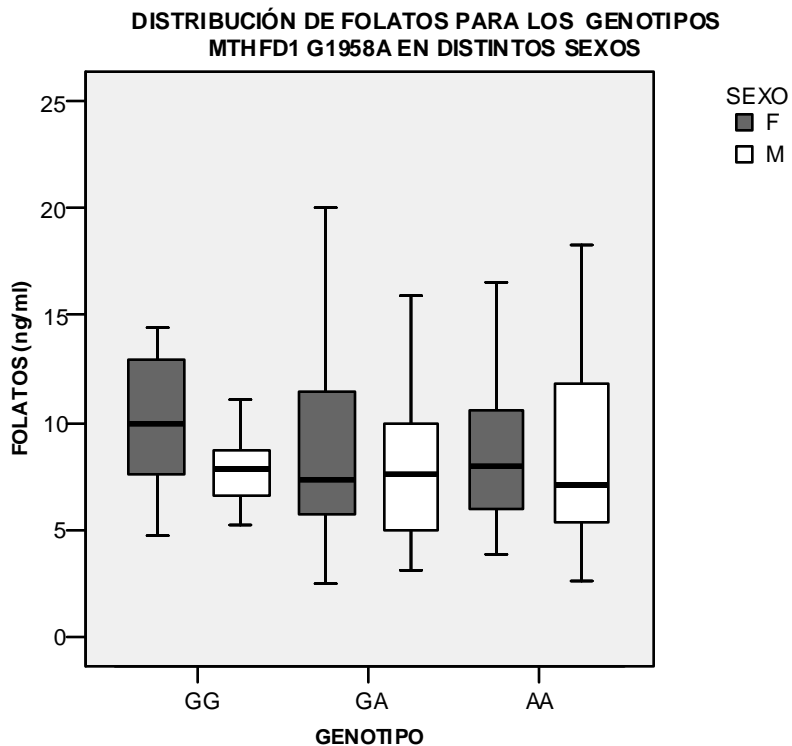


Figura 18. Distribución de los niveles de folatos por sexo y genotipo

Tabla 13. Valores de folatos por sexo y genotipo

	Mujeres G/G	Hombres G/G	Mujeres G/A	Hombres G/A	Mujeres A/A	Hombres A/A
Muestras con Dato	21	18	69	71	35	41
Promedio	9.907	7.817	8.838	8.220	9.056	8.795
Mediana	9.980	7.48	7.280	7.50	7.590	6.84
Desviación Std.	3.165	1.963	4.372	3.918	3.927	5.217
Varianza	10.016	3.854	19.116	15.350	15.421	27.223
Mínimo	4.77	5.21	2.47	3.13	3.840	2.600
Máximo	14.43	12.40	20.04	22.07	18.540	22.690

Para los tres genotipos las mujeres tienen niveles de folatos un poco mayores que los hombres. Las mujeres GG presentan los niveles más elevados en general, mientras que los hombres GG tienen los niveles menores. En los hombres, los portadores del alelo mutante tienen niveles de folatos un poco mayores que los homocigotos silvestres.

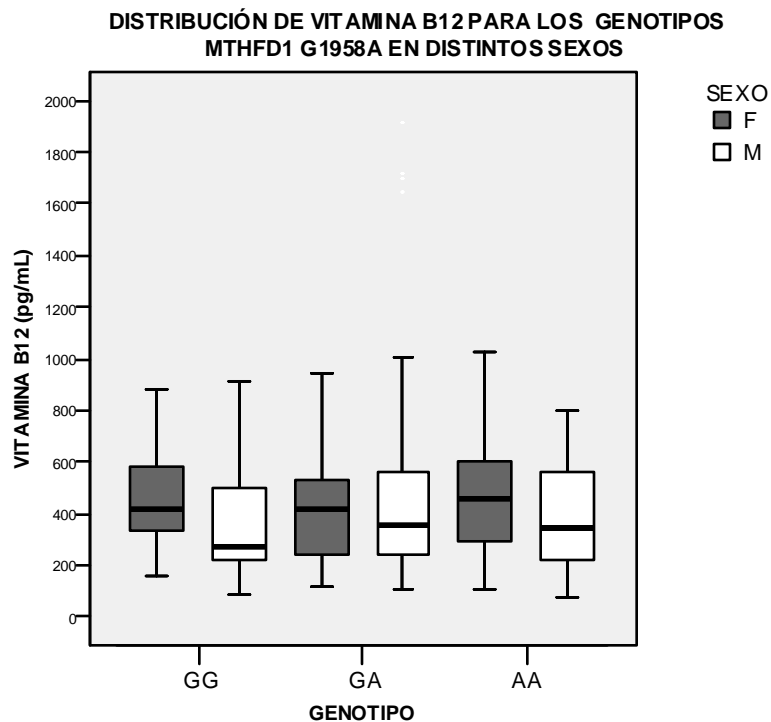


Figura 19. Distribución de los niveles de Vitamina B12 por sexo y genotipo.

Tabla 14. Valores de vitamina B12 por sexo y genotipo

	Mujeres G/G	Hombres G/G	Mujeres G/A	Hombres G/A	Mujeres A/A	Hombres A/A
Muestras con Dato	21	18	69	71	35	41
Promedio	494.390	382.971	428.143	499.810	471.323	386.019
Mediana	414.750	271.755	416.100	359.180	447.950	330.715
Desviación Std.	269.585	236.019	206.595	407.961	259.614	201.324
Varianza	72676.175	55705.31	42681.58	166431.9	67399.44	40531.44
Mínimo	157.220	89.460	113.850	107.080	108.430	73.190
Máximo	1169.690	914.880	1023.310	1916.510	1021.960	799.670

Se puede observar que al igual que los folatos, las mujeres tienen concentraciones mayores de vitamina B12 que los hombres, los hombres G/A presentan en promedio los niveles más elevados. Las mujeres GG tienen niveles más elevados, en forma inversa, los hombres con el alelo mutante tienen niveles mayores que los homocigotos silvestres.



Tabla 15. Prueba de t de Student Homocisteína

Grupos comparados	Prueba de t para igualdad de promedios	
	t	p
F VS M	9.166	<b>1.6E-017</b>
GG VS GA	2.198	<b>0.029</b>
GA VS AA	0.777	0.438
GG vs AA	1.309	0.193
GG + GA vs AA	0.186	0.853
GG VS GA+AA	1.997	<b>0.047</b>
F GG VS F GA	4.243	<b>7.347E-5</b>
F GG VS F AA	0.916	0.363
F GG VS F GA+AA	3.505	<b>0.001</b>
M GG VS M GA	0.160	0.873
M GG VS M AA	0.754	0.454
M GA VS M AA	1.326	0.188
M GG VS M GA+AA	5.493	<b>8.153E-6</b>
M GG VS F GG	15.245	<b>9.4E-5</b>
M GA VS FGA	4.451	<b>1.73E-5</b>
MAA VS F AA	7.366	<b>2.031E-10</b>

Las mujeres poseen niveles significativamente menores que los hombres para cualquier genotipo. Los portadores del alelo mutante tienen niveles significativamente mayores que los GG. De la misma forma, las mujeres GG tienen niveles significativamente menores que las mujeres u hombres con otro genotipo. Los hombres GG tienen niveles significativamente menores que los hombres GA y AA.

Tabla 16. Prueba de t para niveles de folatos

Grupos comparados	Prueba de t para igualdad de promedios	
	t	Sig.
HOMBRES VS MUJERES	1.590	0.113
GG VS GA	1.368	0.173
GA VS AA	0.442	0.659
GG vs AA	1.037	0.302
GG+GA VS AA	0.103	0.918
GG VS GA+AA	1.237	0.217
F GG VS F GA	1.895	0.064
F GG VS F AA	1.128	0.264
F GG+GA VS F AA	0.209	0.835
F GG VS F GA+AA	1.481	0.141
M GG VS M GA	0.189	0.851
M GG VS M AA	0.130	0.897
M GA VS M AA	0.064	0.949
M GG+GA VS M AA	0.025	0.980
M GG VS M GA+AA	2.180	<b>0.036</b>
M GA VS F GA	0.607	0.545
MAA VS F AA	0.897	0.373

No se encontró diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones de folatos entre hombres y mujeres. En las mujeres no difieren significativamente los valores de folatos entre genotipos. En los hombres se observa que los individuos GA y AA tienen niveles de folatos significativamente mayores que los GG.

Tabla 17 . Prueba de t para niveles de vitamina B12

Grupos comparados	Prueba de t para igualdad de promedios	
	t	Sig.
MVS F	1.139	0.256
GG VS GA	0.199	0.842
GA VS AA	0.896	0.371
GG vs AA	0.464	0.644
GG + GA vs AA	0.884	0.377
GG VS GA+AA	0.057	0.955
FGG VS FGA	1.029	0.306
FGG VS FAA	0.578	0.566
FGG VS FGA+AA	0.903	0.369
MGG VS MGA	1.105	0.272
MGG VS MAA	0.125	0.901
MGA VS MAA	1.344	0.182
MGG VS MGA+AA	1.086	0.279
MGG VS FGG	1.611	0.116
FGA VS MGA	0.257	0.797
FAA VS MAA	1.225	0.224

No se observaron diferencias estadísticamente significativas para concentraciones de vitamina B12 entre hombres y mujeres ni entre los distintos genotipos para cada sexo. F. Femenino. M. Masculino.

## **DISCUSIÓN**

### **Frecuencias**

Los genotipos analizados para el polimorfismo MTHFD1 1958 se encuentran dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que indica que las uniones en la población analizada se realizan en forma aleatoria, con una tasa de mutación constante para el locus, el polimorfismo no se encuentra bajo selección natural y las frecuencias permanecen constantes (tablas 2 y 3).

Se compararon las frecuencias genotípicas con datos publicados en población mexicana en dos estudios (tablas 4 y 5), a pesar de la gran variación entre el número de individuos no hay diferencias significativas con los datos obtenidos.

Como es de esperarse, la población mexicana presenta diferentes frecuencias que las poblaciones de países como Pakistán, China, Brasil, África, Estados Unidos, Europa e Israel, en cambio, la frecuencia alélica es muy parecida a las poblaciones de Colombia y Francia (tabla 4).

De las poblaciones reportadas, la de mayor frecuencia para el alelo mutante es la brasileña, seguida de Colombia y México, la menor frecuencia se encuentra en la población africana (tabla 4).

La variabilidad de frecuencias en distintas poblaciones también se ha observado en otras enzimas del ciclo de los folatos como la MTHFR, de modo que puede haber distribución diferencial de polimorfismos, además esto podría depender de los hábitos alimenticios una vez demostrado que la ingesta de folatos varía en distintas zonas geográficas (Guéant- Rodríguez, et al., 2006).

### **Homocisteína**

Como se pudo comprobar y es ampliamente demostrado, los niveles de homocisteína son significativamente mayores en los hombres que en las mujeres (tablas 7 y 15), de acuerdo a los resultados, ésta observación no se puede atribuir a la edad, (tabla 6 y fig.16).

Las diferentes concentraciones de homocisteína entre sexos puede estar determinada por otros factores como niveles de estrógenos, capacidad de filtración glomerular, masa muscular y otras características de cada sexo (Savaria, et al., 2000).

El menor nivel de homocisteína en las mujeres es efecto de los estrógenos, ya que aumentan la actividad de las vías de remetilación de homocisteína y de transulfuración de metionina (Dimitrova, et al., 2002).

Se observó que existe una diferencia significativa entre genotipos donde individuos GG tienen niveles menores de homocisteína que los portadores del alelo A, sin embargo no existe diferencia entre individuos GG y AA (tablas 8 ,15 y figura 17).

Las mujeres GG tienen niveles de homocisteína significativamente menores que las portadoras del alelo mutante y que los hombres con cualquier genotipo (tablas 12 y 15).

En los hombres se observa que portadores del alelo A presentan niveles de homocisteína significativamente mayores que los hombres GG, siendo los hombres AA el grupo con los mayores niveles de homocisteína (tablas 12 y 15).

### **Folatos**

Aunque las mujeres tienen niveles ligeramente mayores que los hombres (tabla 13), no se encontraron diferencias significativas entre sexos ni genotipos (tablas 11, 13,16 y fig. 18).

En los hombres los portadores del alelo mutante tienen niveles significativamente mayores que los GG (tabla 16).

### **Vitamina B12**

No se encontraron diferencias significativas entre sexos ni genotipos para vitamina B12 (tabla 11), a pesar de ello, las mujeres tienden a presentar valores mayores que los hombres (tablas 7, 14,17 y fig.19).

## **Folatos, homocisteína y Vitamina B12**

El comportamiento de la homocisteína, folatos y vitamina B12 es relativamente predecible, ya que la tendencia en las mujeres GG corresponde a los niveles más bajos de homocisteína, por lo tanto los folatos y vitamina B12 están ligeramente elevados.

Sin embargo, los hombres AA poseen los niveles de homocisteína y folatos elevados, aunque los de vitamina B12 no se ven afectados por el genotipo.

De acuerdo con lo que se conoce del ciclo de los folatos y en este análisis, la concentración de homocisteína aumenta paralelamente con una ligera disminución en las concentraciones de folatos y Vitamina B12, aunque este efecto no presenta diferencias significativas puede estar regulado por factores que no se controlaron como la dieta y polimorfismos de otras enzimas.

Es necesario considerar que el método de determinación de folatos empleado detecta el 5-metil THF, que es el principal derivado de folatos en suero, suponiendo que el polimorfismo MTHFD1 1958A pudiera afectar la actividad de la enzima, el metabolito que en teoría se observaría disminuido sería el 10-Fornil THF, ya que el cambio de aminoácido se encuentra en el dominio enzimático con actividad FTHFS, además existe una ruta alternativa para generar el 5-10, metilén THF por la SHMT.

Las muestras genotipificadas provienen del banco de sangre, donde no se posee información como el estatus nutricional de cada individuo, si se encuentran bajo suplementación que pueda estar aportando cantidades importantes de folatos y Vitamina B12.



## CONCLUSIONES

Se logró determinar la frecuencia para el polimorfismo MTHFD1 G1958A en los individuos analizados. El alelo MTHFD1 1958A está ampliamente distribuido en la población mestiza mexicana sana y varía significativamente entre grupos étnicos.

El polimorfismo MTHFD1 1958A altera significativamente los niveles de homocisteína, aunque se observa una tendencia, el efecto no es determinante para la biodisponibilidad de folatos ni vitamina B12, la MTHFD1 proporciona el sustrato para la MTHFR por lo que se esperaría mayor efecto en el 5- metil THF, sin embargo, éste polimorfismo se encuentra en el dominio con actividad FTHFS, además el 5,10 Metilén THF puede ser provisto por la forma mitocondrial de la MTHFD, o por la Serina hidroximetil transferasa (SHMT), presentando únicamente diferencias entre portadores y no portadores del alelo.

El alelo A presenta mayores niveles de homocisteína tanto en hombres como en mujeres, en las mujeres disminuye ligeramente los folatos y vitamina B12, en los hombres parece aumentar las concentraciones de homocisteína y folatos, sin tener diferencias en los niveles de Vitamina B12.

En base a datos *in vivo* y en un modelo matemático aceptado (Nijhout et al., 2004 y 2006), el comportamiento observado se puede explicar por el equilibrio metabólico donde alteraciones en el metabolismo de alguno de los donadores de grupos metilo tiene como consecuencia cambios compensatorios en las otras rutas metabólicas relacionadas.

Los resultados obtenidos así como la determinación de frecuencias para polimorfismos de la ruta de los folatos son importantes debido a que las características nutricionales en la población mexicana, al igual que en otras poblaciones, son un factor de riesgo para hiperhomocisteinemia, por lo tanto a la presentación de NTD's u otras enfermedades relacionadas a esta vía metabólica. Esto es relevante ya que la población México-Americana posee mayor riesgo que la población caucásica no hispánica y la Afro-americana de presentar NTDs (Suárez et al., 2000).

## **Perspectivas**

Es necesario el estudio en conjunto de polimorfismos para las enzimas del ciclo de los folatos como la SHMT y la MTHFR, pero también de aquellas rutas metabólicas con las que se relaciona de alguna manera, como es el caso de la colina y su efecto en distintas poblaciones.

Falta por conocer cuál es el impacto del polimorfismo a nivel de actividad enzimática y el equilibrio en la metilación como mecanismo de regulación génica así como de la transulfuración y detoxificación celular.

Resulta interesante determinar en un futuro las frecuencias génicas para MTHFD1 G1958A en mujeres mexicanas con antecedentes de abortos espontáneos o con productos que presentan NTDs, además de observar el comportamiento del polimorfismo en interacción con otras variantes como la RFC-1 A80G y MTHFR A1298C con la que se halló correlación (De Marco et al., 2004).

Otro aspecto que aún está por investigar es la respuesta farmacológica observada en pacientes con leucemias tratados con methotrexate en relación al polimorfismo, y determinar si se alteran los niveles de 10-formil THF, colina y SAH en relación al genotipo.

Finalmente ésta enzima puede ser un blanco farmacológico importante para el tratamiento de procesos malignos, actualmente se están investigando diversas moléculas que pueden servir para éste fin (Schmidt et al., 2000).

## ABREVIATURAS

**ADN.** Ácido desoxirribonucleico

**ARN.** Ácido ribonucleico

**C1.** Unidades de un carbono

**DHFR.** Dihidrofolato reductasa

**dTMP.** Deoxitimidina monofosfato

**dUMP.** Deoxi uridina monofosfato

**FTHFD.** 5-Formil tetrahydrofolato deshidrogenasa

**FTHFS.** Actividad formal tetrahydrofolato sintetasa

**LLA.** Leucemia linfocítica aguda

**MAT.** Metionina- Adenosil transferasa

**MS.** Metionina sintetasa

**MT.** Metil transferasas

**MTHFC.** Actividad metenil tetrahydrofolato ciclohidrolasa

**MTHFCm.** Actividad metenil tetrahydrofolato ciclohidrolasa mitocondrial

**MTHFD.** El gen 5,10- Metilén tetrahydrofolato deshidrogenasa

**MTHFD.** Actividad metilén tetrahydrofolato deshidrogenasa

**MTHFD1.** 5,10-Metilén tetrahydrofolato deshidrogenasa citosólica

**MTHFD2.** 5,10-Metilén tetrahydrofolato deshidrogenasa mitocondrial

**MTHFDm.** Actividad metilén tetrahydrofolato deshidrogenasa mitocondrial

**MTHFR.** 5,10- metilén tetrahydrofolato reductasa

**NADPH.** Cofactor Nicotin adenin dinucleótido fosfato

**NTDs.** Enfermedades o defectos del tubo neural

**RFC.** Acarreador de folatos reducidos

**SAH.** S-Adenosil homocisteína

**SAM.** S-Adenosil metionina

**SHMT.** Serina hidroximetil transferasa

**THF.** Tetrahydrofolato

## Bibliografía:

- Akar N, E Akar, O. Ezel, G. Deda. 2001. Common mutations at the homocysteine metabolism pathway and pediatric stroke. *Thrombosis Research* .102: 115-120.
- Brody L.C., M. Conley, C. Cox, 2002 .A polymorphism, R653Q, in the trifunctional enzyme Methylene tetrahydrofolate Dehydrogenase/ Methenyl tetrahydrofolate Cyclohydrolase/ Fomyl tetrahydrofolate Synthetase is a maternal genetic risk factor for neural tube defects: Report of the birth defects research group. *American Journal of Human Genetics*. 71:1207-1215.
- Carpenter K. J. 2003. A short history of nutritional science: Part 3 (1912–1944). *The Journal of Nutrition*. 133: 3023–3032.
- Carpenter K. J. 2003. A short history of nutritional science: Part 4 (1945–1985). *The Journal of Nutrition*. 133: 3331–3342.
- De Jonge R., J. Hendrik, B. Van Zelst, G. Jansen. 2005. Effect of polymorphisms in folate-related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 106: 717-720.
- De Marco P., M G. Calevo, E. Merello, A. Moroni, A. Raso, S. Parodi, A. Cama y V. Capra. 2004. Methylene tetrahydrofolate-dehydrogenase 1958G>A polymorphism is a genetic determinant of NTD risk for Italian mothers. *Cerebrospinal Fluid Research*. S50
- De Marco P., M. G. Calevo, E. Merello, A. Moroni, A. Raso, S. Parodi, A. Cama y V. Capra. 2006. Evaluation of a methylene tetrahydrofolate-dehydrogenase 1958G>A polymorphism for neural tube defect risk. *Journal of Human Genetics* .51:98–103
- Dimitrova Kamellia R., K. DeGroot, A.K. Myers, Y.D. Kim. 2002. Estrogen and Homocysteine. *Cardiovascular Research*. 53: 577–588.
- Friedman A., A. Bostom, J. Selhub, L. Rosenberg. The Kidney and Homocysteine Metabolism. *Journal of American Society of Nephrology*. 200112: 2181–2189
- Friso S., C. Sang-Woon, Girelli D., Mason J. 2002. A common mutation in the 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Medical Science*. 99:5606-5611
- GOS M., Szpecht-Potocka A. 2002. Genetic basis of neural tube defects II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. *Applied Genetics*. 43: 511-524.
- Guéant-Rodriguez R.M, J.L. Guéant, Debard R., Thirion S. et al. 2006 .Prevalence of methylene tetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 2006; 83:701–707.

- Guízar-Vazquez. Genética Clínica. Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. Edit. Manual Moderno. 3<sup>ra</sup> edición. México 2001. 443-455.
- Henk J. B., G. M. Shaw, M. den Heijer, R.H. Finne. 2006. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Neuroscience*. 7: 724-731
- Kohlmeier M., K.A. da Costa. L.M. Fischer, S. Zeisel .2005. Genetic variation of folate-mediated one-carbon transfer pathway predicts susceptibility to choline deficiency in humans. *PNAS*. 102:16025–16030.
- Krajinovic M, E. Lemieux-Blanchard, S. Chiasson, M. Primeau, I. Costea. 2004. A Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *The Pharmacogenomics Journal*. 4: 66–72.
- Min Shi, D.Caprau, R. Christensen, P.Kaare, J.Murray. 2003. Genotype frequencies and linkage disequilibrium in the CEPH Human Diversity Panel for Variants in folate pathway genes *MTHFR*, *MTHFD*, *MTRR*, *RFC1*, and *GCP2*. *Birth Defects Research*. 67:545–549.
- Nijhout F.H., M. Reed. P.Budu, C. M.Ulrich. 2004. A mathematical model of the folate cycle new insights in to folate homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004. 279:55008–55016.
- Oterino A., N. Valle, J. Pascual, Y. Bravo. 2005. Thymidylate synthase promoter tandem repeat and MTHFD1 R653Q polymorphisms modulate the risk for migraine conferred by the MTHFR T677 allele. *Molecular Brain Research*. 139:163 – 168
- Parle-McDemott A., F. Pangilinan, J.Mills. 2005. A polymorphism in the *MTHFD1* gene increases a mother's risk of having an unexplained second trimester pregnancy loss. *Molecular Human Reproduction*.11: 477–480
- Priyanka S., RD. Senthilkumar, V. Brahmachari. 2006. Mining literature for a comprehensive pathway analysis: A case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. *Lipids in Health and Disease*. 5:
- Radivoyevitch T., et al. 2005. Folate system correlations in DNA microarray data. *BMC Cancer*. 5:95:10.
- Reed M., F. Nijhout.2006. A Mathematical Model Gives Insights into Nutritional Genetic Aspects of Folate-Mediated One-Carbon Metabolism. *The Journal of Nutrition*.136:2654-2661.
- Rodríguez G. P., 1998. Ácido fólico y Vitamina B<sub>12</sub> en la nutrición humana. *Revista cubana de Alimentación y Nutrición*. 12(2): 107-119.
- Sambrook F., Maniatis. Molecular cloning a laboratory manual. Segunda Edición. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* .1989. VI y III.

- Savaria M., P. Jacques et al. 2000. Total Homocysteine and estrogen status indicators in the third national health and nutrition examination survey. *American Journal Epidemiology*. 152, 2:140-148.
- Schmidt A., Wu H., R. MacKenzie. 2000. Structures of three inhibitor complexes provide insight into the reaction mechanism of the human Methylene tetrahydrofolate Dehydrogenase/Cyclohydrolase *Biochemistry*. 39: 6325-6335
- Shurtlef D. 2004. Epidemiology of neural tube defects and folic acid. *Cerebrospinal Fluid Research*. 1: 5-10
- Silva I., L. Alfaro, A. Contreras. 2006. Distribución geográfica en México de polimorfismos en genes del metabolismo de folatos. Póster XXXI Congreso Nacional de Genética Humana. 229
- Suarez L., K. Hendricks. 2000. Neural tube defects among Mexican Americans living on the US-Mexico border: Effects of folic acid and dietary. *Folate American Journal of Epidemiology*. 152:1017-1023.
- Tamura T., M. Picciano. 2006. Folate and human reproduction. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 83:993–1016.
- Tonkinson J. L., L. L. Habeck, J. E. Toth, L. G. Mendelsohn, et al.,. 1998. The Antiproliferative and Cell Cycle Effects of 5, 6, 7, 8-Tetrahydro-N5, N10-Carbonylfolic Acid, an Inhibitor of Methylene tetrahydrofolate Dehydrogenase, Are Potentiated by Hypoxanthine. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 287:315–321.
- Van der Put H., MPA. Geurds, SG. Heil. 1998. Molecular genetic analysis of the gene encoding the trifunctional enzima MTHFD. *Clinical Genetics*. 53:119-125.
- Van Der Put N., H.W M. Van Straaten, F.J.M. Trijbels. 2001. Homocysteine and neural tube defects: An overview. *Experimental Biology and Medicine*. 226:243–270
- Walkup A., R. Dean. 2005. Applying enzymatic characterization of human mitochondrial c1-tetrahydrofolate synthase. *Research biochemistry and biophysics*. 442(2): 196-205.

### **Direcciones electrónicas consultadas**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM&cmd=search&term=MTHFD>

[www.nature.com/ejhg/journal/v13/n1/extref/5201282x1.doc](http://www.nature.com/ejhg/journal/v13/n1/extref/5201282x1.doc)

<http://www.ensembl.org>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Pager&DB=snp>

Protein Data Bank. RCSB PDB Structure Explorer.html

mut- SCRATCH PROGRAM . <http://www.igb.uci.edu/tools/scratch/explanation.html>



## ANEXO I. TABLAS

Tabla 18. MUESTRAS DEL BANCO DE SANGRE EMPLEADAS EN EL ESTUDIO

CODIGO	SEXO	EDAD	GENOTIPO	HCYS	FOLATOS	VIT B12
BS002	M	40	G/G	9.76	6.53	211.44
BS004	M	23	G/A	8.06	4.24	107.08
BS005	M	21	G/A	8.62	6.44	195.17
BS007	F	45	A/A	7.03	5.08	273.79
BS008	M	38	G/A	10.53	6.84	437.79
BS011	F	27	G/A	7.2	6.89	544.86
BS012	F	20	G/A	8.25	7.19	528.6
BS013	F	43	G/A	9.46	8.96	306.32
BS014	M	26	G/A	11.92	10.77	177.55
BS015	F	20	G/A	4.97	5.78	310.38
BS016	M	21	G/A	11.64	8.17	626.19
BS017	M	36	G/A	10.2	8.34	807.81
BS018	M	30	G/A	11.84	8.3	239.9
BS019	M	30	G/A	12.9	5.61	333.42
BS020	F	24	A/A	8.89	6	388.99
BS021	M	28	G/G	14	5.21	630.25
BS022	M	22	G/A	14.2	4.46	439.14
BS023	M	46	A/A	13.49	4.99	112.5
BS025	F	30	A/A	7.63	9.31	128.76
BS026	M	32	A/A	9.18	6.62	326.65
BS027	M	37	G/A	15.58	3.88	1702.36
BS028	M	57	A/A	16.31	9.09	505.56
BS029	M	43	G/A	12.18	7.19	280.56
BS030	M	31	G/A	10.3	5.03	315.8
BS031	M	41	G/A	12.3	10.68	1646.79
BS032	F	41	A/A	11.15	3.84	115.21
BS033	M	20	G/A	14.79	8.08	368.66
BS034	M	42	G/A	13.35	12.93	355.11
BS036	M	36	A/A	13.76	3.35	508.27
BS037	F	30	G/A	16.59	3.53	398.48
BS038	M	43	G/A	17.66	5.47	153.16
BS039	F	39	G/A	11.76	5.78	157.22
BS040	M	41	A/A	14.41	7.37	197.89
BS041	F	26	G/A	11.59	7.24	222.28
BS042	M	27	A/A	14.03	8.08	592.3
BS044	M	37	G/G	13.66	5.25	256.17
BS045	M	23	G/A	10.9	5.39	351.04
BS046	M	37	G/A	13.44	3.35	115.21
BS047	M	40	G/A	12.62	5.52	1156.14
BS048	M	30	G/A	11.42	9.05	432.37
BS049	M	54	G/A	14.51	13.07	295.47
BS050	F	33	G/A	14.23	9.09	490.65
BS051	M	42	G/G	15.89	9	195.17
BS052	F	20	G/A	9.68	12.89	418.81
BS053	M	22	G/A	14.98	8.87	628.9
BS054	M	20	G/A	21.88	6.58	509.62
BS055	M	19	G/A	12.03	7.42	204.66

Continuación Tabla 18. Muestras del banco de sangre empleadas en el estudio						
CODIGO	SEXO	EDAD	GENOTIPO	HCYS	FOLATOS	VIT B12
BS057	M	26	G/G	12.67	6.05	287.34
BS058	M	23	G/G	10.47	7.9	504.2
BS059	M	37	G/G	10.1	7.11	218.22
BS060	M	25	A/A	9.69	6.22	325.29
BS063	M	52	G/A	11.68	6.14	559.77
BS064	M	26	G/G	7.26	5.34	840.34
BS066	F	32	A/A	6.38	6.71	510.98
BS067	M	37	A/A	11.98	7.46	211.44
BS068	M	42	G/A	12.06	8.25	448.63
BS069	M	27	G/A	13.54	6.36	222.28
BS071	F	35	A/A	9.63	5.96	595.01
BS072	M	38	G/A	8.24	9.75	580.1
BS073	M	34	G/A	7.16	10.68	506.91
BS074	M	26	G/A	11.26	4.77	635.67
BS075	M	34	A/A	11	11.79	765.79
BS076	M	36	A/A	9.9	7.02	799.67
BS077	M	37	A/A	12.8	5.47	626.19
BS078	M	54	A/A	.	3.31	73.19
BS081	M	43	G/A	9.01	8.03	337.49
BS082	M	23	G/A	13.41	4.86	126.05
BS083	F	20	G/A	11.07	13.9	490.65
BS085	M	43	A/A	7.04	3.71	489.29
BS086	F	30	G/A	13.98	12.36	520.47
BS088	M	35	G/A	10.34	6.75	184.33
BS089	F	31	A/A	7.23	11.61	391.7
BS091	M	54	G/A	11.18	11.04	398.48
BS092	F	40	G/A	6.08	12.4	940.63
BS093	M	25	G/A	10.81	3.13	506.91
BS096	M	46	G/G	10.38	8.7	424.23
BS097	M	36	G/A	8.95	5.78	1721.33
BS098	M	20	G/G	16.27	8.25	447.28
BS099	M	50	A/A	14.05	4.15	329.36
BS100	M	30	A/A	16.07	3.93	371.37
BS101	M	25	G/A	12.4	4.72	395.77
BS103	M	32	G/A	21.45	4.5	151.8
BS104	M	25	G/A	12.89	4.77	204.66
BS105	M	47	G/G	10.83	9.53	246.68
BS106	F	32	G/G	8.26	7.59	1009.76
BS107	M	33	G/G	10.23	6.67	231.77
BS108	M	22	A/A	17.15	3.71	220.93
BS109	F	26	A/A	8.07	9.75	725.13
BS110	F	37	G/A	10.61	8.7	177.55
BS112	F	62	A/A	13.56	7.9	140.96
BS117	M	53	G/A	20.16	4.41	246.68
BS119	M	34	G/A	8.8	8.12	356.46
BS120	M	48	G/A	9.88	15.93	1004.34
BS121	M	44	G/A	11.86	13.68	432.37
BS122	M	21	A/A	11.56	10.64	329.36

Continuación Tabla 18. Muestras del banco de sangre empleadas en el estudio						
CODIGO	SEXO	EDAD	GENOTIPO	HCYS	FOLATOS	VIT B12
BS123	F	20	G/G	7.23	13.68	242.61
BS124	M	50	G/A	10.95	10.24	182.98
BS125	M	57	A/A	9.1	16.29	131.47
BS127	M	24	A/A	10.53	13.51	592.3
BS128	M	27	A/A	10.52	22.69	660.07
BS129	F	48	G/G	8.1	14.3	599.08
BS130	M	32	G/A	8.31	5.96	359.18
BS133	F	28	G/A	7.99	11.43	242.61
BS134	M	23	G/A	7.98	11.48	712.93
BS135	M	23	G/A	6.01	18.98	657.36
BS136	M	51	G/A	9.87	8.39	643.81
BS137	F	23	G/A	7.52	.	.
BS138	F	22	G/G	7.68	4.77	454.05
BS140	M	19	A/A	15.29	6.22	341.56
BS141	M	30	G/A	8.19	15.49	891.84
BS142	F	25	A/A	7.19	14.92	868.8
BS143	M	28	G/A	7.36	7.46	279.21
BS144	M	32	G/G	18.18	8.7	145.03
BS145	M	23	A/A	10.87	2.6	229.06
BS146	M	43	G/G	8.69	11.12	218.22
BS147	M	29	A/A	6.68	15.8	590.95
BS148	M	39	G/G	5.72	7.86	914.88
BS150	M	27	G/A	6.13	8.87	1496.34
BS151	M	32	A/A	13.04	8.43	132.83
BS152	M	21	A/A	11.47	8.74	147.74
BS153	F	30	A/A	10.98	5.25	120.63
BS154	M	34	A/A	11.95	15.01	295.47
BS155	M	34	A/A	12.14	18.27	559.77
BS156	M	37	G/A	12.28	11.96	342.91
BS158	M	55	A/A	14.49	14.39	332.07
BS159	M	50	A/A	12.13	9.84	721.06
BS160	M	57	G/A	10.11	9.58	1329.63
BS161	F	21	G/A	19.14	6.71	113.85
BS162	M	26	A/A	25.48	5.96	126.05
BS163	F	29	G/A	15.69	9.62	494.71
BS164	M	42	G/A	19.64	4.02	224.99
BS166	M	40	G/A	15.88	8.17	542.15
BS168	M	40	A/A	15.25	15.54	547.57
BS169	F	46	G/A	9.89	9.89	646.52
BS170	F	38	G/A	10.16	5.56	243.97
BS171	M	42	G/A	13.15	7.81	447.28
BS172	M	51	G/A	11.19	4.59	249.39
BS173	M	36	G/A	9.89	13.68	134.18
BS174	M	43	G/G	7.48	.	.
BS175	F	42	G/G	8.15	11.74	509.62
BS176	F	19	G/A	10.27	5.87	250.75
BS178	M	34	G/A	8.53	4.63	1916.51
BS180	M	28	A/A	17.33	3.88	273.79

Continuación Tabla 18. Muestras del banco de sangre empleadas en el estudio						
CODIGO	SEXO	EDAD	GENOTIPO	HCYS	FOLATOS	VIT B12
BS181	M	37	G/G	19.17	6.75	89.46
BS182	M	33	G/G	13.47	8.33	584.17
BS183	M	58	G/A	10.37	.	.
BS184	M	30	A/A	15.2	13.07	588.23
BS186	M	34	G/A	9.77	4.41	234.48
BS187	M	37	G/A	10.15	4.5	322.58
BS188	M	18	A/A	9.99	5.39	124.69
BS189	M	23	A/A	11.99	6.84	460.83
BS190	M	29	A/A	9.13	8.96	468.96
BS191	F	29	G/A	6.54	10.28	235.84
BS192	F	33	A/A	6.71	12.67	108.43
BS193	M	57	G/A	10.61	4.24	210.08
BS194	F	20	G/A	12.92	5.39	295.47
BS195	F	22	G/A	12.61	18.58	727.84
BS196	M	22	G/A	13.39	7.15	330.71
BS198	M	20	A/A	8.53	5.39	142.31
BS199	M	34	G/A	7.53	17.61	477.09
BS200	M	27	G/G	9.05	12.4	448.63
BS202	F	18	G/A	6.15	15.67	409.32
BS204	M	31	A/A	7.25	22.07	613.99
BS205	M	39	G/A	7.52	7.95	115.21
BS206	M	56	A/A	14.63	5.83	368.66
BS207	M	37	G/A	8.9	13.15	303.61
BS209	F	42	G/G	4.86	9.45	157.22
BS210	F	55	G/A	8.97	16.2	558.42
BS211	F	49	G/A	11.1	6.18	338.85
BS212	F	20	G/A	6.66	13.6	802.38
BS213	F	18	G/G	5.51	9.98	882.35
BS214	M	49	G/A	6.57	22.07	249.39
BS217	M	23	G/A	9.19	7.55	359.18
BS218	F	30	A/A	7.78	4.5	365.95
BS219	M	38	G/A	20.47	4.5	471.67
BS220	M	28	G/A	9.93	8.43	570.61
BS221	F	26	G/A	10.38	5.65	485.23
BS222	M	25	G/A	9.93	13.42	531.31
BS223	F	57	G/A	10.01	10.51	544.86
BS225	F	28	G/A	10.77	11.48	182.98
BS226	M	32	A/A	8.56	3.13	246.68
BS227	F	50	G/A	8.21	6.4	177.55
BS228	F	31	G/G	7.8	10.68	586.88
BS229	F	35	A/A	4.82	5.39	298.18
BS230	F	27	G/G	6.06	14.35	246.68
BS231	M	60	G/A	8.23	.	.
BS232	M	25	A/A	9.87	5.83	345.62
BS245	F	28	A/A	5.5	7.55	441.85
BS248	F	33	G/A	7.81	9.75	203.31
BS255	F	41	A/A	5.32	5.21	502.85
BS263	F	59	G/G	7.32	7.15	1169.69

Continuación Tabla 18. Muestras del banco de sangre empleadas en el estudio						
CODIGO	SEXO	EDAD	GENOTIPO	HCYS	FOLATOS	VIT B12
BS269	F	38	G/G	6.42	7.46	414.75
BS272	F	29	G/A	7.24	15.98	176.2
BS273	F	22	G/A	5.4	17.17	313.09
BS274	F	52	A/A	6.43	18.54	620.76
BS275	F	31	G/A	5.49	12.71	1023.31
BS276	F	27	G/A	6.38	20.04	525.89
BS278	F	45	A/A	6.67	18.01	553
BS279	F	39	G/A	8.88	14.52	458.12
BS280	F	26	A/A	6.97	7.77	117.92
BS281	F	47	G/A	6.65	15.98	516.4
BS282	F	49	G/A	9.08	12.27	432.37
BS283	F	54	G/A	8.12	10.24	645.16
BS284	F	35	G/A	5.67	7.59	328
BS286	F	20	G/A	9.59	2.82	142.31
BS288	F	31	G/G	5.95	14.43	403.9
BS293	F	37	G/A	8.47	7.95	569.26
BS298	F	35	A/A	6.54	5.56	298.18
BS309	F	26	A/A	9.11	9.23	388.99
BS315	F	39	G/G	7.85	8.25	333.42
BS318	F	49	G/G	6.36	5.39	416.1
BS319	F	21	G/A	10.09	6.89	246.68
BS322	F	56	G/G	5.9	10.86	538.09
BS328	F	33	G/A	9.2	7.06	196.53
BS332	F	39	A/A	13.22	10.28	573.33
BS340	F	35	G/A	11.89	10.02	323.94
BS346	F	53	A/A	9.71	.	.
BS352	F	32	G/A	5.49	5.3	302.25
BS354	F	25	G/A	6.5	5.39	445.92
BS355	F	22	G/G	6.62	.	.
BS356	F	46	A/A	6.67	7.19	691.24
BS362	F	38	A/A	4.82	10.68	704.8
BS366	F	32	G/A	7.17	16.2	840.34
BS368	F	25	G/A	6.97	6.71	243.97
BS371	F	30	A/A	4.83	10.2	998.92
BS372	F	39	A/A	5.54	9.67	454.05
BS379	F	32	G/A	16.46	2.65	290.05
BS384	F	45	A/A	5.4	16.51	929.79
BS390	F	35	G/A	4.62	6.84	407.97
BS392	F	34	A/A	10.28	12.67	1021.96
BS403	F	26	G/A	7.08	4.5	230.41
BS405	F	50	A/A	8.76	7.59	841.69
BS411	F	21	G/G	6.44	5.34	383.57
BS413	F	31	G/A	8.34	3.75	379.51
BS415	F	49	G/A	5.35	6.05	859.31
BS419	F	29	G/A	9.3	4.28	523.18
BS423	F	37	G/A	10.62	11.3	471.67
BS424	F	50	G/A	15	5.78	216.86
BS425	F	24	G/A	10.04	3.66	234.48

Continuación Tabla 18. Muestras del banco de sangre empleadas en el estudio						
CODIGO	SEXO	EDAD	GENOTIPO	HCYS	FOLATOS	VIT B12
BS426	F	50	G/G	10.39	7.81	184.33
BS431	F	32	G/A	8.3	4.46	615.34
BS439	F	23	A/A	8.21	6.18	478.45
BS440	F	23	G/A	10.14	5.21	772.57
BS442	F	40	G/A	13.08	2.47	437.79
BS443	F	18	G/A	9.02	3.22	214.15
BS449	F	20	G/A	7.81	8.08	393.06
BS455	F	40	G/G	7.67	12.89	294.12
BS456	F	23	G/G	8.3	10.51	397.13
BS476	F	17	G/A	7.38	17.92	460.83
BS478	F	44	G/A	6.94	8.56	553
BS479	F	22	A/A	6.64	10.42	490.65
BS480	F	29	G/G	6.41	7.77	355.11
BS481	F	29	A/A	8.56	6.53	317.16
BS482	F	32	G/A	7.91	5.16	479.8
BS494	F	23	A/A	8.74	8.21	374.08
BS496	F	36	G/A	9.8	7.28	768.5
BS498	F	29	G/G	8.91	13.64	803.74
BS499	F	30	A/A	8.88	4.94	184.33
BS501	F	20	G/A	6.82	4.24	626.19
BS502	F	45	G/A	10.83	6.09	416.1
BS503	F	34	A/A	6.59	15.14	479.8

Base de datos de todas las muestras genotipificadas

Tabla 19. Datos excluidos						
<b>CODIGO</b>	<b>SEXO</b>	<b>EDAD</b>	<b>MTHFD1</b>	<b>HCYS</b>	<b>FOLATOS</b>	<b>VITB12</b>
BS001	M	54	G/A	9.88	7.68	4743.83
BS003	F	40	G/A	23.22	2.82	306.32
BS009	M	21	A/A	84.75	2.3	111.14
BS024	M	30	G/G	16.74	3.31	120.63
BS056	M	48	A/A	15.16	10.64	2033.07
BS061	M	43	G/A	24.09	3.58	145.03
BS062	M	19	G/G	16.02	3.4	326.65
BS079	M	43	G/A	23.06	7.11	638.38
BS126	F	51	A/A	7.07	. S/D	864.73
BS132	M	30	G/G	10.46	20.79	483.87
BS149	M	50	G/A	8.3	12.76	27.11
BS165	F	21	G/A	18.03	5.87	60.99
BS177	F	18	G/A	7.63	22.07	1843.32
BS179	M	26	G/A	9.54	2.56	4743.83
BS197	M	21	G/A	9.08	6.8	6776.9
BS201	F	24	G/G	9.16	6.44	60.99
BS203	M	32	G/A	4.46	8.7	2710.76
BS249	F	59	G/A	11.44	6.84	2575.22
BS301	F	44	A/A	8.75	6.97	48.79
BS305	F	25	G/G	10.13	9.93	1833.83
BS404	F	27	A/A	10.7	7.59	84.03
BS414	F	31	G/A	9.98	4.86	1873.14
BS430	F	31	A/A	16.09	5.74	111.14
BS441	F	57	G/G	16.08	4.02	S/D
BS445	F	35	A/A	5.75	5.03	10843.04
BS490	F	39	A/A	9.66	4.5	2168.61
BS500	F	38	G/A	8.79	10.64	2846.3

Tabla 19 .Se excluyeron 27 datos mostrados en la tabla debido a que se encontraban fuera del intervalo de confianza del 95% para uno o más de los metabolitos analizados.

## ANEXO 2. REACTIVOS, SOLUCIONES Y EQUIPOS

### Reactivos

- GoTaq Flexi DNA Polymerase.PROMEGA. No de catálogo M8295. 5 U/ $\mu$ L.500 U. Lote 18657925. Fecha de caducidad 11 Mayo 2008.
- Oligonucleótidos *MTHFD1*.SIGMA GENOSYS.
- Sentido (F) 3057-012
- Antisentido (R) 3057-013
- Nucleótidos. PCR nucleotide Mix. Promega. No. de catálogo C1141.Lote 224002.Fecha de caducidad 15 de Septiembre 2007
- Enzima de restricción *Hpa II* .Invitrogen. No de catálogo 15209-018 10 U/ $\mu$ L (1000 U)
- Marcador de pesos moleculares DNA-Molecular Weight Marker VIII (0.019 – 1.11 kbp). Lote 11744320.g 50  $\mu$ g (200  $\mu$ L). ROCHE. Número de catálogo 1336045. Fecha de caducidad 31 de Oct. 2006.
- Agarosa grado analítico. PROMEGA. No de catálogo V3125. 500 g. Lote 227315. Fecha de caducidad julio 2011.

### Equipos

- Termociclador *Mastercycler gradient* marca Eppendorf
- Transiluminador Spectroline.Modelo TR-312A .Ultravioleta 312 nm.
- Biophotometre Eppendorf. AG 22331.



## Preparación de soluciones

### GEL DE AGAROSA AL 3% (100 mL)

#### Precauciones:

Preparar el gel con uso de guantes todo el tiempo

- Agarosa (3 g)
- Bromuro de Etidio 1% (3  $\mu$ L)
- TBE 1x (c.b.p. 100 mL)

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

## **GEL DE POLIACRILAMIDA AL 20%(5mL)**

### **Precauciones:**

Preparar el gel con uso de guantes todo el tiempo y durante su manipulación.

- Solución de acrilamida 30% (3.33 mL)
- H<sub>2</sub>O destilada (0.63 mL)
- Glicerol (0.5 mL)
- TBE 10x (0.5 mL)
- PSA (35 µL)
- TEMED (1.75 µL)

1. Preparar la cámara de geles de poliacrilamida verificando que no haya derrames.
2. Preparar la mezcla en el orden de la tabla para evitar la solidificación antes de tiempo.
3. Mezclar rápidamente y colocar en el molde.
4. Colocar el peine para la formación de los pozos.
5. Dejar solidificar de 30-40 minutos.
6. Retirar cuidadosamente el peine y lavar los pozos eliminando el exceso.
7. Mantener en la cámara con solución TBE1 X para evitar la deshidratación.

## **SOLUCIONES**

### **Solución EDTA 0.5M pH 8.0**

- Etilendiaminotetraacetato de sodio dihidratado (EDTA) (186.1 g)
- H<sub>2</sub>O destilada (c.b.p 1000 mL)

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

### **Solución de Persulfato de amonio (PSA) 10%(100 mL)**

- Persulfato de amonio (10 g)
- H<sub>2</sub>O destilada (c.b.p 100 mL)

El persulfato de amonio proporciona los radicales libres para la polimerización de acrilamida y bisacrilamida. El persulfato de amonio se descompone lentamente, se puede preparar una solución al 10 % peso/volumen en agua deionizada y almacenarse a 4 °C.

### **Solución de poliacrilamida 30% (100 mL)**

- Acrilamida (29 g)
- N,N' -metilenbisacrilamida (1 g)
- 

Esta solución contiene 29 % peso/volumen de acrilamida y 1% peso/volumen de N,N' -metilenbisacrilamida .

Disolver la acrilamida y bisacrilamida en 60 mL de agua deionizada, calentar la solución a 37 °C hasta disolver los reactivos.

La acrilamida y N,N' –metilenbisacrilamida se descomponen lentamente en ácido acrílico y ácido bis acrílico por una reacción de desaminación catalizada por la luz y compuestos alcalinos, por lo que debe prepararse en agua deionizada y almacenarse protegida de la luz .

Es necesario verificar que el pH de la solución sea  $\leq 7.0$ .

### **Precauciones.**

Estos compuestos son potentes neurotoxinas y se absorben por la piel, es indispensable manipular los reactivos y soluciones con guantes.

### **Solución Bromuro de Etidio 1%**

- Bromuro de Etidio (1 g)
- H<sub>2</sub>O destilada (c.b.p 100 mL)

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

#### **Precauciones.**

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

### **Solución amortiguadora Tris-Boratos (TBE) 10x (1 L)**

- Trisma Base (108 g)
- Acido Bórico (55 g)
- Solución EDTA 0.5M pH 8.0 (40 mL)
- Agua destilada (c.b.p 1000 mL)

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

### **Solución de N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) (100 mL)**

- Persulfato de amonio (10 g)
- Agua destilada (c.b.p 100 mL)

El TEMED acelera la polimerización de acrilamida y bisacrilamida por la formación de radicales libres al reaccionar con persulfato de amonio. El TEMED se emplea solo como base libre, ya que la polimerización es inhibida a pH bajo. Almacenar a 4°C.