

Determinación del polimorfismo C677T de metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en una población piloto de estudiantes de la Universidad del Rosario

Preliminary population study of Methylene tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T polymorphism determination in a pilot group of students from the University of Rosario

Zaniah N. González-Galofre¹, B.Sc., Victoria Villegas², M.Sc., María Martínez-Agüero², Ph.D.

Recibido: 16 de febrero de 2010 • Aceptado: 24 de marzo de 2010

Para citar este artículo: González-Galofre Z, Villegas V, Martínez-Agüero M. Determinación del polimorfismo C677T de metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en una población piloto de estudiantes de la Universidad del Rosario. Rev. Cienc. Salud 2010; 8 (1): 7-21.

Resumen

Introducción: la 5, 10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es una enzima clave en el metabolismo del folato; sus polimorfismos se han asociado al aumento de riesgo de padecer enfermedad coronaria, problemas obstétricos en mujeres gestantes, desarrollo de fetos con defectos de cierre del tubo neural y susceptibilidad a algunos tipos de cáncer. Este gen presenta una variación polimórfica de nucleótido único, que consiste en un cambio de C por T en la posición 677 el cual afecta de manera notable su actividad enzimática. **Objetivo:** Dada la importancia de esta enzima y la heterogeneidad genética de la población colombiana se realizó un estudio para determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo C677T de MTHFR en individuos sanos, debido a que en el país sólo se han realizado estudios que involucran metodología de casos y controles. **Materiales y métodos:** Este polimorfismo se estudió a partir de ADN de una muestra poblacional de 206 estudiantes. Adicionalmente, se calcularon las frecuencias globales de Colombia utilizando los datos de controles sanos reportados en otros estudios. **Resultados:** En la muestra evaluada se detectó un desequilibrio Hardy-Weinberg, mientras que en los datos globales colombianos se encontró que la población está en equilibrio. **Conclusión:** la frecuencia poblacional del alelo T parece estar sometida a una presión de selección positiva, dado su incremento en la población a pesar de su efecto deletéreo. Un estudio español reporta resultados similares y argumenta como causa probable de este cambio en la frecuencia alélica de T la suplementación con ácido fólico a futuras madres.

Palabras clave: ácido fólico, metilentetrahidrofolato reductasa, polimorfismo, frecuencia alélicas y génicas, equilibrio Hardy-Weinberg

¹ Universidad de Los Andes, Departamento de Ciencias Biológicas, Bogotá, Colombia.

² Universidad del Rosario, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Bogotá, Colombia.
Correspondencia: maria.martinez@urosario.edu.co

Abstract

Introduction: the 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is an essential enzyme in folate metabolism; their polymorphisms have been associated with heart disease risk increase, obstetric problems, neural tube defects in fetuses and cancer susceptibility. This gene has a single nucleotide polymorphism, a C-T change at nucleotide 677, which affects significantly its enzymatic activity. *Objective:* because of the biological importance of this enzyme and the Colombian population genetic heterogeneity characteristic, a study was performed to determine allele and genotype frequencies of MTHFR C677T polymorphism in healthy individuals, taking into account that in Colombia there are only studies that have involved case-control methodology. *Methods:* we analyzed this polymorphism through the amplification of the DNA of a 206 students sample population. Additionally, Colombian overall frequencies were calculated, using data from healthy controls reported in other studies. *Results:* a Hardy-Weinberg disequilibrium was found in the sample tested. For the Colombian data, we found that the global population was in equilibrium. *Conclusion:* T allele population frequency seems to be under positive selection pressure, which is reflected in the population allele increase, despite its deleterious effect. A Spanish study reported similar results and identified folic acid supplementation on expectant mothers as a probably cause of this change.

Keywords: folic acid, methylenetetrahydrofolate reductase, polymorphism, gene, genetic frequencies, Hardy-Weinberg equilibrium.

Introducción

El folato es la forma soluble de la vitamina B9. Entre los alimentos que la contienen están la lenteja, la arveja, la naranja, el brócoli, los espárragos y el hígado; en suplementos alimenticios se encuentra como ácido fólico, su forma sintética (1). La ingesta adecuada de folato es importante en diversos procesos vitales, entre ellos la síntesis, replicación y reparación del ADN, así como la biosíntesis de proteínas y otros procesos fundamentales para la viabilidad celular, por ejemplo la división y la homeóstasis (1-2), debido al papel esencial de sus coenzimas en la regeneración de metionina, oxidación y reducción de unidades de un único carbono requeridos para un metabolismo normal y regulado (2).

El suplemento de las coenzimas del folato *in vivo* requiere tanto de la cantidad y biodisponibilidad del folato ingerido como de su tasa de pérdida por vía catabólica, urinaria y fecal. Cuando se presentan ciclos de ingesta inad-

cuada, mala absorción o cambios bioquímicos asociados con un nivel inadecuado de folato, se generan anomalías (2-5) que pueden ser asociadas a enfermedad coronaria y ciertos tipos de cáncer (3-7). También existen otros polimorfismos funcionales en los genes que codifican para las enzimas involucradas en su metabolismo que pueden llegar a influir en la susceptibilidad frente a estas patologías; por tal razón, los polimorfismos del gen de metileno-tetrahydrofolato reductasa se cuentan entre los más estudiados (3-5).

MTHFR y función

El gen codificante para esta enzima se encuentra ubicado en la región p36.3 del cromosoma 1. La secuencia complementaria de ADN tiene una longitud de 2,2 kb y 11 exones; el producto del gen es una proteína de aproximadamente 70 kDa (4). La enzima desempeña un papel fundamental en el metabolismo del folato, catalizando junto con otra serie de enzimas

la conversión irreversible de 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metilentetrahidrofolato, la primera forma circulante del folato en el cuerpo (5), y un co-sustrato para la metilación de homocisteína a metionina. La actividad enzimática está bajo el control de los niveles intracelulares de S-Adenosil-Metionina (SAM), coenzima participante en la transferencia de grupos metilo, encontrándose una alta actividad relacionada con niveles elevados de SAM y una baja actividad con niveles intracelulares disminuidos (6). De esta manera se asegura que haya suficiente disponibilidad de folato tanto para la metilación de la homocisteína como para la metilación de dUMP (desoxi-uridinmonofosfato), intermediario en el metabolismo de los desoxirribonucleótidos, el cual es catalizado por la timidilato sintasa que también utiliza 5,10-metilentetrahidrofolato (5-6).

En 1995 se describió un cambio común de C→T en la posición 677 del gen de MTHFR, que conduce a la sustitución de alanina por valina en el codón 222 de la proteína y que trae como consecuencia termolabilidad y baja actividad específica de la enzima. Desde entonces el genotipo homocigoto (677TT) ha sido relacionado con bajos niveles de folato en suero (7), homocisteína elevada en plasma (8-9), distribución alterada de distintos tipos de folato en las células (10) y aumento del riesgo de generar enfermedad coronaria (11) y varios tipos de cáncer (12).

Implicaciones

La función de la enzima puede llegar a influir en el riesgo de contraer cáncer, frecuentemente gástrico o de seno, de dos formas. En la primera, el 5,10-metilentetrahidrofolato, sustrato de MTHFR, al estar involucrado en la conversión de dUMP a monofosfato de deoxitimidilato (dTMP), puede ocasionar el incremento de la relación de estos dos componentes, si se encuentra en niveles disminuidos, aumentando

la tasa de incorporación al ADN de uracilo en vez de timina, incrementado así la probabilidad de aparición de mutaciones puntuales y rompimiento del ADN a nivel cromosómico (13). La segunda está determinada por los niveles de SAM, un donante común de grupos metilo necesarios para el proceso de metilación del ADN. En este caso, cambios en la metilación modifican la conformación del ADN y la expresión de los genes (14). Una forma menos activa de la enzima MTHFR supone bajos niveles de SAM, por ende hipometilación (15). De manera similar, la baja ingesta de folato puede determinar el riesgo de aparición de algunos tipos de cáncer, provocando una metilación aberrante en el ADN que resulta en una expresión alterada de proto-oncogenes y de genes de supresión tumoral (16-17).

En cuanto a la enfermedad coronaria, se han encontrado elevadas concentraciones de homocisteína en pacientes con enfermedad arterial (18) e hipertensión (19), esto sugiere que la homocisteína está involucrada en activación plaquetaria, hiper coagulación, estrés oxidativo, disfunción endotelial y proliferación de células de músculo liso junto con oxidación y peroxidación de lípidos (20-22). Adicionalmente, una concentración elevada de homocisteína en pacientes hipertensos ha sido correlacionada con la presión arterial (23-26). Individuos escogidos aleatoriamente para llevar a cabo un tratamiento de reducción de la concentración de homocisteína mostraron una disminución en la presión sanguínea, hecho que evidencia tal la relación (18).

El folato también ha sido relacionado con defectos de tubo neural en bebés en etapa de gestación, que han producido patologías como anencefalia y espina bífida, además de influir en la aparición de cardiopatías congénitas, con mayor frecuencia la tetralogía de Fallot, co-

municación interventricular y comunicación intraventricular (27).

Variantes genéticas

La mayoría de los genes que codifican para las enzimas involucradas en el metabolismo del folato son polimórficos (28). Con base en lo anterior, 29 mutaciones raras del gen para MTHFR, que resultan en una actividad enzimática considerablemente baja, han sido descritas en pacientes que padecen de homocistinuria (4), mientras que en individuos no homocistinúricos y considerados sanos se han encontrado dos polimorfismos funcionales frecuentes, cuyas variantes genotípicas son asociadas con bajos niveles de folato en plasma sanguíneo (3).

El primer polimorfismo corresponde a un cambio C→T en el nucleótido 677 del exón 4 (C677T); el segundo, a un cambio A→C en el nucleótido 1.298 del exón 7 (A1298C). Estos dos polimorfismos se localizan a 2,1 kb el uno del otro, y se ha investigado la asociación de estos polimorfismos con el riesgo de padecer las patologías mencionadas (4). Si bien estos polimorfismos se relacionan con bajos niveles de folato en plasma sanguíneo, el primero es más relevante. La actividad enzimática de los heterocigotos (CT) es del 65% y del 30% para los homocigotos (TT) con respecto al alelo mayor (CC) (3-4, 16). Diferentes investigaciones han asociado al genotipo MTHFR-TT con la hipometilación del ADN, particularmente en individuos con concentraciones reducidas de folato en plasma (29-32). Estudios realizados en distintas poblaciones del mundo muestran una alta asociación del polimorfismo C677T y la susceptibilidad de cáncer gástrico (5, 32-33), de seno (17, 34-36) y enfermedad coronaria (11, 18, 37).

Frecuencias poblacionales

Diferentes trabajos han mostrado la frecuencia del alelo T y su amplia variación en los rangos

de frecuencias alélicas en poblaciones sanas, en estudios poblacionales (38-39) y en estudios de casos y controles en patologías como cáncer o cardiopatías (4-5, 37, 40-41).

La tabla 1 presenta algunos datos reportados en distintas regiones del mundo para este polimorfismo. En casos como China (42-43) o Estados Unidos (44), donde se muestrean las mismas poblaciones geográficas, se obtienen resultados muy diferentes. Esta frecuencia tiene valores entre el 1% en la población del sur oriente de la India (45) hasta el 57% en Linxian, China (43), con una frecuencia de homocigosidad que varía entre 0% (45, 44) hasta más del 30% en diferentes poblaciones de China (46, 47, 43). En Estados Unidos, en un estudio aplicado a diferentes grupos étnicos, Li y colaboradores han reportado la menor frecuencia del alelo T en la población afroamericana y la mayor en la población hispana (44).

En Colombia se han realizado previamente tres estudios (48-50), en los que se han analizado las frecuencias alélicas y genotípicas de este polimorfismo mediante la comparación de casos y controles. Los resultados han mostrado un comportamiento variable, incluso cuando se han muestreado personas de la misma región geográfica, como la población de Medellín, en el occidente del país (49-50).

Teniendo en cuenta la importancia de esta enzima y la heterogeneidad de las poblaciones estudiadas, se realizó un estudio para determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo C677T de MTHFR en una muestra de individuos sanos colombianos compuesta por estudiantes de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad del Rosario; adicionalmente, se compararon con los resultados obtenidos con otras poblaciones a nivel mundial.

Tabla 1. Frecuencias alélicas para el polimorfismo C677T reportadas para diferentes regiones del mundo en individuos sanos

Región	País		Número individuos	Frecuencias genotípicas CC CT TT			Frecuencias alélicas C T	
Asia centro-occidente	India	Alluri (45)	49	0,980	0,020	0,000	0,990	0,010
	Irán	Golbahar (54)	391	0,560	0,389	0,051	0,755	0,246
Asia oriente	China	Baum (42)	304	0,641	0,313	0,046	0,798	0,202
	China	Stolzenberg-Solomon (43)	398	0,163	0,525	0,312	0,426	0,574
Europa	Turquía	Ilhan (18)	100	0,720	0,260	0,020	0,850	0,150
	Italia	Fabris (55)	236	0,292	0,479	0,229	0,532	0,468
América del Norte	Estados Unidos (hispanos)	Li (44)	13	0,385	0,385	0,231	0,577	0,423
	Estados Unidos (afroamericanos)	Li <i>et al.</i> 2005 (44)	16	0,750	0,250	0,000	0,875	0,125
	Estados Unidos (caucásicos)	Li (44)	307	0,485	0,450	0,065	0,710	0,290
	México	Lacasaña-Navarro (33)	631	0,337	0,419	0,244	0,547	0,453
	Brasil	Santos (56)	111	0,369	0,478	0,153	0,608	0,392
América Latina	Colombia	Camacho Vanegas (60)	150	0,280	0,467	0,253	0,513	0,487
	Colombia	Bermúdez (48)	95	0,232	0,516	0,253	0,490	0,511
	Colombia	Torres (49)	114	0,316	0,491	0,193	0,561	0,439
	Colombia	Cardona (50)	206	0,452	0,403	0,146	0,653	0,347

Fuente: elaboración propia.

Materiales y métodos

Estudio de tipo descriptivo diseñado para conocer las frecuencias alélicas y genotípicas de las dos variantes polimórficas del gen de interés en una muestra poblacional e integrado, pues combina resultados de tres estudios científicos realizados en Colombia.

Para estimar el tamaño poblacional a evaluar a partir de los 436 estudiantes de primer a cuarto semestre de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad del Rosario, se trabajó con un máximo de variabilidad para el alelo T de 0,5; un intervalo de confianza del 95% y un error del 5%, obteniendo un tamaño poblacional de muestreo de 204 estudiantes. Se tomó una muestra de 5 ml de sangre total para 206 estudiantes voluntarios. Los individuos incluidos fueron estudiantes sanos, de ambos sexos y mayores de edad con previa firma del consentimiento informado. No se estratificó por procedencia, grupo étnico o nivel socioeconómico.

El estudio fue realizado con previa aprobación del protocolo por parte del Comité de Ética de la Universidad del Rosario.

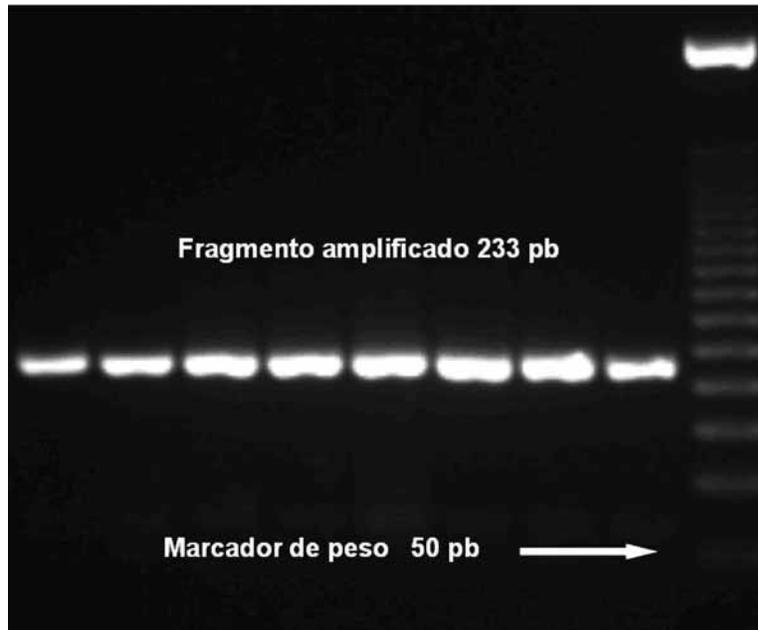
El ADN genómico se aisló mediante la técnica de extracción de *salting out* (51). Una vez obtenido, se comprobó su calidad en gel de

agarosa al 1%; posteriormente, se cuantificó y diluyó a una concentración de 25 ng/ μ l.

Para el estudio del polimorfismo C677T de MTHFR se utilizó el método reportado por Frosst (52) y Weisberg (53) con modificaciones menores. Los *primers*: 5' CGA AGC AGG GAG CTT TGA GGCTG 3' y 5' AGG ACG GTG CGGTGA GAG TG 3'. La amplificación se realizó mediante una PCR convencional bajo las siguientes condiciones experimentales: 94 °C 5 min; 35 ciclos (94 °C 30 s, 62 °C 45 s y 68 °C 30 s) y finalmente 68 °C 5 min. Se obtuvo un fragmento de 233 pb (figura 1), el cual fue digerido con la enzima TaqI durante 12 h a 37 °C, generando un fragmento de 233 pb para el homocigoto CC, un fragmento de 171 pb para el homocigoto TT y dos fragmentos de 233 y 171 pb para el heterocigoto CT (figura 2).

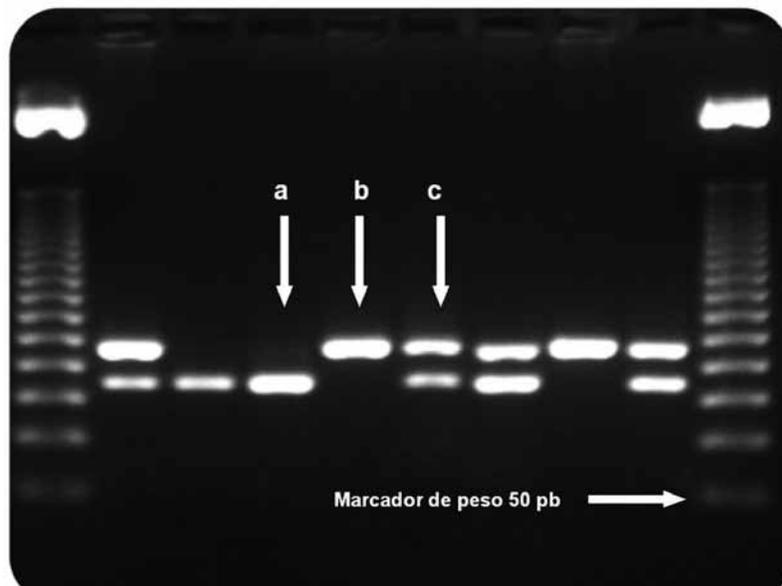
Se incluyeron en los análisis a 621 individuos colombianos, aparentemente sanos, reportados por estudios previos en Colombia (48-50). Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas tanto para la población de estudiantes como para la población total (incluyendo los individuos sanos reportados por otros autores) y se realizó el análisis de ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) en ambas muestras, utilizando test exactos con cadenas de Markov para estimar el valor exacto de p.

Figura 1. Fragmento de 233 pb correspondiente a la amplificación por PCR utilizando un marcador de peso de 50 pb



Fuente: elaboración propia.

Figura 2. Fragmentos obtenidos a partir del corte con la enzima Taq I. a) Homocigoto TT 171 pb. b) Homocigoto CC 233 pb. c) Heterocigoto CT 233 pb y 171 pb.



Fuente: elaboración propia.

Resultados

En la amplificación por PCR se obtuvo un fragmento de 233 pb (figura 1), que al ser cortado con la enzima TaqI generó fragmentos de 233 pb para el homocigoto CC, un fragmento de 171 pb para el homocigoto TT y dos fragmentos de 233 y 171 pb para el heterocigoto CT (figura 2).

Se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas tanto para la población de 206 individuos aparentemente sanos (tabla 2) como para la población colombiana en general, al incluir los individuos de otros trabajos previamente

reportados (tabla 3). En ambos casos se observó un exceso de homocigotos, que en el grupo de datos de estudiantes de la Universidad del Rosario generó una probabilidad significativa de no encontrarse en EHW ($p=0,0001$; s.d. $<0,0000$), con un índice de endogamia negativo y significativo ($F_{IS} = -0,2712$). Para los 621 individuos de Colombia la probabilidad de no encontrarse en EHW ($p=0,2468$; s.d. $=0,0043$) no es significativa, con un índice de endogamia negativo, pero no significativo ($F_{IS} = -0,0480$).

Tabla 2. Cálculos realizados para los 206 individuos aparentemente sanos muestreados (a)

(a) Genotipos y frecuencias genotípicas.

(b) Alelos y frecuencias alélicas.

Genotipo	Genotipos observados	Genotipos esperados	Frecuencias observadas	Frecuencias esperadas
CC	55	68,6	0,27	0,33
CT	128	100,8	0,62	0,49
TT	23	36,6	0,11	0,18
CC/TT	78	105,2	0,38	0,51

(b)

Alelo	Frecuencias alélicas
C	0,58
T	0,42

Fuente: elaboración propia.

Tabla 3. Cálculos realizados para los 621 individuos aparentemente sanos muestreados (a)

(a) Genotipos y frecuencias genotípicas.

(b) Alelos y frecuencias alélicas.

Genotipo	Genotipos observados	Genotipos esperados	Frecuencias observadas	Frecuencias esperadas
CC	206	213,2	0,33	0,34
CT	316	301,5	0,51	0,49
TT	99	106,3	0,16	0,17
CC/TT	305	319,5	0,49	0,51

(b)

Alelo	Frecuencias alélicas
C	0,5862
T	0,4138

Fuente: elaboración propia.

Se muestran las frecuencias del alelo T para individuos aparentemente sanos en diferentes poblaciones alrededor del mundo (tablas 4 y 5). La tabla 4 presenta algunas de las poblaciones

cuyas frecuencias alélicas son estadísticamente diferentes a este trabajo; la tabla 5, poblaciones con frecuencias alélicas similares.

Tabla 4. Frecuencias alélicas reportadas para países con diferencias significativas frente a las frecuencias calculadas para la población muestreada

País	Número de Individuos	Frecuencia alelo T
China [46]	540	0,56
Taiwán [57]	285	0,33
Irán [54]	391	0,25
Colombia [50]	206	0,35

Fuente: elaboración propia.

Tabla 5. Frecuencias alélicas reportadas para países con diferencias significativas frente a las frecuencias calculadas para la población muestreada

País	Número de Individuos	Frecuencia alelo T
Alemania [6]	106	0,38
Italia [55]	236	0,47
España [38]	88	0,43
México [33]	427	0,45
Colombia [48]	95	0,51
Colombia [49]	114	0,44

Fuente: elaboración propia.

Discusión

Al comparar los resultados de frecuencias alélicas en la población de estudiantes (tabla 2) y de la población total colombiana (tabla 3), los valores obtenidos son muy similares, con menos del 1% de diferencia. Sin embargo, las estimas de ajuste al EHW indican que la población de estudiantes muestreada en este trabajo no se encuentra en EHW, contrario al análisis que incluye la totalidad de muestras colombianas. Esto sugiere que existe la probabilidad, aunque reducida, de que una fuerza de selección esté favoreciendo a los heterocigotos en la población de estudiantes o que esté representando alguna situación que favorezca al alelo T lo cual se refleja en el alto número de heterocigotos.

La primera situación puede ser el cambio en el número total de individuos. Un tamaño de muestra más grande reduce el error de muestreo; por tanto, es posible que las poblaciones se ajusten mejor a los supuestos del equilibrio, al hacer este muestreo en una población con características más heterogéneas. Se destaca que las desviaciones al EHW por tamaños de muestreo se deben por lo general a un efecto Wahlund, según el cual el número de homocigotos aumenta debido a la subestructura críptica de la población

(58-59). Esto suele solucionarse aumentando el número de individuos muestreados. Sin embargo, en este caso, el desequilibrio se observa por un exceso de heterocigotos; si bien la población es pequeña –206 individuos– y puede no representar de manera adecuada a la totalidad de la población colombiana, debe resaltarse que en ninguno de los estudios realizados en Colombia que fueron incluidos en este análisis (49-51) ni en otro estudio no incluido realizado en Bogotá con personas aparentemente sanas (60) se observa falta de EHW aun cuando los tamaños de muestra son menores o iguales al reportado por nosotros.

Otra situación se refiere a la enorme variabilidad del polimorfismo C677T en las diferentes poblaciones muestreadas en el mundo. Sus frecuencias alélicas han sido reportadas para el alelo T entre 0,01 (17) y 0,64 (4). Los datos obtenidos en este estudio para la población colombiana se sitúan en un punto intermedio similar al reportado para México, donde el polimorfismo es de 0,47 (33).

Si bien los valores de las frecuencias alélicas observadas en los dos grupos (tabla 1 y tabla 2) son similares, no ocurre lo mismo con la distribución de las frecuencias genotípicas. En

este caso, los estudiantes presentan valores de heterocigotos mayores a los observados en la población general (más del 10%).

Si se tiene en cuenta que las presiones selectivas positivas sobre alelos deletéreos son poco frecuentes, existe la posibilidad de que la población de estudiantes se esté comportando de manera similar a la que analizaron el grupo de Mayor-Olea y colaboradores (38) en España. Estos investigadores trabajaron con una población española de diferentes rangos de edad, verificando en cada uno de ellos las frecuencias del polimorfismo C667T MTHFR; encontraron que los nacidos después de 1976 presentaban un comportamiento en las frecuencias diferente a la de los nacidos en el período 1900-1975. Los autores atribuyen este cambio en las frecuencias alélicas, representada por un aumento en el número de individuos que portan el alelo T, a la suplementación con ácido fólico durante el período gestacional, incluida en el sistema de salud español durante la década de 1970 (38).

Los resultados presentados en las tablas 4 y 5 indican que no existe una distribución

zonal que permita afirmar que las poblaciones se comportan igual en las distintas regiones del mundo. Asimismo, se evidencia la enorme variabilidad del polimorfismo, al observarse que es posible encontrar frecuencias del alelo T bastante diferentes en un mismo país, como en China (46) y Colombia (49, 50), donde la población muestreada es la misma.

Los interrogantes biológicos a partir de los resultados de este estudio indican que es necesario considerar proyectos futuros que permitan darles solución. Para esto sería pertinente realizar otro estudio con dos nuevos grupos poblacionales: mayores de cuarenta años y niños menores de edad. Así, si la hipótesis presentada por el grupo español (38) es correcta, la primera muestra se encontraría en EHW y la segunda en desequilibrio; esto confirmaría que la ingesta de ácido fólico por parte de madres gestantes está influenciando la frecuencia genética del alelo T. Si se llegase a observar que en la población de niños los alelos se encuentran en EHW, entonces se analizaría un posible proceso de exogamia sobre la muestra de estudiantes.

Bibliografía

1. Meshkin B, Blum K. Folate Nutrigenetics: a Convergence of Dietary Folate Metabolism, Folic Acid Supplementation, and Folate Antagonist Pharmacogenetics. *Drug Metab Lett* 2007; 1: 55-60.
2. Bailey LB, Gregory JF. Folate Metabolism and Requirements. *J Nutr* 1999; 4: 770-82.
3. Sun L, Sun Y, Bo W, Cao H, Chen Y. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Susceptibility to Gastric Cancer in Chinese Populations: a Meta-Analysis. *Eur J Cancer Prev* 2008; 17: 446-52.
4. Boccia S, Hung R, Ricciardi G, Gianfagna F, Ebert MPA, Fang J, Gao C, Götze T, Graziano F, Lacasaña-Navarro M, Lin D, López-Carrillo L, Qiao Y, Shen H, Stolzenberg-Solomon R, Takezaki T, Weng Y, Zhang F, van Duijn CM, Boffetta P, Taioli E. Meta- and Pooled Analyses of the Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Polymorphisms and Gastric Cancer Risk: A Huge Review. *Am J Epidemiol* 2008; 167: 505-16.
5. Boccia S, Gianfagna F, Persiani R, La Greca A, Arzani D, Rausei S, D'ugo D, Magistrelli P, Villari P, van Duijn CM, Ricciardi G. Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Polymorphisms and Susceptibility to Gastric Adenocarcinoma in an Italian Population. *Biomarkers* 2007; 12: 635-44.
6. Gotze T, Röcken C, Röhl FW, Wex T, Hoffmann J, Westphal S, Malfertheiner P, Ebert MP, Dierkes J. Gene Polymorphisms of Folate Metabolizing Enzymes and the Risk of Gastric Cancer. *Cancer Lett* 2007; 251: 228-36.

7. Jacques P, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R. Relation between Folate Status, a Common Mutation in Methylenetetrahydrofolate Reductase, and Plasma Homocysteine Concentrations. *Circulation* 1996; 94: 7-9.
8. Dierkes J, Jeckel A, Ambrosch A, Westphal S, Luley C, Boeing H. Factors Explaining the Difference of Total Homocysteine between Men and Women in the European Investigation into Cancer and Nutrition Potsdam Study. *Metabolism* 2001; 50: 640-5.
9. Russo GT, Friso S, Jacques PE, Rogers G, Cucinotta D, Wilson PWF, Ordovas JM, Rosenberg IH, Selhub J. Age and Gender Affect the Relation between Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Genotype and Fasting Plasma Homocysteine Concentrations in the Framingham Offspring Study Cohort. *J Nutr* 2003; 133: 3416-21.
10. Bagley PJ, Selhub JA. Common Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene is Associated with an Accumulation of Formylated Tetrahydrofolates in Red Blood Cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13217-20.
11. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG. MTHFR 677C→T Polymorphism and Risk of Coronary Heart Disease a Meta-Analysis. *JAMA* 2002; 288: 2023-31.
12. Sharp L, Little J. Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: a Huge Review. *Am J Epidemiol* 2004; 159: 423-43.
13. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, Wickramasinghe SN, Everson RB, Ames BN. Folate Deficiency Causes Uracil Misincorporation into Human DNA and Chromosome Breakage: Implications for Cancer and Neuronal Damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3290-5.
14. Stern LL, Mason JB, Selhub J, Choi SW. Genomic DNA Hypomethylation, a Characteristic of Most Cancers, is Present in Peripheral Leukocytes of Individuals who are for the C677T Polymorphism in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 849-53.
15. Duthie SJ. Folic Acid Deficiency and Cancer: Mechanisms of DNA Instability. *British Medical Bulletin* 1999; 55: 578-92.
16. Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. Folate Intake, MTHFR Polymorphisms, and Risk of Esophageal, Gastric, and Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *Gastroenterology* 2006; 131: 1271-83.
17. Semenza JC, Delfino RJ, Ziogas A, Anton-Culver H. Breast Cancer Risk and Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism. *Breast Cancer Res Treat* 2003. 77: 217-23.
18. Ilhan N, Kucuk M, Kaman D, Ilhan N, Ozbay Y. The 677 C/T MTHFR Polymorphism is Associated with Essential Hypertension, Coronary Artery Disease, and Higher Homocysteine Levels. *Arch Med Res* 2008; 39: 125-30.
19. Sheu WH, Lee WJ, Chen YT. Plasma Homocysteine Concentrations and Insulin Sensitivity in Hypertensive Subjects. *Am J Hypertens* 2000; 13: 14-20.
20. Outinen PA, Sood SK, Liaw PC, Sarge KD, Maeda N, Hirsh J, Ribau J, Podor TJ, Weitz JI, Austin RC. Characterization of the Stress-Inducing Effects of Homocysteine. *Biochem Journal* 1996; 332: 213-21.
21. Refsum H, Ueland P. Recent Data are not in Conflict with Homocysteine as a Cardiovascular Risk Factor. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9: 533-9.
22. Upchurch GR, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney JF Jr, Loscalzo J. Homocysteine Decreases Bioavailable Nitric Oxide by a Mechanism Involving Glutathione Peroxidase. *J Biol Chem* 1997; 272: 17012-17.
23. Unhee L, Cassano P. Homocysteine and Blood Pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 1105-13.

24. Nygård O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, Ueland M, Kvåle G. Total Plasma Homocysteine and Cardiovascular Risk Profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 1995; 274: 1526-33.
25. Sutton-Tyrrell K, Bostom A, Selhub J, Zeigler-Johnson C. High Homo- Cysteine Levels are Independently Related to Isolated Systolic Hypertension in Older Adults. *Circulation* 1997; 96: 1745-9.
26. Bortolotto LA, Safar ME, Billaud E, Lacroix C, Asmar R, London GM, Blacher J. Plasma Homocysteine, Aortic Stiffness, and Renal Function in Hypertensive Patients. *Hypertension* 1997; 34: 837-42.
27. García Cavazos RJ, Morán Barroso VF, Sánchez Urbina R, Galaviz Hernández C, Sierra Ramírez A. Trascendencia de los factores ambientales y genéticos en cardiopatías congénitas: el caso de la enzima MTHFR. *Perinatol Reprod Hum* 2006; 20: 39-47.
28. Zhang FF, Terry MB, Hou L, Chen J, Lissowska J, Yeager M, Zatonski W, Chanock S, Morabia A, Chow W. H. Genetic Polymorphisms in Folate Metabolism and the Risk of Stomach Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 115-21.
29. Put N, Gabreëls E, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ. A Second Common Mutation in the Methylene-tetrahydrofolate Reductase Gene: An Additional Risk Factor for Neural-Tube Defects? *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1044-51
30. Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, Olivieri O, Jacques PF, Rosenberg IH, Corrocher R, Selhub J. A Common Mutation In The 5, 10-Methylene-tetrahydrofolate Reductase Gene Affects Genomic DNA Methylation Through an Interaction with Folate Status. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 5606-11.
31. Castro R, Rivera I, Ravasco P, Camilo ME, Jakobs C, Blom HJ, de Almeida IT. 5,10-Methylene-tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) 677C-T and 1298 A-C Mutations are Associated with DNA Hypomethylation. *J Med Genet* 2004; 41: 454-8.
32. Graziano F, Kawakami K, Ruzzo A, Watanabe G, Santini D, Pizzagalli F, Bissonni R, Mari D, Floriani I, Catalano V, Silva R, Tonini G, Torri V, Giustini L, Magnani M. Methylene-tetrahydrofolate Reductase 677 C/T Gene Polymorphism, Gastric Cancer Susceptibility and Genomic DNA Hypomethylation in an At-Risk Italian Population. *Int J Cancer* 2006; 118: 628-32.
33. Lacasaña-Navarro M, Galván-Portillo M, Chen J, López-Cervantes M, López-Carrillo L. Methylene-tetrahydrofolate Reductase 677 C→T Polymorphism and Gastric Cancer Susceptibility in Mexico. *Eur J Cancer* 2006; 42: 528-33.
34. Langsenlehner T, Renner W, Yazdani-Biuki B, Langsenlehner U. Methylene-tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Breast Cancer Risk: A Nested-Case-Control Study and a Pooled Meta-Analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 107: 459-60.
35. Marchand LL, Haiman CA, Kolonel LN, Henderson BE. MTHFR Polymorphisms, Diet, Heart, and Breast Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 2071-7.
36. Chen J, Gammon MD, Chan W, Palomeque C, Wetmur JG, Kabat GC, Teitelbaum SL, Britton JA, Terry MB, Neugut AI, Santella RM. One-Carbon Metabolism, MTHFR Polymorphisms, and Risk of Breast Cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 1606-14.
37. Huh HJ, Chi HS, Shim EH, Jang S, Park CJ. Gene-Nutrition Interactions in Coronary Artery Disease: Correlation between the MTHFR C677T Polymorphism and Folate and Homocysteine Status in a Korean Population. *Thromb Res* 2006; 117: 501-6.
38. Mayor-Olea A, Callejón G, Palomares AR, Jiménez AJ, Gaitán MJ, Rodríguez A, Ruiz M, Reyes-Engel A. Human Genetic Selection on the MTHFR 677C → T Polymorphism. *BMC Med Genet* 2008; 9: 104.

39. Jerbi Z, Abdennebi M, Douik H, Ben Romdhane H, Harzallah L, Guemira F, Ghanem A. Étude du Polymorphisme C677T du Gène de la Méthylène Tétrahydrofolate Réductase dans la Population Tunisienne. *Ann Biol Clin* 2005; 63: 487-91.
40. Mao R, Fan Y, Jin Y, Bai J, Fu S. Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms and Lung Cancer: A Meta-Analysis. *J Hum Genet* 2008; 53: 340-8
41. Brilakis ES, Berger PB, Ballman KV, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) 677C→T and Methionine Synthase Reductase (MTRR) 66A→G Polymorphisms: Association with Serum Homocysteine and Angiographic Coronary Artery Disease in the Era of Flour Products Fortified with Folic Acid. *Atherosclerosis* 2003. 168: 315-22
42. Baum L, Wong KS, Ng HK, Tomlinson B, Rainer TH, Chan DK, Thomas GN, Chen X, Poon P, Cheung WS, Woo KS. Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene A222V Polymorphism and Risk of Ischemic Stroke. *Clin Chem Lab Med.* 2004; 42: 1370-6.
43. Stolzenberg-Solomon RZ, Qiao YL, Abnet CC, Ratnasinghe DL, Dawsey SM, Dong ZW, Taylor PR, Mark SD. Esophageal and Gastric Cardia Cancer Risk and Folate- and Vitamin B12-related Polymorphisms in Linxian, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 1222-6.
44. Li DH, Ahmed M, Li YN, Jiao L, Chou TH, Wolff RA, Lenzi R, Evans DB, Bondy ML, Pisters PW, Abbruzzese JL, Hassan MM. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and the Risk of Pancreatic Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1470-6
45. Alluri RV, Mohan V, Komandur S, Chawda K, Chaudhuri JR, Hasan Q. MTHFR C677T Gene Mutation as a Risk Factor for Arterial Stroke: A Hospital Based Study. *Eur J Neurol.* 2005; 12: 40-4.
46. Wang Y, Guo W, He Y, Chen Z, Wen D, Zhang X, Wang N, Li Y, Ge H, Zhang J. Association of MTHFR C677T and SHMT1 C1420T with Susceptibility to ESCC and GCA in a High Incident Region of Northern China. *Cancer Causes Control* 2007; 18:143-52.
47. Wang LD, Guo RF, Fan ZM, He X, Gao SS, Guo HQ, Matsuo K, Yin LM, Li JL. Association of Methylenetetrahydrofolate Reductase and Thymidylate Synthase Promoter Polymorphisms with Genetic Susceptibility to Esophageal and Cardia Cancer in a Chinese High-Risk Population. *Dis Esophagus* 2005; 18: 177-84.
48. Bermúdez M, Briceño I, Gil F, Bernal J. Homocisteína y polimorfismos de cistationina β sintasa y metilentetrahydrofolato reductasa en población sana de Colombia. *Colombia Médica* 2006; 37: 46-52.
49. Torres JD, Cardona H, Alvarez L, Cardona-Maya W, Castañeda S. A, Quintero-Rivera F, Cadavid A, Bedoya G, Tobón L. Inherited Thrombophilia is Associated with Deep Vein Thrombosis in a Colombian Population. *Am J Epidemiol* 2006; 81: 933-7.
50. Cardona H, Cardona-Maya W, Gómez J.G, Castañeda S. J, Gómez M, Bedoya G, Álvarez L, Torres J. D. Tobón L. I, Cadavid A. Relación entre los polimorfismos de la metilen-tetrahydrofolato-reductasa y los niveles de homocisteína en mujeres con pérdida gestacional recurrente: perspectiva desde la nutrigénica. *Nutrición Hospitalaria* 2008; 23: 277-82
51. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A Simple Salting Out Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cells. *Nucleic Acids Res*, 1988; 16: 1215.
52. Frosst P, Blom HJ, Milos P, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van der Heuvel LP, Rozen R. A Candidate Genetic Risk Factor for Vascular Disease: A Common Mutation in Methylenetetrahydrofolate Reductase. *Nat Genet.* 1995; 10: 111-3.
53. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A Second Genetic Polymorphism in Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Associated with Decreased Enzyme Activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64: 169-72.

54. Golbahar J, Aminzadeh MA, Hamidi SA, Omrani GR. Association of Red Blood Cell 5-Methyltetrahydrofolate Folate with Bone Mineral Density in Postmenopausal Iranian Women. *Osteoporos Int* 2005; 16: 1894-8
55. Fabris C, Toniutto P, Falletti E, Fontanini E, Cussigh A, Bitetto D, Fornasiere E, Fumolo E, Avellini C, Minisini R, Pirisi M. MTHFR C677T Polymorphism and Risk of HCC in Patients with Liver Cirrhosis: Role of Male Gender and Alcohol Consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 2009; 33: 102-7
56. Santos KG, Tschiedel B, Schneider J, Souto K, Roisenberg I. Diabetic Retinopathy in Euro-Brazilian Type 2 Diabetic Patients: Relationship with Polymorphisms in the Aldose Reductase, the Plasminogen Activator Inhibitor-1 and the Methylenetetrahydrofolate Reductase Genes. *Diabetes Res Clin Pract* 2003; 61: 133-6
57. Chou YC, Wu MH, Yu JC, Lee MS, Yang T, Shih HL, Wu TY, Sun C. A. Genetic Polymorphisms of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene, Plasma Folate Levels and Breast Cancer Susceptibility: A Case-Control Study in Taiwan. *Carcinogenesis* 2006; 27: 2295-300.
58. Wahlund S. Composition of populations and correlation appearances viewed in relation to the studies of inheritance. *Hereditas* 1928; 11: 65-106.
59. Overall ADJ. The Influence of the Wahlund Effect on the Consanguinity Hypothesis: Consequences for Recessive Disease Incidence in a Socially Structured Pakistani Population. *Hum Hered* 2009; 67:140-4.
60. Camacho Vanegas O, Giusti B, Restrepo Fernández CM, Abbate R, Pepe G. Frequency of Factor V (FV) Leiden and C677T Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Mutations in Colombians. *Thromb Haemost* 1998; 79:883-4.