



**Búsqueda de selección en el polimorfismo 677C→T  
(c.665C>T) del gen de la metilentetrahidrofolato  
reductasa (*MTHFR*) en una población Colombiana**

**JULIÁN CAMILO RIAÑO MORENO**

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO  
FACULTAD DE MEDICINA**

**Bogotá, Junio 2014**

**Búsqueda de selección en el polimorfismo 677C→T (c.665C>T)  
del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en una  
población Colombiana**

**JULIÁN CAMILO RIAÑO MORENO**

**Tesis de Grado presentada como requisito parcial para optar al título de  
MAESTRÍA en GENÉTICA HUMANA**

**Directora: MARÍA MARTÍNEZ AGÜERO, PhD**

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO  
FACULTAD DE MEDICINA**

**Bogotá, 2014**

***A la memoria de mi  
abuelito Cipriano quien  
siempre me acompaña.***

## **Agradecimientos**

Este trabajo fue posible gracias a la ayuda de muchas personas.

Quisiera agradecer en especial a mi directora, María Martínez Agüero del grupo de investigación en Ciencias Básicas Médicas de la Universidad del Rosario, por hacer este trabajo posible, además de su paciencia, su incesante apoyo y continuo fomento de las habilidades investigativas. A Elizabeth Vargas Castellanos, por enseñarme los lineamientos en el trabajo de laboratorio, su confianza e incondicionalidad. A Edilberto Ángel, por su ayuda y persistencia en la consecución de las muestras. A todos mis compañeros de maestría por enseñarme el trabajo en equipo. A la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, y en especial a todo el grupo de Ciencias Básicas Médicas, quienes me dieron la oportunidad, el respaldo y la orientación para el desarrollo de este trabajo. A la Escuela de Medicina, y en especial a todo grupo de Genética Humana por sus enseñanzas y aportes en mi desarrollo como profesional en genética. A Manuel Ruiz-García, de la Pontificia Universidad Javeriana, por sus enseñanzas en genética de poblaciones y por permitirme trabajar en su laboratorio de Genética de Poblaciones y Biología Evolutiva.

Y, finalmente, doy gracias a mis padres por su apoyo y paciencia durante el desarrollo de mis estudios y el desarrollo de este trabajo.

# Tabla de contenido

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Marco teórico</b>	<b>14</b>
2.1	Folatos y el ácido Fólico	14
2.1.1	Absorción y metabolismo del folato.	15
2.1.2	Ácido fólico, defectos de tubo neural y salud pública.	18
2.1.3	Genética de los defectos de tubo neural.	21
2.2	Aspectos genéticos del gen MTHFR	21
2.3	Proteína MTHFR	22
2.4	Ciclo de un carbono y la MTHFR	23
2.5	Mutaciones del MTHFR	26
2.6	Polimorfismos del <i>MTHFR</i>	27
2.7	Polimorfismo <i>MTHFR</i> 677 C→T	28
2.7.1	Asociaciones clínicas del polimorfismo <i>MTHFR</i> 677C→T	30
2.7.2	Frecuencias del polimorfismo <i>MTHFR</i> 677C→T	31
2.7.3	Estudios funcionales del polimorfismo 677C→T	34
2.7.4	Polimorfismo <i>MTHFR</i> 677C→T y el folato	40
2.8	Efecto de selección por el polimorfismo <i>MTHFR</i> 677 C→T consecuencia del folato	42
<b>3</b>	<b>Objetivos</b>	<b>45</b>
3.1	Objetivo general	45
3.2	Objetivos específicos	45
<b>4</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>46</b>
4.1	Diseño del estudio	46
4.1.1	Criterios de inclusión	46
4.1.2	Criterios de exclusión	47
4.2	Tamaño de muestra	48
4.3	Poblaciones de estudio y muestras	49
4.4	Extracción de ADN	49
4.5	Amplificación por PCR	50
4.6	Genotipificación	50
4.7	Análisis genético – poblacional	51

<b>5</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>56</b>
5.1	Toma de muestra.....	56
5.2	Análisis genético-poblacional .....	57
<b>6</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>70</b>
6.1	Análisis de genotipos y frecuencias alélicas .....	70
6.2	Análisis de equilibrio Hardy-Weinberg .....	73
6.3	Diversidad y estructura poblacional.....	76
6.4	Modelo de selección .....	79
6.5	Selección, folatos y ácido fólico .....	81
6.6	Nutrición y evolución humana .....	84
6.7	Cambios culturales, ácido fólico y el polimorfismo <i>MTHFR</i> 677C→T.....	87
6.8	Consideraciones finales .....	89
<b>7</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>92</b>
<b>8</b>	<b>Perspectivas.....</b>	<b>94</b>
<b>9</b>	<b>Referencias .....</b>	<b>95</b>
<b>10</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>109</b>
10.1	Anexo 1. Concentraciones de Folatos naturales y ácido fólico sintético.....	109
10.2	Anexo 2. Consentimientos informados. ....	111
10.3	Anexo 3. Asentimiento informado.....	119
10.4	Anexo 4. Cereales que contiene 100% del valor diario (DV) de ácido fólico.....	121

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b>	Estructura química del ácido pteroilglutámico. ....	15
<b>Figura 2.</b>	Absorción y metabolismo de los folatos y su distribución en diferentes compartimientos. ....	17
Figura 3.	Países con regulaciones para la fortificación de las harinas.. ....	19
Figura 4.	Metabolismo de un carbono.....	26
Figura 5.	Frecuencia de los alelos para el polimorfismo <i>MTHFR</i> 677C→T en Europa.....	32
Figura 6.	Frecuencia de los alelos para el polimorfismo <i>MTHFR</i> 677C→T en África. ....	33
Figura 7.	Mecanismo propuesto para disociación del FAD en humanos. ....	37
Figura 8.	Alineamiento de las secuencias del dominio catalítico de la <i>MTHFR</i> de <i>E. coli</i> y humano. ....	38
Figura 9.	Incremento de la tasa de disociación del cofactor FAD asociado a Ala177Val en <i>E. coli</i> (A) y humano Ala222Val (B).....	39

Figura 10. Protección de la disociación del cofactor FAD asociado a Ala177Val en <i>E. coli</i> (A) y humano Ala222Val (B) asociado a la adición de folato CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> (folato en forma monoglutámica). .....	39
Figura 11. Mecanismo celular putativo del flujo de un carbono con relación a la presencia del polimorfismo MTHFR 677C→T. ....	41
Figura 12. Modelos de interacción gen-nutriente (polimorfismo MTHFR 677C→T y Folato) .....	42
Figura 13. A. Gel de agarosa al 2% donde se evidencia cada genotipo.....	58
Figura 14. Frecuencias alélicas para el polimorfismo <i>MTHFR</i> 677C→T en cada grupo de poblacional. ....	60
Figura 15. Simulación del cambio de las frecuencias genotípicas en 10 generaciones. Modelo de selección del heterocigoto, si se mantienen los mismos valores de <i>fitness</i> relativo para cada genotipo.....	69
Figura 16. Simulación en el cambio de las frecuencias alélicas en 10 generaciones bajo un modelo de selección de heterocigoto, si se mantiene los mismos valores de <i>fitness</i> relativo para cada genotipo.....	70
Figura 17. Resumen y modelo de las interacciones culturales y los cambios en las frecuencias del polimorfismo <i>MTHFR</i> 677C→T a través de diferentes momentos de la historia humana fuera de África.....	88

## Lista de tablas

Tabla 1. Cantidades mínimas de micronutrientes por cada kilogramo de harina, con los que debe ser fortificada la harina de trigo en el territorio colombiano(15). ....	20
Tabla 2. Polimorfismos de la MTHFR. *Polimorfismo que afectan la actividad enzimática de la MTHFR confirmado en estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (30,33,44).....	28
Tabla 3. Estudios de asociación entre el polimorfismo 677C→T y enfermedad. ....	31
Tabla 4. Relación genotipo – fenotipo en ratones <i>knock-out</i> .....	36
Tabla 5. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo <i>MTHFR</i> 677C→T en diferentes regiones del mundo.....	60
Tabla 6. Proporciones genotípicas observadas (obs) y esperadas (esp) para la muestra total.....	61
Tabla 7. Proporciones genotípicas observadas (obs) y esperadas (esp) para el grupo de total de adultos.. ....	61
Tabla 8. Proporciones genotípicas observadas (obs) y esperadas (esp) para el subgrupo de adultos de la ciudad de Villavicencio.....	62
Tabla 9. Proporciones genotípicas observadas (obs) esperadas (esp) para el subgrupo de adultos de la ciudad de Bogotá D.C.....	62
Tabla 10. Proporciones genotípicas observadas (obs) y esperadas (esp) para el grupo total de niños. ....	62
Tabla 11. Proporciones genotípicas observadas (obs) y esperadas (esp) para el subgrupo de niños de la ciudad de Villavicencio.....	62
Tabla 12. Proporciones genotípicas observadas (obs) y esperadas (esp) para el subgrupo de niños de la ciudad de Bogotá D.C.....	62
Tabla 13. Cálculo de equilibrio Hardy-Weinberg global, para cada una de las hipótesis. .	63
Tabla 14. Calculo de equilibrio Hardy-Weinberg para cada subgrupo, para la hipótesis déficit de heterocigotos. ....	63

Tabla 15. Cálculo de equilibrio Hardy-Weinberg para cada subgrupo, para la hipótesis exceso de heterocigotos. ....	63
Tabla 16. Cálculo de diversidad (Heterocigocidad) entre los individuos ( $1 - Q_{intra}$ ) y entre los individuos entre las poblaciones ( $1 - Q_{inter}$ ) .....	64
Tabla 17. Estimaciones de diversidad de Nei.....	65
Tabla 18. Estadísticos F para la muestra total. ....	65
Tabla 19. Estadísticos F para el grupo de Adultos. ....	65
Tabla 20. Estadísticos F para el grupo de niños. ....	65
Tabla 21. Significancia del estadístico <i>Fst</i> asumiendo o sin asumir EHW. ....	66
Tabla 22. Coeficiente de endogamia ( <i>f</i> ) de Wright. ....	66
Tabla 23. Parámetros de Selección. Línea roja representa el evento de selección sobre los genotipos iniciales. ....	67
Tabla 24. Frecuencias ( <i>Fq</i> ) de los genotipos antes y después de la selección asumiendo EHW. <i>Fitness</i> promedio ( <i>w</i> ). ....	67
Tabla 25. Comparación entre las frecuencias alélicas observadas y esperadas después de la selección (post-selección) .....	67
Tabla 26. Comparación entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas luego de una generación, antes y después de la selección. ....	68

## Resumen

Se realizó un estudio genético – poblacional en dos grupos etarios de población colombiana con la finalidad de evaluar las diferencias genéticas relacionadas con el polimorfismo *MTHFR* 677C→T, en busca de eventos genéticos que soporten la persistencia de este polimorfismo en la especie humana, debido a que este ha sido asociado con múltiples enfermedades. De esta manera, se genotipificaron los individuos, se analizaron los genotipos, las frecuencias alélicas y se realizaron diferentes pruebas genético-poblacionales.

Contrario a lo observado en poblaciones colombianas, previamente publicadas, se identificó la ausencia del equilibrio Hardy-Weinberg en el grupo de los niños y estructuras poblacionales entre los adultos, lo que sugiere diferentes historias demográficas y culturales entre estos dos grupos poblacionales al tiempo, lo que soporta la hipótesis de un evento de selección sobre el polimorfismo en nuestra población.

De igual manera, nuestros datos fueron analizados junto con estudios previos a nivel nacional y mundial lo cual sustenta que el posible evento selectivo es debido a que el aporte de ácido fólico se ha incrementado durante las últimas dos décadas como consecuencia de las campañas de fortificación de las harinas y suplementación a las embarazadas con ácido fólico, por lo tanto aquí se propone un modelo de selección que se ajusta a los datos encontrados en este trabajo se establece una relación entre los patrones nutricionales de la especie humana a

través de la historia que explica las diferencias en frecuencias de este polimorfismo a nivel espacial y temporal.

# 1 Introducción

El folato es una vitamina esencial indispensable para el mantenimiento de la homeostasis celular, se encuentra como folato en las fuentes naturales y como ácido fólico en fuentes sintéticas. El folato y el ácido fólico son metabolizados en el ciclo del ácido fólico cuya enzima principal es la MTHFR. Esta enzima está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis celular, por medio de la regulación de importantes procesos tales como la producción de purinas y piridinas por lo tanto la replicación del ADN, producción de aminoácidos, procesos de metilación de ácidos nucleicos, lípidos y proteínas y regulación de la síntesis de homocisteína. Se ha observado que variantes que generan disminución en la función enzimática producen un sinnúmero de fenotipos que pueden comprometer el componente celular y así la salud de los individuos que las presentan.

El polimorfismo 677 C→T de la MTHFR es una variante termolábil que se relaciona con una reducción en la capacidad enzimática residual leve– moderada (35-45%). Esta variante se ha correlacionado con susceptibilidad para múltiples estados de enfermedad en el humano, entre los que se encuentran defectos del tubo neural (NTDs), hipermocisteinemia, homocistinuria, y otros que se han evidenciado en pacientes adultos como enfermedad cardiovascular, cáncer, enfermedad de Alzheimer, entre otros.

La frecuencia y distribución de este alelo en la población general, revela una amplia variación regional y étnica, encontrándose en mayor frecuencia en poblaciones de Norteamérica, México, Italia y en ciertas poblaciones caucásicas, a

diferencia de la baja frecuencia en poblaciones afroamericanas y, aún más, en poblaciones africanas.

Estos cambios poblacionales han sugerido posibles eventos de ventaja selectiva para el alelo 677T en ciertas poblaciones, el cual puede ser beneficiado por el ambiente. Se han postulado varias hipótesis que respaldan este efecto selectivo; entre estas se encuentra la hipótesis de interacción gen-nutriente, la cual sugiere que el aporte de folatos o ácido fólico estabilizan la enzima termolábil logrando una actividad enzimática casi similar a la enzima silvestre y las diferencias en la frecuencia del alelo 677T entre la población humana en la actualidad es justificada por el incremento en el uso del ácido fólico durante las últimas décadas consecuencia de las medidas de salud pública de fortificación de las harinas y suplementación a las embarazadas con ácido fólico para la prevención de defectos del tubo neural (DTN).

La suplementación y las campañas de fortificación de las harinas con ácido fólico en Colombia se establecieron a partir 1996. Por lo tanto, este estudio se centra en evidenciar los cambios de las frecuencias del alelo 677C→T de la MTHFR en la población colombiana nacida antes del año 1976 y niños nacidos después del año 2000, con el fin de establecer y explicar el posible evento de selección sugerido por la hipótesis de interacción gen-nutriente.

Para esto, se realizó un estudio genético-poblacional que incluyó la evaluación de los genotipos y el análisis de las frecuencias alélicas entre estos dos grupos poblacionales, a su vez se analizó el Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), se realizaron estimaciones de heterogeneidad y de estructura poblacional.

Finalmente, se analizaron los datos bajo el modelo de selección a favor del heterocigoto y los hallazgos se compararon con otros trabajos realizados a nivel nacional e internacional, además se plantearon modelos con los cuales se pueden explicar las diferencias del polimorfismo *MTHFR* 677C→T entre los grupos humanos.

## 2 Marco teórico

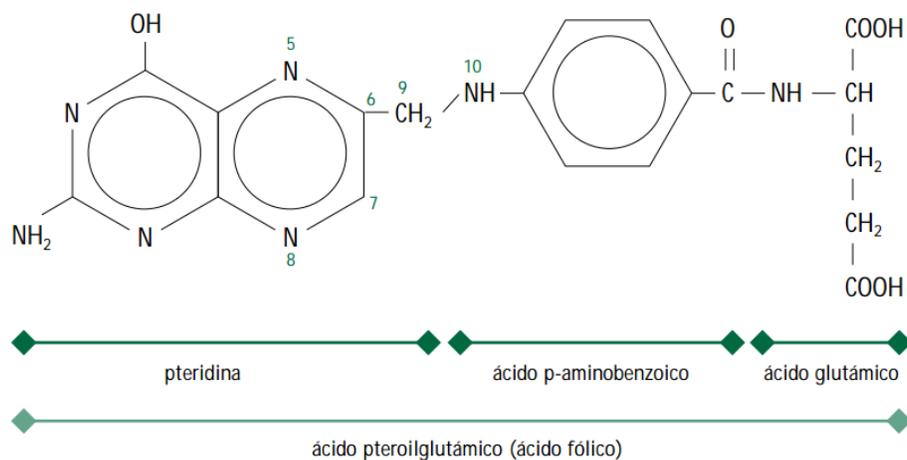
### 2.1 Folatos y el ácido Fólico

Folato es el nombre genérico de una gran familia químicamente similar conocida como vitamina B9(1). El folato es usualmente obtenido de fuentes naturales y en algunos casos de fuentes sintéticas (suplementos dietarios o alimentos enriquecidos) en forma de ácido fólico(1,2).

En 1931 Lucy Wills demostró que el extracto de levadura fue efectivo para el manejo de la anemia macrocítica(3). Posteriormente, varios investigadores identificaron el compuesto que producía la mejoría clínica de la anemia macrocítica y a su vez determinó que este compuesto era común en vegetales de hoja verde, como la espinaca, por lo cual lo nombraron folato del latín *folium* (hoja)(4).

Los humanos no sintetizan el folato, así que dependen únicamente de la disponibilidad de fuentes externas. El folato se encuentra en múltiples alimentos, entre estos, vísceras como el hígado y el riñón, los vegetales de hoja verde, los granos y las frutas cítricas (Tabla 1. [Anexo 1](#)). Adicionalmente, algunas fuentes con moderado contenido de esta vitamina, tales como pan, papas y harinas de cereales, son consumidas actualmente en grandes cantidades debido a que contribuyen ampliamente en la ingesta total de esta vitamina(1,2). Los folatos presentan un anillo de pteridina, un ácido p-aminobenzoico y un ácido glutámico (2,5) ([Fig 1](#)). Los compuestos pertenecientes a esta familia difieren en el estado de oxidación de su anillo de pteridina, el número de residuos de ácido glutámico y la unidad de un carbono (metil, metilen, metenil, formil o formimino) en la posición N5

o N10(1,2,5). Comúnmente se encuentra en fuentes naturales en forma poliglutámica (folilpoliglutamatos), mientras que las formas sintéticas (denominado ácido fólico) (presentaciones disponibles Tabla 2. [Anexo 1](#)) se encuentra en forma monoglutámica o de pteroilmonoglutamato (PteGlu). Debido a que al estar completamente oxidada es más estable, por lo que es resistente a la degradación, esta presentación alcanza una alta biodisponibilidad (alrededor del 98%)(6), lo cual contrasta con la baja biodisponibilidad evidente de los folatos provenientes de fuentes naturales (alrededor del 30%)(6).



**Figura 1.** Estructura química del ácido pteroilglutámico.

Tomado de Varela *et al.* 2000(7)

### 2.1.1 Absorción y metabolismo del folato.

Los folilglutamatos pierden sus residuos glutámicos a nivel gastrointestinal y son convertidos a monoglutamatos, reacción catalizada por la pteroilpoliglutamato hidrolasa presente en el enterocito. Los monoglutamatos así formados, y los que proviene de fuentes sintéticas (ácido fólico), ingresan al enterocito tanto por transporte activo como por difusión pasiva. Posteriormente, son trasferidos al

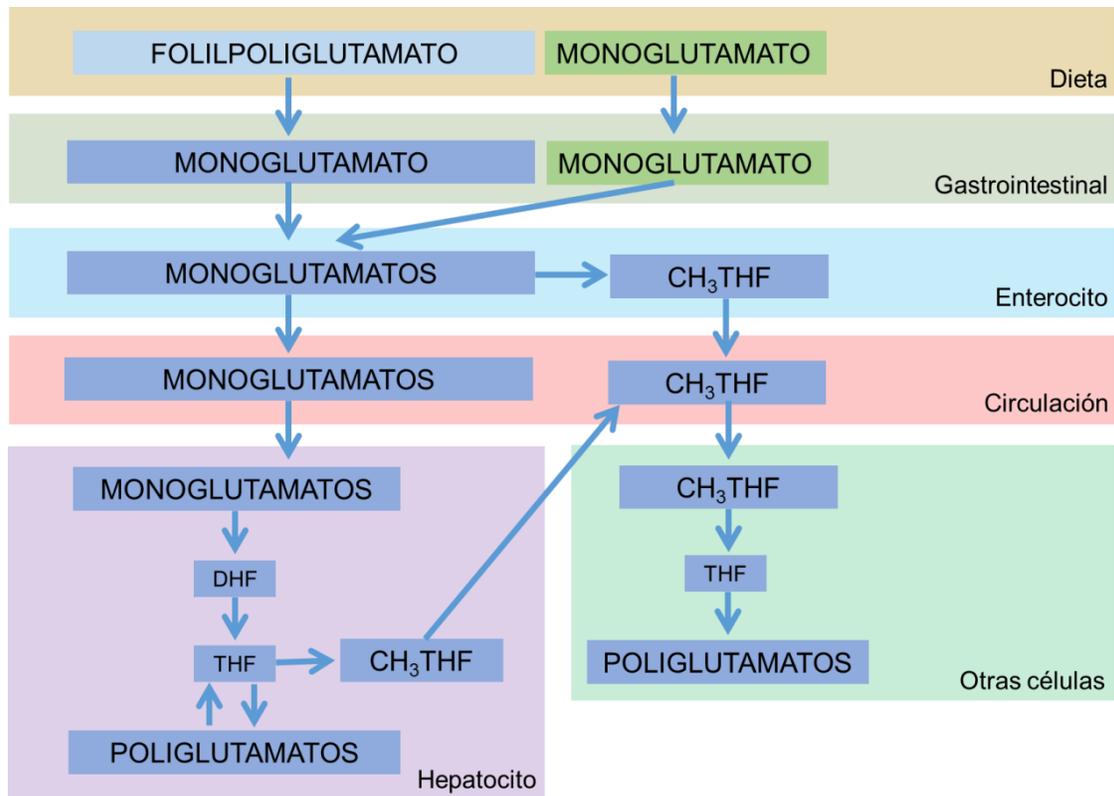
plasma sin más transformaciones, a excepción de una pequeña parte que es reducida y metilada para dar lugar a 5-metiltetrahidrofolato ( $\text{CH}_3\text{THF}$ )(7)([Fig 2](#)).

El  $\text{CH}_3\text{THF}$  pasa a la circulación periférica y se difunde en otros tejidos, mientras que los derivados monoglutámicos se metabolizan en el hígado, donde son reducidos a dihidrofolato o tetrahidrofolato y son metilados a  $\text{CH}_3\text{THF}$ , forma en la cual cumplen sus funciones directamente(6)([Fig 2](#)). En el hígado son almacenados como poliglutamatos alcanzando reservas entre 5-10mg, suficientes para cubrir las necesidades de cuatro meses(7).

La principal forma circulante de los folatos es el  $\text{CH}_3\text{THF}$  ([Fig 2](#)); este se encuentra unido a la albumina y a la proteína de unión a folatos, sin embargo, la tasa plasmática de folatos es de 10-30nmol/l mientras que en eritrocitos es de 10 a 30 veces más alta(7).

En los tejidos el folato se encuentra principalmente como derivados poliglutamados cumpliendo sus funciones en el ciclo de un carbono(1), el cual será explicado más adelante. Los órganos más ricos en folatos son el hígado y el cerebro, siendo la tasa de folatos en líquido cefalorraquídeo tres a cuatro veces superior a la plasmática(7).

Durante el ciclo de un carbono se forman nuevamente folatos monoglutamatos que son poliglutamados por la folilpoliglutamato sintasa forma en la que permanecen retenidos en el interior de la célula(1)([Fig 2](#)).



**Figura 2.** Absorción y metabolismo de los folatos y su distribución en diferentes compartimientos.

Modificado de Varela *et al.* 2000 (7)

Los folatos son eliminados del organismo a través de las vías fecal y urinaria. En la vía fecal se eliminan folatos procedentes de la alimentación y que no son absorbidos (aproximadamente un 20%), de la secreción biliar y de la síntesis de las bacterias intestinales, sin embargo, estos folatos pueden ser reabsorbidos, estableciéndose un ciclo entero-hepático(7).

A través de la orina se eliminan los folatos metabolizados como pteridinas y ácido benzoilglutámico. Aproximadamente son eliminados por esta vía entre 1-10 µg /día de estos metabolitos(7).

### **2.1.2 Ácido fólico, defectos de tubo neural y salud pública.**

El ácido fólico ha llamado gran interés en la comunidad científica por su efecto de prevención primaria y prevención en la recurrencia de los defectos de tubo neural (NTDs)

Los defectos de tubo neural (NTDs, por sus siglas en inglés) son el espectro de malformaciones congénitas más comunes, con una incidencia global de más de 300.000 casos nuevos por año y con una mortalidad elevada de 41.000 muertes/año aproximadamente.

Las primeras descripciones del efecto preventivo del ácido fólico sobre los NTDs fueron hechas por Hibbard en 1964(8). Subsecuentes estudios caso-control, aleatorizados y no aleatorizados de suplementación con ácido fólico y multivitamínicos en mujeres gestantes evidencian reducción en la incidencia de NTDs entre 35 - 75%(9–11).

Estos y muchos otros estudios, económicos y de salud pública, acerca del efecto preventivo sustentan la puesta en marcha de campañas y legislaciones a nivel mundial con el fin de iniciar la fortificación de las harinas con ácido fólico y la suplementación a las gestantes para prevenir los NTDs.

Por su parte, el departamento de salud y servicios humanos de la FDA (*US Food and Drug Administration*) reglamentó e hizo mandatoria en los Estados Unidos la fortificación de las harinas con aproximadamente 140µg de ácido fólico por cada 100g de harina y la suplementación a las gestantes en el periodo periconcepcional con mínimo 400µg/día de ácido fólico al menos un mes antes y durante el primer



implementación de este decreto inició el 28 de octubre 1996 en todo el territorio nacional.

<b>Micronutriente</b>	<b>Cantidad mínima (Mg/Kg)</b>
<b>Vitamina B1 o Tiamina</b>	6 mg
<b>Vitamina B2 o Riboflavina</b>	4 mg
<b>Niacina</b>	55 mg
<b>Ácido Fólico o Folato</b>	1.54 mg
<b>Hierro</b>	44 mg
<b>Calcio (Opcional)</b>	1280 mg

**Tabla 1.** Cantidades mínimas de micronutrientes por cada kilogramo de harina, con los que debe ser fortificada la harina de trigo en el territorio colombiano(15).

Por otra parte, la reglamentación acerca de la suplementación a las gestantes en periodo periconcepcional en Colombia se hace reglamentaria con la resolución 412 del 2000 la cual establece a las normas técnicas y guías de atención para el desarrollo de las acciones de protección específica, detección temprana y atención de enfermedades de interés en salud pública y enfatiza que para la prevención de los defectos del tubo neural la administración durante el periodo preconcepcional se hará al menos cuatro semanas previas a la gestación (1 mes) y en las primeras doce semanas, y la dosis será de 4 mg/día en mujeres con antecedente de hijo con NTDs o en tratamiento con medicamentos que aumenten su incidencia (ej. Metrotexate, ácido valproico, etetrinato, entre otros) y de 400 µg/día, en gestantes sin estos antecedentes(16).

### **2.1.3 Genética de los defectos de tubo neural.**

Los NTDs son causados por falla del cierre del tubo neural durante la embriogénesis en el periodo postconcepcional, periodo que abarca los días 21 al 28, y su presentación clínica puede cursar desde anencefalia (forma más severa y letal de los NTDs) hasta espina bífida, forma menos severa que puede causar diferentes niveles de discapacidad según su severidad(13,17). Los NTDs son considerados defectos multifactoriales con heredabilidad de hasta el 60%(18).

Experimentos en modelos animales y estudios de asociación basados en familias (43–45), han permitido el descubrimiento de múltiples genes candidatos asociados a los NTDs, evidenciando comúnmente múltiples genes que participan en el ciclo del folato y la metionina (46,47), siendo el gen *MTHFR* uno de los más estudiados(17,19).

### **2.2 Aspectos genéticos del gen MTHFR**

El gen *MTHFR* fue aislado por primera vez a partir de ADNc de hígado de cerdo(20). Con su aislamiento y secuenciación se logró identificar el ADNc en librerías de ADN humano, encontrándolo en el *locus* 1p36.22(21).

Este gen consta de 11 exones(22) y presenta ciertas particularidades a nivel de ARN ya que se han evidenciado diferentes tamaños en los transcritos –2.8, 7.2, 7.7 y 9.5kb– los tres primeros en todos los tejidos y el último, de manera particular, en cerebro, músculo, placenta y estómago(22,23). Las diferencias en el tamaño de los transcritos han sido explicadas por sitios alternativos del inicio de la transcripción, múltiples sitios de poliadenilación y *splicing* alternativo(23,24). Los

mayores niveles de expresión de este gen se han encontrado en testículos y riñón, siendo menor en los demás tejidos pero constante(23–25).

### **2.3 Proteína MTHFR**

Estructuralmente la MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa) es una flavoproteína de 656 aminoácidos con un peso molecular aproximado a 77kDa(26). En humanos se han encontrado diferentes isoformas de MTHFR siendo las más comunes aquellas con pesos de 77kDa y 70kDa(22,27–29).

La MTHFR es una enzima citosólica, se encuentra en forma de homodímeros(26) y su función es altamente dependiente de su cofactor flavín adenín dinucleótido (FAD) (26,28,30). Cada dímero de MTHFR permanece unido por enlaces no covalentes(26) y sus monómeros contienen un dominio catalítico N-terminal que se une al cofactor FAD y un dominio C-terminal o dominio regulador(30–32) que se une alostéricamente a S-adenosilmetionina (AdoMet [SAM]) produciendo un efecto inhibitorio en respuesta al contenido de metionina en la célula(26).

Esta enzima pertenece a la familia de proteínas denominadas metilentetrahidrofolato reductasa. Esta familia se caracteriza por presentar un dominio común y altamente conservado, homónimo, el cual estructuralmente está caracterizado como un dominio barril TIM (triosa fosfato isomerasa)(30,31) e incluye las 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa bacterianas y la metilentetrahidrofolato reductasa encontrada en eucariotas(30). Estas dos enzimas difieren entre ellas debido a que la última solo puede usar NADP<sup>+</sup> como aceptor, mientras que la primera es flexible respecto al aceptor(28,30,33) La función de estas dos enzimas (la bacteriana y la eucariota) es la misma: funcionan

como un componente clave en la vía del metabolismo del folato, catalizando la conversión irreversible de 5,10-metilenetetrahydrofolato ( $\text{CH}_2\text{THF}$ ), un donador de carbono para la biosíntesis de nucleótidos, en 5-metilentetrahydrofolato ( $\text{CH}_3\text{THF}$ ) el mayor donador de carbono en la síntesis de metionina (Met) a partir de homocisteína (Hcy)(26,27,30,34).

## 2.4 Ciclo de un carbono y la MTHFR

El metabolismo de un carbono está involucrado en dos procesos fisiológicos esenciales: síntesis de bases nitrogenadas, requerido para la síntesis y reparación del ADN y el ARN a través del ciclo del folato y la metilación de biomoléculas a través del ciclo de la metionina(26,31), procesos que mantienen la homeostasis celular. Estos dos ciclos están eficientemente balanceados a través de cuatro reacciones fundamentales anabólicas y catabólicas:

1. Biosíntesis *de novo* de purinas(anabólica)(1,31)
2. Biosíntesis *de novo* de timidilato y pirimidinas (anabólica)(1)
3. Remetilación de homocisteína (Hcy) (anabólica)(1,26),
4. Transulfuración de la homocisteína (Hcy) (catabólica)(26,35)

La primera de éstas sólo ocurre cuando los nucleótidos purínicos no están disponibles por la vía clásica de su formación. Durante este proceso es requerido el formiltetrahydrofolato( $\text{CHOTHF}$ ) para añadir los carbonos C2 y C8 del anillo purínico, lo cual ocurre tanto en el citoplasma como en el núcleo(34).

El  $\text{CHOTHF}$  es también un sustrato para la segunda reacción (biosíntesis de timidilato) debido que puede ser reducido a meteniltetrahydrofolato ( $\text{CHTHF}$ ) por la meteniltetrahydrofolato deshidrogenasa (MTHFD1) y posteriormente a 5, 10-

metiltetrahydrofolato ( $\text{CH}_2\text{THF}$ ) ([Fig 4](#). Ciclo del folato, flechas violeta)(1,34). De igual manera, el  $\text{CH}_2\text{THF}$  puede también ser obtenido en el citoplasma a partir de serina y tetrahydrofolato (THF) esta reacción es catalizada por la enzima serina hidroximetiltransferasa (SHMT)([Fig 4](#). flechas verdes)(34).

El  $\text{CH}_2\text{THF}$  es un cofactor para la metilación de deoxiuridina monofosfato (dUMP) a deoxitimidinamonofosfato (dTMP) en una reacción catalizada por la timidilato sintasa (TS). En esta reacción,  $\text{CH}_2\text{THF}$  funciona como donador de un carbono generando dihydrofolato (DHF). La dihydrofolato reductasa (DHFR) regenera el THF ([Fig 4](#). Ciclo del folato, flechas azules entrecortadas)(34).

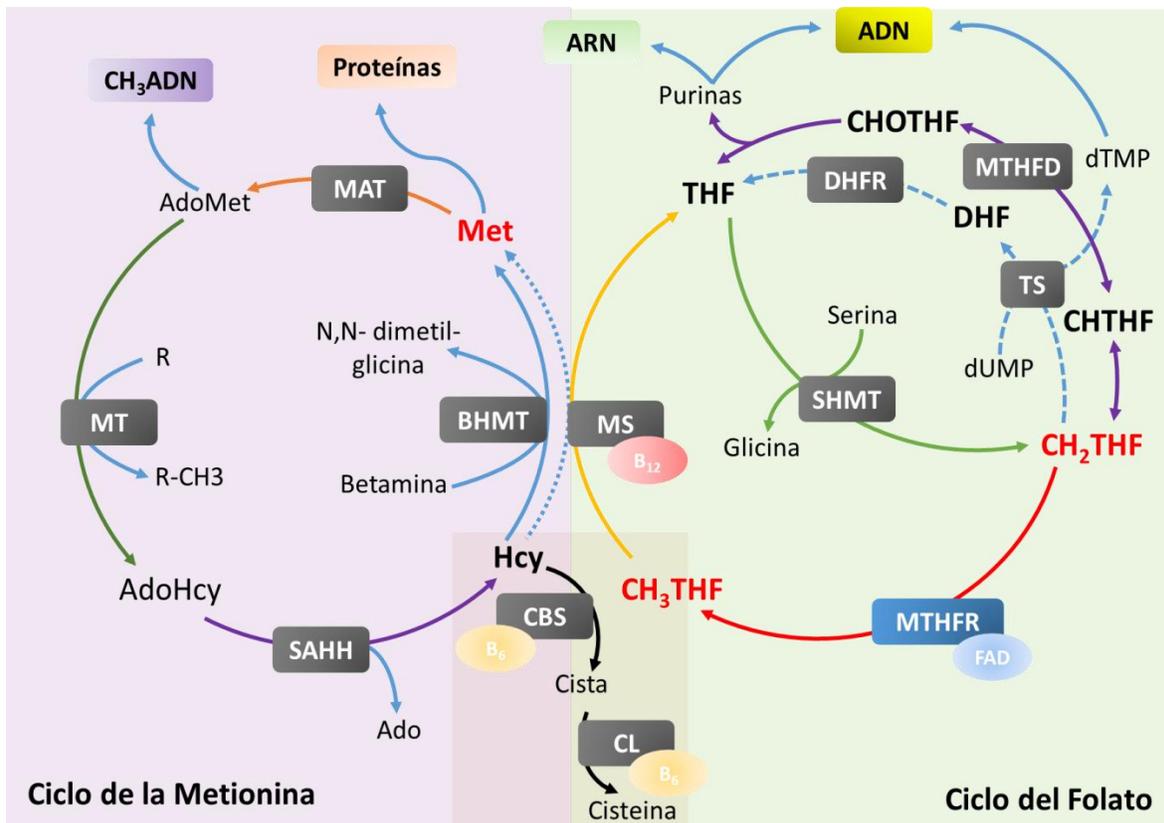
Alternativamente, el  $\text{CH}_2\text{THF}$  puede ser reducido a 5-metiltetrahydrofolato ( $\text{CH}_3\text{THF}$ ) en una reacción dependiente de NADPH por la enzima MTHFR ([Fig 4](#). Ciclo del folato, flecha roja)(1,28,34,35).

El  $\text{CH}_3\text{THF}$  sirve como donador de un carbono para la remetilación (tercera reacción) de homocisteína a metionina catalizada por la metionina sintasa (MS) ([Fig 4](#). Ciclo de la metionina, flecha punteada). Para formar S-adenosilmetionina (AdoMet [SAM]), el donador de grupos metilo más importante para los procesos de metilación (particularmente necesario durante el periodo embrionario)(26).

Después de la transferencia del grupo metilo (para metilación de proteínas, ADN, neurotransmisores, fosfolípidos y otras moléculas pequeñas) AdoMet es convertida a S-adenosil homocisteína (AdoHyc [SAH]) ([Fig 4](#). Ciclo de la metionina, flecha verde), AdoHyc es la única fuente celular de homocisteína (Hyc) por lo cual AdoHyc es convertida en Hyc durante una reacción catalizada por la SAH hidrolasa (SAHH) ([Fig 4](#). Ciclo de la metionina, flecha violeta)(26,34).

La transulfuración de la Hcy (cuarta reacción) produce cisteína y glutatión a través de la cistationina beta sintasa (CBS) degradando permanentemente la Hcy ([Fig 4](#). ciclo de la metionina, flechas negras)(26,35).

La regulación metabólica de las dos últimas reacciones (remetilación y transulfuración) se encuentra bajo el control e influencia de AdoMet, la cual regula el uso de la homocisteína, por medio de inhibición alostérica de la MTHFR y la activación de la CBS. Así, cuando los niveles de AdoMet disminuyen, la formación de CH<sub>3</sub>THF incrementa mientras la formación de cistationina se reduce, reservando la homocisteína para la producción de metionina. En el caso contrario, si hay un incremento de AdoMet se incrementa la transulfuración de la homocisteína a través de la activación de CBS e inhibición de la MTHFR(26).



**Figura 4.**Metabolismo de un carbono.Se muestra los ciclos en los cuales está involucrada la función de la MTHFR. Abreviaturas: Ado, adenosina; AdoHcy, S-adenosilhomocisteína; AdoMet, S-adenosilmetionina;B12, Vitamina B12; BHMT, betamina-homocisteína S-metiltransferasa; Cista, cistationina; CBS, cistationina  $\beta$ -sintasa; CH2THF, 5,10-metiltetrahydrofolato; CH3THF, 5-metiltetrahydrofolato; CH3ADN, ADN metilado; CHOTHF, formiltetrahydrofolato; CHTHF, metiltetrahydrofolato;CL, cistationina liasa; DHF, dihydrofolato; DHFR, dihydrofolato reductasa; dTMP, deoxitimidina monofosfato; dUMP, deoxiuridina monofosfato;FAD, flavin adenin dinucleotido; Hcy, homocisteína;MAT, metionin adenosiltransferasa; Met, metionina;MTHFR, metilentetrahydrofolato reductasa; MTHFD, metilentetrahydrofolato deshidrogenasa; MS, metionina Sintasa; MT, metiltransferasa; SHMT, merinahidroxi metil transferasa; SAHH, S-adenosilhomocisteína hidrolasa; THF, tetrahydrofolato.

Modificado de De Ueland *et al.* 2001(36).

## 2.5 Mutaciones del MTHFR

Se han identificado varios tipos de mutaciones en el gen *MTHFR*: mutaciones *nonsense* (sin sentido) (37,38) y *missense* (con cambio de sentido) que usualmente comprometen el extremo C-terminal y coinciden con el sitio de unión a SAM lo que altera su regulación inhibitoria (37). Menos común es la presencia de

mutaciones tipo *frameshift* (corrimiento del marco de lectura) (39) o mutaciones en el sitio de *splicing* (38).

Estas variantes usualmente se correlacionan con una actividad residual menor del 20% lo que produce fenotipos severos que cursan con hiperhomocistinuria (OMIM236250) e hiperhomocisteinemia (OMIM603174)(36,38,40–42).

El fenotipo de hiperhomocistinuria se considera el desorden metabólico más común en el nacimiento. Los síntomas clínicos en estos pacientes incluyen: retraso en el desarrollo psicomotor, alteraciones vasculares y neurológicas, tales como convulsiones, y alteraciones en la coagulación como consecuencia de la hiperhomocisteinemia(42).

## **2.6 Polimorfismos del *MTHFR***

Históricamente, las investigaciones de los defectos consecuencia de variantes del gen *MTHFR* se han centrado en los errores innatos del metabolismo que llevan a severa hiperhomocisteinemia y homocistinuria. Sin embargo, la identificación de polimorfismos en *MTHFR* que resultan en leve hiperhomocisteinemia se encuentran asociados a fenotipos multifactoriales como algunas enfermedades de la edad adulta, tales como enfermedad cardiovascular y de esta manera se pueden comportar como fenotipos de errores innatos del metabolismo con fenotipos menos severos(27,39,43).

Múltiples polimorfismos en el gen *MHTFR* (MIM# 607093) han sido descritos ([Tabla 2](#)), sin embargo, como consecuencia de su repercusión funcional, su clara asociación con ciertas enfermedades y su particular distribución poblacional, los más estudiados han sido los polimorfismos *MTHFR* 1298A→C y 677

C→T(30,32,33,44–46), siendo este último el que presenta mayor repercusión clínica debido que se ha correlacionado con deficiencias leves-moderadas de la actividad enzimática manteniendo entre 35 y 45% de actividad residual(27,28,38,42).

Mutación	Codón afectado	Exón o Intrón	Referencia
<b>129C→T</b>	P39P	Exón 1	(47)
<b>IVS2+533G→A</b>	n/a	Intrón 2	(48)
<b>677C→T*</b>	A222V	Exón 4	(27)
<b>1068T→C</b>	S352S	Exón 6	(41)
<b>IVS6+31T→C</b>	n/a	Intrón 6	(41)
<b>1298A→C*</b>	E429A	Exón 7	(49)
<b>1317T→C</b>	F435F	Exón 7	(50)
<b>IVS10+262C→G</b>	n/a	Intrón 10	(48)
<b>1793G→A</b>	R594Q	Exón 11	(51)

**Tabla 2.** Polimorfismos de la MTHFR. \*Polimorfismo que afectan la actividad enzimática de la MTHFR confirmado en estudios *in vitro* e *in vivo* (30,33,44).

## 2.7 Polimorfismo *MTHFR* 677 C→T

En 1988, Kang y colaboradores(52) describieron una variante termolábil de la MTHFR que está asociada con disminución de la actividad enzimática y leve incremento de la Hcy. La responsable de esta deficiencia es el polimorfismo 677C→T(NM\_005957.4: c.665C>T<sup>1</sup>) el cual fue identificado en pacientes con

diagnóstico de homocistinuria(53). Fue descrita inicialmente por Frosst y colaboradores en 1995 en individuos con enfermedad cardiovascular(27). Esta sustitución es considerada una variante *missense* (debido que su frecuencia es mayor del 1% en la población se designa como polimorfismo). El cambio de C (citocina) por T (timina) en la posición 677 del ADNc cambia una alanina en la posición 222 por un residuo de valina (p.Ala222Val, rs1801133:C>T) (26,32) en el dominio catalítico de la proteína, el cual se encuentra altamente conservado tanto en procariontas como en eucariotas(28).

El polimorfismo *MTHFR* 677C→T en estudios *in vitro* lleva a la reducción de la actividad catalítica de la proteína e incrementa su termolabilidad; en consecuencia, produce reducción en la actividad enzimática a temperaturas  $\geq 37^{\circ}\text{C}$ . En este mismo estudio, el genotipo homocigoto para el alelo T (677TT) evidenció entre un 50 y 60% menos actividad enzimática a  $37^{\circ}\text{C}$  y 65% menor a  $46^{\circ}\text{C}$  con relación a los genotipos homocigoto para el alelo silvestre C (677CC) en las mismas condiciones de temperatura (27,28,54). Además, los individuos con el genotipo 677TT presentan incremento de la Hcy (27,32,35,54). Estudios de asociación han encontrado mayores concentraciones en los niveles de homocisteína plasmática (hasta en un 25% más) para el genotipo 677TT, con relación al genotipo silvestre 677CC, únicamente si la ingesta de folato es insuficiente(55).

---

<sup>1</sup>La secuencia predicha por Goyette *et al.* 1994 del ADNc de la *MTHFR*, se tomó desde un codón de iniciación cascada abajo del codón que actualmente corresponde al marco abierto de lectura para la isoforma 70KDa. la variante termolábil se describió con la secuencia de Goyette *et al.* 1994. Así que el nucleótido 677 corresponde realmente al 665 en la secuencia de referencia actual (GenBank NM\_005957), sin embargo, debido a que la nomenclatura 677C→T históricamente se generalizó y se ha mantenido desde su descripción, esta continúa siendo la forma de describir este polimorfismo.

### 2.7.1 Asociaciones clínicas del polimorfismo *MTHFR* 677C→T

La hiperhomocisteinemia leve es considerada un factor de riesgo a largo plazo de enfermedad cardiovascular(56). Estudios de asociación del genotipo 677TT y la enfermedad cardiovascular temprana presentan OR (*Odds Ratio*) de 0,87 (95% CI; 0,96 a 1,11)(54), lo que quiere decir que el polimorfismo no es considerado una variante individual de riesgo para enfermedad cardiovascular temprana como fue considerado inicialmente(55), e independiente del incremento de la Hcy (27,36,52). No obstante desde su descripción el polimorfismo *MTHFR* 677C→T ha causado gran interés en la comunidad científica debido a sus consecuencias metabólicas, por lo tanto, se ha realizado un estudio exhaustivo de su asociación con diferentes enfermedades de origen multifactoriales ([Tabla 3](#)).

Esto llama la atención debido a que, independiente de las consecuencias negativas en la salud humana a las que se ha asociado, aún se reportan altas frecuencia del polimorfismo *MTHFR* 677C→T entre las poblaciones alrededor del mundo

Enfermedad	Población de estudio		Estado 677C→T	Odds ratio (95% CI)	Referencia
	Casos	Controles			
Cáncer colorrectal	12261	18463	TT vs CC	0.83 (0,94-1,04)	(57)
	1949	3099	T vs C	0.83 (0,68-1,01)	(58)
Cáncer de mama	6373	8436	TT vs CC	1.05 (0,88-1,25)	(59)
Cáncer gástrico	1930	2930	TT vs CC	1.68 (1,29-2,19)	(60)
	604	1655	TT vs CC	1.90 (1,38-2,60)	(61)

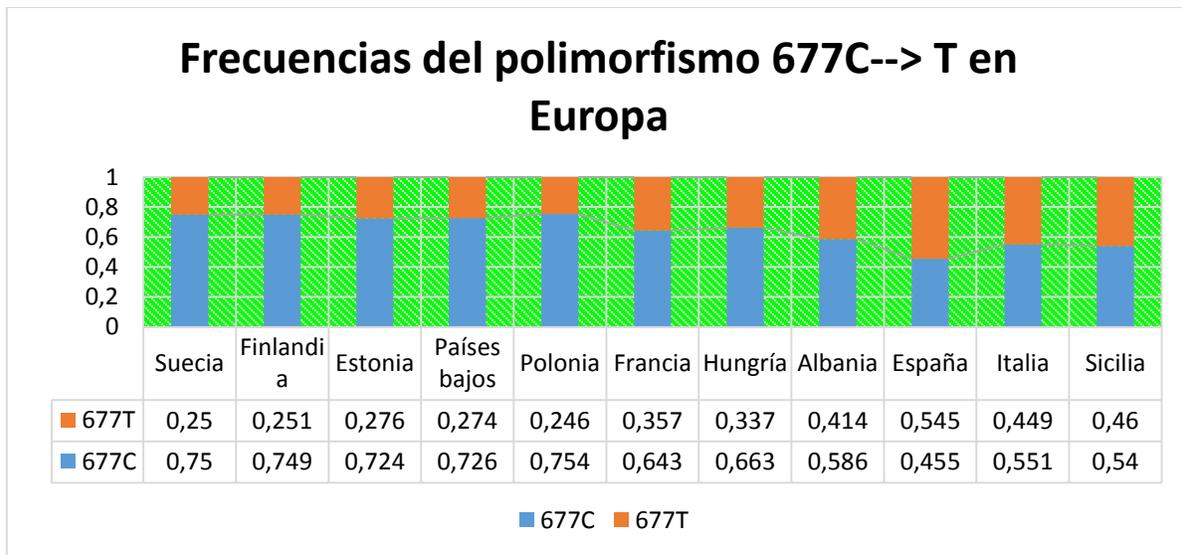
<b>Desorden bipolar</b>	550	1098	TT vs CC	1.82 (1,22-2,70)	(62)
<b>Esquizofrenia</b>	2762	3363	TT vs CC	1.44 (1,21-1,70)	(62)
	1119	1308	TT vs CC	1.48 (1,18-1,86)	(63)
<b>ACV isquémico</b>	1533	2786	T vs C	1.46 (1,19-1,79)	(64)
<b>Primer ACV en niños</b>	3235	9019	T vs C	1.70 (1,23-2,34)	(65)
<b>Enfermedad coronaria</b>	2419	3225	TT vs CC	1.30 (1,11-1,52)	(66)
<b>Isquemia cardíaca</b>	12193	11945	TT vs CC	1.21 (1,06-1,39)	(56)
<b>Retinopatía diabética</b>	435	617	T vs C	1.39 (1,05-1,83)	(67)
<b>Oclusión arteria retina</b>	152	435	TT vs CC	1.71 (0,97-3,01)	(68)
<b>TVP</b>	8364	12468	TT vs CC	1.20 (1,08-1,32)	(69)
<b>TEP</b>	4901	7886	TT vs CC	1.20 (1,1-1,4)	(70)
<b>Defectos de tubo neural (NTDs)</b>	Pacientes	219		1.9 (1,3-2,8)	
	Madres	166		1.7 (1,1-2,6)	
	Padres	110		1.8 (1,8-3,1)	
<b>Pérdida recurrente de embarazos</b>	2120	2949	CC vs TT	1.40 (1,11-1,77)	(71)

**Tabla 3.** Estudios de asociación entre el polimorfismo 677C→T y enfermedad. ACV: accidente cerebro vascular, TVP: trombosis venosa profunda, TEP: trombo embolismo pulmonar.

### 2.7.2 Frecuencias del polimorfismo *MTHFR* 677C→T

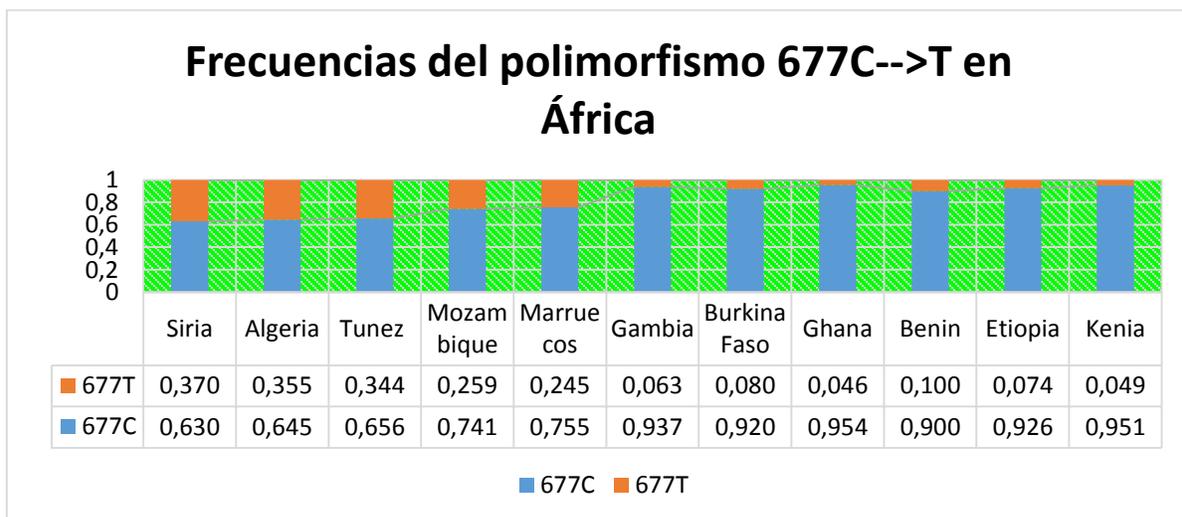
El seguimiento de la distribución geográfica del *MTHFR* 677C→T ha causado gran interés, debido que la frecuencia poblacional de este alelo muestra variaciones

regionales y étnicas(54). Por ejemplo en Europa es evidente un gradiente de las frecuencias del alelo 677T, el cual aumenta desde el norte hacia el sur(72) ([Fig 5](#)).



**Figura 5.** Frecuencia de los alelos para el polimorfismo MTHFR 677C→T en Europa. Referencias: Suecia(73), Finlandia, Países Bajos y Hungría(74), Estonia(75), Polonia(76), Francia(77), Albania(78), España(79), Italia, Sicilia(80).

En África, también se puede evidenciar un gradiente en la frecuencia de este polimorfismo. En este caso, disminuye de norte a sur, presentando frecuencias más elevadas para aquellas poblaciones cercanas al mediterráneo(72) ([Fig 6](#)).



**Figura 6.** Frecuencia de los alelos para el polimorfismo MTHFR 677C→T en África. Referencias: Siria, Mozambique, Gambia, Kenia (81), Argelia(82), Túnez(83), Marruecos(84), Burkina Faso(80), Ghana(85), Benín(86), Etiopia(79)

En África se observa otra particularidad en relación a la frecuencia de este alelo observadas en algunas etnias o pueblos ancestrales de grupos cazadores-recolectores donde las frecuencias del polimorfismo pueden descender hasta valores de 0 por ejemplo pueblos que hablan bantú presentan frecuencias del alelo 677T entre 0 - 0.13, los grupos San (cazadores-recolectores que viven en el desierto de Kalahari en Namibia) presenta frecuencias de 0 y grupos de pigmeos en el Congo presentan frecuencias de 0.06.

Por otra parte, es interesante que la frecuencia de este polimorfismo parece incrementar en afroamericanos en Brasil y en los Estados Unidos quienes presentan frecuencias entre 0,12 - 0,35 con relación a poblaciones de África subsahariana(72))(54). En poblaciones de América una tendencia similar ha sido detectada(72).

Las mayores frecuencias se encuentran en poblaciones de mestizos, como los hispanos de los Estados Unidos (0,423) y menores en caucásicos de los Estado Unidos (0,29) de Canadá (0,246). Entre amerindios se ve alta variabilidad de la frecuencia del polimorfismo, por ejemplo, la frecuencia del genotipo homocigoto es de 0.21 en amerindios de Brasil, pero fue del 0.01 en la tribu Tupi Parakana(54).

Con relación a la frecuencia del genotipo 677TT es, al igual que la frecuencia alélica, más alta en el sureste de Europa (≈15-20%), principalmente en España e Italia, sin embargo, las más altas frecuencias son evidentes en poblaciones con

descendencia amerindia en los Estados Unidos, México y Colombia (≈25-30%)(40,86)

Además, el polimorfismo hace parte del haplotipo (G-T-A-C) conformado por el intrón 2: 533G→A, intrón 6: 31C→T, exón 7: 129A→C intrón 10: 262C→G, y que es compartido entre la población africana, oriente medio y japoneses, lo que sugiere que un origen ancestral para este polimorfismo y al igual que una relación histórica entre estas poblaciones. (48).

### **2.7.3 Estudios funcionales del polimorfismo 677C→T**

Como previamente se había mencionado, el polimorfismo *MTHFR* 677 C→T, produce un cambio no sinónimo de una alanina en la posición 222 por una valina (Ala222Val) Las características físico-químicas entre alanina y valina son similares, ambos son considerados aminoácidos hidrofóbicos y solo se diferencian en que la valina estructuralmente es de mayor tamaño en relación a la valina. La proteína *MTHFR* en humanos no ha sido cristalizada aún, por lo tanto, el uso de herramientas bioinformáticas ha sido una aproximación adecuada para predecir el efecto funcional de este polimorfismo, sin embargo, aunque el uso de múltiples herramientas de predicción ha sido realizado sus resultados muestran grandes diferencias. Por ejemplo: PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) muestra que este cambio es considerado benigno, al igual que SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) y pMut (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>) que predicen como tolerable o neutral respectivamente. En cambio SNPs3d (<http://www.snps3d.org>) predice como deletéreo al igual que I-Mutant2.0 (<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/Bemidio/I-Mutant/I-Mutant.htm>) predice como

disminución de la estabilidad proteica. Esto puede ser consecuencia de los algoritmos o las diferencias en la sensibilidad de estos o también por la ausencia de datos estructurales de la proteína en humanos (87), lo que hace necesario explorar otros métodos para entender los efectos funcionales del polimorfismo *MTHFR* 677C→T.

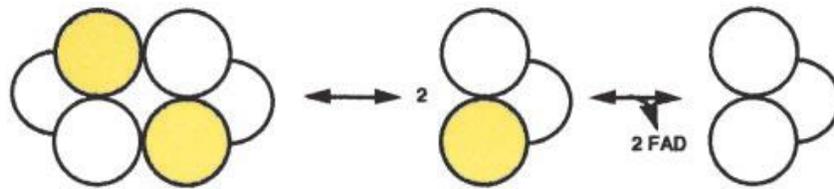
La *Mthfr*, proteína homóloga de la *MTHFR* en ratón (*Mus musculus*) cursa con un 90% de identidad(22,24), lo que hace a los estudios en modelos murinos un buen acercamiento para evaluar la relación fenotipo–genotipo relacionada con la deficiencia de esta enzima. Los resultados evidencian una alta correlación entre los fenotipos de ratón y humano ([Tabla 4](#)). Sin embargo, este es un enfoque indirecto del efecto del polimorfismo *MTHFR* 677C→T, por lo tanto se ha recurrido a otros modelos para evaluar las repercusiones de este en la proteína y explicar los fenotipos posibles.

Genotipo	Fenotipo	Referencia
<b>Homocigoto (-/-)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hiperhomocisteinemia</li> <li>• Retraso en el desarrollo con alteraciones en cerebelo</li> <li>• Depósitos de lípidos en aorta</li> <li>• Espermatogénesis anormal</li> </ul>	(35,88)
<b>Heterocigoto (+/-)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hiperhomocisteinemia</li> <li>• Depósitos de lípidos en aorta</li> <li>• Compromiso cognitivo</li> </ul>	(35,89)

**Tabla 4.** Relación genotipo – fenotipo en ratones *knock-out*

Debido a que la estructura proteica de la MTHFR no ha sido cristalizada en humanos, se ha recurrido a otros modelos funcionales *in vitro* para evaluar el efecto del polimorfismo 677C→T sobre la proteína.

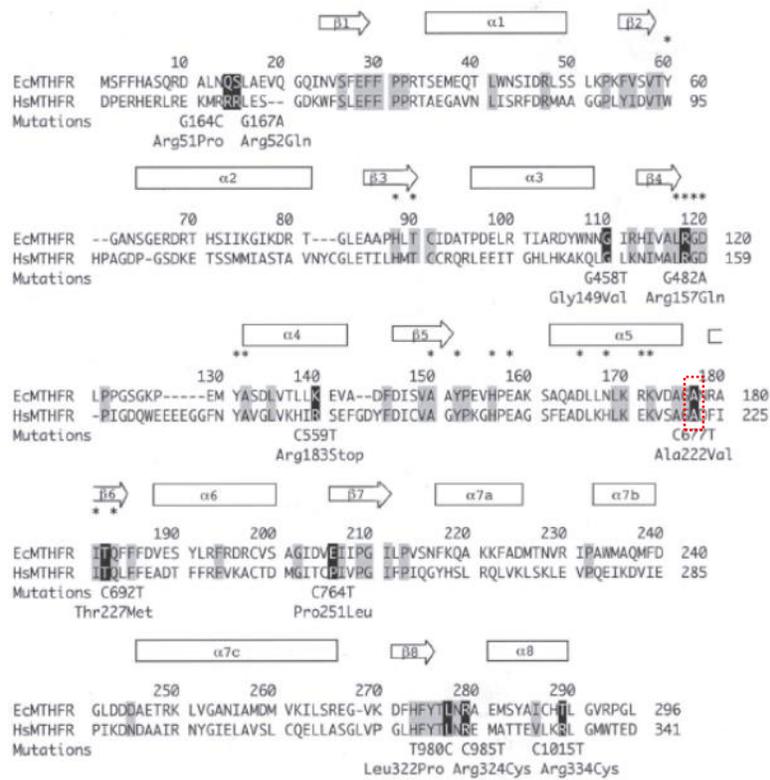
La purificación de esta enzima (Metf) en *Escherichia coli*, ha permitido simular los efectos del polimorfismo *MTHFR* 677C→T. La purificación de la Metf fue llevada a cabo por Sheppard y colaboradores en 1999 encontrándose como un homotetrámero (mientras que en mamíferos se encuentra como homodímero) con cuatro subunidades de 33kDa(33). La comparación de su secuencia de aminoácidos difiere de su homóloga en mamíferos en que no parece tener dominio regulador y la secuencia del dominio catalítico presenta un 30% de identidad con la humana(30). La estructura por rayos X de la MTHFR en *E. coli*. Revela que es un barril  $\beta_8\alpha_8$  al cual se une su cofactor FAD en el centro(33). La descripción de Metf ha permitido que sea usada como modelo para estudiar el dominio catalítico de la enzima humana y de esta forma se evalúen los efectos funcionales y estructurales del alelo 677T en humanos, en proteína Ala222Val el cual en *E. coli* el cambio se encuentra en el aminoácido 177 (Ala177Val), estos estudios arrojan que la enzima mutante (Ala177Val) presentan incremento en la velocidad de pérdida de su cofactor (hasta 10 veces más rápido) que la enzima silvestre(28,30) ([Fig 9](#)). Este efecto sobre el cofactor es consecuencia de la disociación del tetrámero en dímeros(30), lo cual en mamíferos se daría por disociación del homodímero en monómeros (32)([Fig 7](#)).



**Figura 7.** Mecanismo propuesto para disociación del FAD en humanos. En amarillo las subunidades catalíticas y en blanco los dominios reguladores.

Tomado de Yamada *et al.* 2001 (32).

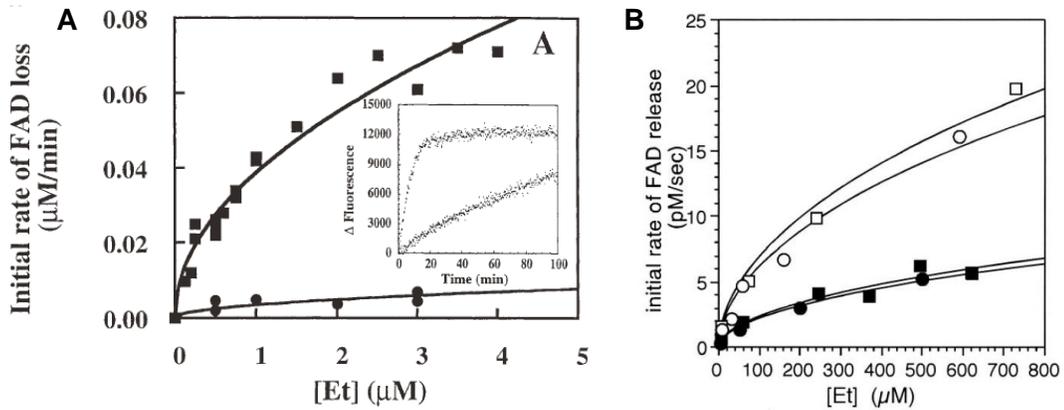
El análisis estructural evidencia la Metf en forma de barril y que el sitio de la mutación Ala177Val se encuentra en el fondo de este, lejos del sitio de unión al cofactor FAD. Esta posición cae en un bucle que conecta la hélice  $\alpha 5$  con la hoja  $\beta 6$  que conforman del barril(30)([Fig 8](#)). Debido que la valina presenta una cadena lateral más abultada que el grupo metilo de la alanina lleva a que en las proteínas mutantes (Ala177Val) no pueden acomodarse dentro del bucle lo que distorsiona la hélice  $\alpha 5$ (28). La hélice  $\alpha 5$  interactúa directamente con el cofactor FAD sugiriendo que Ala177Val debilita esta interacción lo que produce un incremento en la disociación del cofactor.



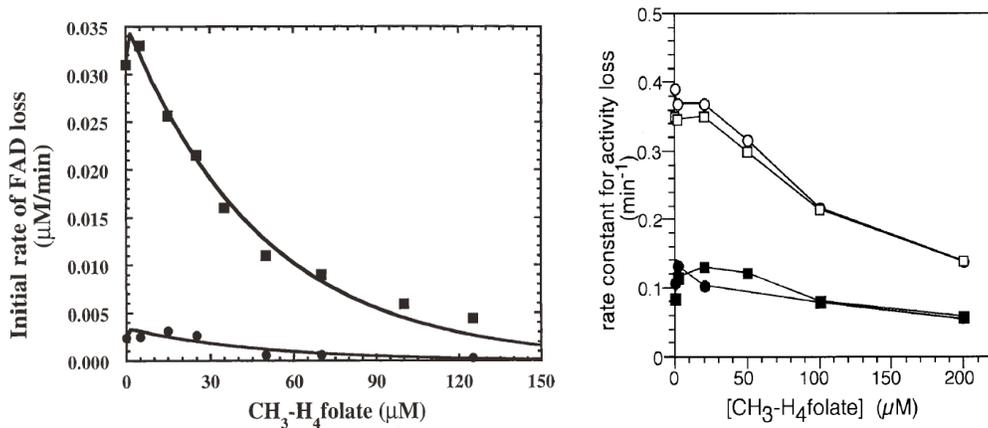
**Figura 8.** Alineamiento de las secuencias del dominio catalítico de la MTHFR de *E. coli* y humano. La flechas muestra las hojas  $\beta$  y los rectángulos las hélices  $\alpha$ . Con asteriscos se señalan los aminoácidos que interactúan con el cofactor FAD. Señalado recuadro rojo se evidencia el sitio de Ala222Val en humanos (Ala177Val en *E. coli*).

Tomado de Güenther *et al.* 1999(30).

Posteriormente, Yamada y colaboradores en el 2001(32) recrearon este mismo experimento usando *MTHFR* recombinante humana obteniendo altos niveles de esta, bajo un sistema de expresión en baculovirus en células Sf9, encontrando resultados similares a los hallados previamente con Metf en *E. coli*.



**Figura 9.** Incremento de la tasa de disociación del cofactor FAD asociado a Ala177Val en *E. coli* (A) y humano Ala222Val (B). A. se evidencia la tasa de disociación del FAD en *E. coli*, después de la adición de diferentes concentraciones subunidades (Et) tanto para la subunidad silvestre (●) como para la Ala177Val (■)(30). B. de igual manera al *E. coli*, en humanos también se evidencia una alta tasa de disociación del FAD para la Ala222val (○) en relación al silvestre (●). Los cuadros corresponde a otra el análisis de otra variante en el dominio regulador(32).



**Figura 10.** Protección de la disociación del cofactor FAD asociado a Ala177Val en *E. coli* (A) y humano Ala222Val (B) asociado a la adición de folato CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub> (folato en forma monoglutámica). (A) se evidencia la protección de la disociación del FAD en *E. coli*, con relación a la concentración de folato tanto para la subunidad silvestre (●) como para la Ala177Val (■)(30). (B) En humanos también se evidencia protección de la disociación del FAD tanto para la Ala222Val (○) como para el silvestre (●). Los cuadros corresponde al análisis de otra variante en el dominio regulador(32)

Además, tanto Yamada como Güenther encontraron que el folato en forma monoglutámica (CH<sub>3</sub>-CH<sub>4</sub>folato) protege a las enzimas mutantes de la pérdida de

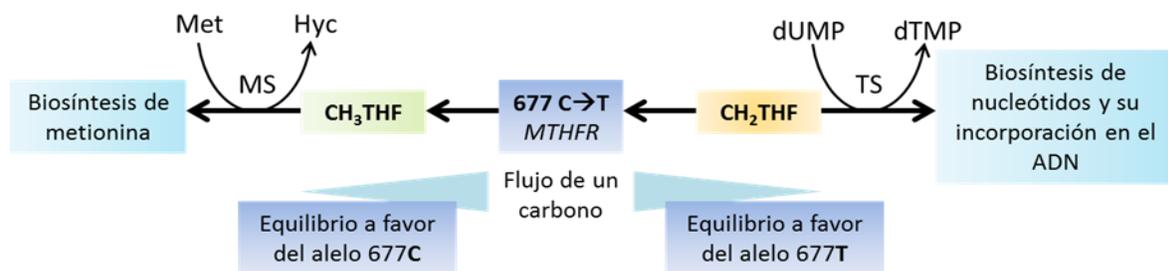
su cofactor FAD(13), reduciendo su pérdida de forma directamente proporcional a la cantidad de folato adicionado ([Fig 10](#)), manteniendo a la enzima como una holoenzima activa(28). Lo que se ajustaría con la mejoría clínica de ciertos fenotipos asociados con el polimorfismo 677C→T consecuencia de la administración de ácido fólico.

#### **2.7.4 Polimorfismo *MTHFR* 677C→T y el folato**

Este efecto de protección explica cómo el folato interviene en el tratamiento de la hiperhomocisteinemia proveyendo un modelo elegante de la interacción gen-nutriente (entre polimorfismo *MTHFR* 677C→T y el folato) con claras y profundas implicaciones en la salud humana(90). Así, los efectos negativos del polimorfismo, particularmente la leve elevación de la homocisteína sérica (Hcy), serían prevenibles con la suplementación dietaria de folato(28).

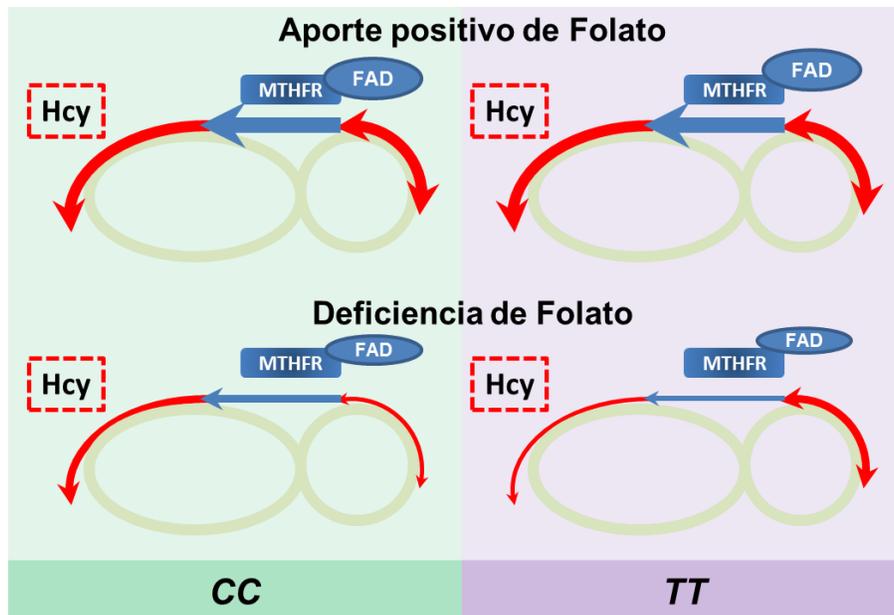
El efecto de las consecuencias del aporte de folato sobre el genotipo del *MTHFR* 677C→T ha sido estudiado en relación al ciclo del ácido fólico y el ciclo de la metionina ([Fig 4](#)). El balance entre el uso de 5-10 metiltetrahidrofolato (CH<sub>2</sub>THF) para la síntesis de ADN en vez de la síntesis de metionina puede depender de la presencia del alelo 677T, así el estado genotípico podría funcionar como un regulador, dirigiendo unidades de un carbono hacia la síntesis de ADN (favorece las dos primeras reacciones anabólicas: síntesis de purinas y de timidilato) en vez de hacia la síntesis de metionina (al reducir la tercera reacción metabólica: remetilación de la Hcy), lo cual es evidente cuando hay deficiencia de folato en presencia del alelo 677T ([Fig 11](#)). Así, el genotipo *MTHFR* 677TT reduce la

actividad de la MTHFR disminuyendo la formación de 5-metiltetrahidrofolato ( $\text{CH}_3\text{THF}$ ) y la remetilación de homocisteína, preservando en parte el mecanismo de síntesis de sustratos útiles en la generación de ADN y ARN([Fig 12](#))(36), aumentando el riesgo de una mala incorporación de uracilos en el ADN por exceso de dUMP e incrementando la frecuencia de las rupturas cromosómicas ([Fig 11](#)). Por otra parte adecuadas cantidades de folato en presencia del alelo 677T incrementa la formación de dTMP lo que evita las rupturas cromosómicas ([Fig 11](#)).



**Figura 11.** Mecanismo celular putativo del flujo de un carbono con relación a la presencia del polimorfismo MTHFR 677C→T. Abreviaturas: dTMP, deoxitimidina monofosfato; dUMP, deoxiuridina monofosfato; Hcy, homocisteína; Met, metionina; MS, metionina sintasa; TS, timidilato sintasa. Modificado de Lucock & Yates 2005 (72)

Por otro lado, las adecuadas cantidades de folato, estabilizan la MTHFR y así aseguran la óptima remetilación de la Hcy estabilizando el equilibrio remetilación – transulfuración y promoviendo la reducción de la concentración plasmática de homocisteína los genotipos 677CT y 677TT ([Fig 12](#)),



**Figura 12.** Modelos de interacción gen-nutriente (polimorfismo MTHFR 677C→T y Folato). El ancho de las flechas indica el nivel de flujo a través de los ciclos; el tamaño y la unión de los círculos del FAD indican la concentración y la unión de este a la MTHFR.

Modificado de De Ueland *et al.* 2001(36)

## 2.8 Efecto de selección por el polimorfismo MTHFR 677 C→T consecuencia del folato

El ácido fólico se ha considerado la panacea por buenas razones: además de su efecto preventivo de NTDs y otros defectos de línea media, protege contra la hiperhomocisteinemia, considerada un factor de riesgo cardiovascular, y modula el riesgo de cáncer. Sin embargo, estos beneficios se ven contrastados con un posible efecto deletéreo poblacional, ya que la exposición elevada a ácido fólico durante el periodo periconcepcional en las gestantes puede favorecer la selección de embriones humanos que portan el alelo *MTHFR* 677T(72,91,92).

Por ejemplo, se han evidenciado frecuencias 4 veces más altas del genotipo homocigoto 677TT en neonatos cuyas madres han estado expuestas a ácido fólico en comparación con productos de abortos (93).

Otro ejemplo de un posible efecto selectivo se correlaciona con el seguimiento de la distribución poblacional. La disponibilidad de folato en la dieta podría explicar la heterogeneidad de la distribución global del polimorfismo *MTHFR* 677C→T, por ejemplo el gradiente norte-sur de Europa previamente mencionado puede ser debido al alto contenido de folato de la dieta mediterránea(91,94). Además, se sugiere que la baja prevalencia del alelo *MTHFR* 677T en africanos puede relacionarse con la deficiencia de folato en países donde la malnutrición es un problema de salud pública. Además, el incremento en la prevalencia del alelo 677T en afroamericanos presuntamente puede ser debido a mejores campañas de salud pública y acceso a nutrientes en países americanos, aunque el mestizaje en estas poblaciones también puede contribuir a esta diferencia(94).

Así, teniendo en cuenta los datos clínicos y demográficos de este polimorfismo, existe evidencia suficiente de que el incremento en el folato dietario en las poblaciones, a través de las políticas gubernamentales o a través de la ingesta no regulada de ácido fólico, podría incrementar la frecuencia del alelo 677T y esto parece conferir una ventaja selectiva en los embriones humanos(72), lo que potencialmente influenciará la incidencia de enfermedades crónicas degenerativas ([Tabla 3](#)) con un posible efecto sobre la morbimortalidad de las futuras generaciones(46,94).

Por otra parte, se han realizado pocos estudios genético-poblacionales que aborden este fenómeno de ventaja selectiva y el efecto que las políticas públicas

de fortificación y suplementación con ácido fólico sobre la frecuencia de los alelos del polimorfismo *MTHFR* 677C→T.

Muñoz-Moran y colaboradores en 1998(95) realizaron un estudio de frecuencias del polimorfismo y sugieren una correlación entre dos fenómenos: las políticas de suplementación a las embarazadas con ácido fólico y las diferencias entre las frecuencias del polimorfismo *MTHFR* 677C→T a través del tiempo en España. encontrando una pérdida significativa del equilibrio de Hardy Weinberg (EHW) en la última generación analizada (1976-2000), lo que puede sugerir la presencia de este efecto selectivo(46).

En el 2010 en Colombia se realizó un estudio con 206 individuos, sanos, entre los 16-25 años en el cual se encontró de igual manera pérdida en el EHW ( $p=0,0001$ )(96), lo cual sugiere que esta población podría estar sometida a una presión selectiva similar a lo observado en España. Como se ha mencionado antes, Colombia es un país que tiene regulación vigente y existe obligatoriedad en la fortificación y la suplementación con ácido fólico ([Figura 3](#)), por lo tanto, nosotros proponemos un estudio genético-poblacional de dos generaciones diferentes: una anterior a las políticas de suplementación/fortificación (individuos nacidos antes de 1976) y otra posterior (individuos nacidos después del 2000), para de esta manera evaluar el efecto de estas políticas públicas en el cambio de la frecuencia del alelo *MTHFR* 677T en la población colombiana.

## 3 Objetivos

### 3.1 Objetivo general

Evaluar las diferencias genético-poblacionales del polimorfismo 677C→T del gen *MTHFR* al comparar una población colombiana de niños nacidos después del año 2000 con una de adultos nacidos antes de 1976.

### 3.2 Objetivos específicos

- Realizar la genotipificación del polimorfismo *MTHFR* 677C→T en una población colombiana.
- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo *MTHFR* 677C→T de las poblaciones de estudio con otros estudios en Colombia y en el mundo.
- Evaluar la diversidad genética del polimorfismo *MTHFR* 677C→T en las poblaciones de adultos y de niños.
- Analizar las diferencias genético-poblacionales en las poblaciones estudiadas que puedan generar cambios en las frecuencias del polimorfismo *MTHFR* 677C→T.
- Evaluar los cambios de las frecuencias del polimorfismo *MTHFR* 677C→T en el tiempo, al comparar individuos de diferentes generaciones en la población colombiana.
- Recrear un posible modelo de selección para el polimorfismo *MTHFR* 677C→T en población Colombiana.

- Analizar la persistencia del polimorfismo *MTHFR* 677C→T en las población colombiana en relación al supuesto de la fortificación de las harinas y a la suplementación a las maternas con ácido fólico iniciado en el año 1996.

## **4 Materiales y métodos**

### **4.1 Diseño del estudio**

La investigación que se realizó fue de tipo analítica y explicativa, cuyo factor de diseño es el polimorfismo *MTHFR* 677C→T; los niveles de factor de diseño fueron fijos y corresponden a las frecuencias alélicas y genotípicas en cada población para dicho polimorfismo. La unidad de respuesta corresponde a los grupos etarios de la población muestreada: niños y adultos. La variable de respuesta corresponde a la presentación de cada alelo y genotipo en las poblaciones. Por último, la unidad de muestreo fue un grupo de 702 individuos voluntarios, de los cuales, 298 pertenecían a la población de niños con edades menores a 12 años para el 2012 (nacidos después del año 2000), 363 a la población de adultos con edad mayor a 35 años para el 2012 (nacidos antes del año 1976). Teniendo en cuenta criterios de inclusión y exclusión para cada una de las poblaciones.

#### **4.1.1 Criterios de inclusión**

Niños (nacidos después del año 2000)

- Ser menor de 12 años para el año 2012
- Ser colombiano de nacimiento
- Tener padres colombianos
- Tener padres que pertenezcan al estrato socioeconómico 3 o superior

- Tener padres o tutor(es) legal(es) que lean, acepten y firmen el consentimiento informado
- Firmar el asentimiento informado

Adultos (nacidos antes del año 1976)

- Ser mayor de 35 años para el año 2012
- Ser colombiano de nacimiento
- Tener padres colombianos
- Vivir en estrato socioeconómico 3 o superior
- Leer, aceptar y firmar el consentimiento informado.

#### **4.1.2 Criterios de exclusión**

Niños (nacidos después del año 2000)

- Padecer enfermedad de origen genético o embrionario conocidas, que se sospeche sean consecuencia de algún defecto en la ruta del folato, como:
  - Defectos de tubo neural (97)
  - Homocistinuria (OMIM 236250)
  - Homocisteinemia (OMIM 603174)
- No cumplir con los criterios de inclusión

Adultos (nacidos antes del año 1976)

- Enfermedad de origen genético o embrionario conocidas, que se sospeche sean consecuencia de algún defecto en la ruta del folato, como:
  - Defectos de tubo neural(97)
  - Homocistinuria (OMIM 236250)

- Homocisteinemia (OMIM 603174)
- No cumplir con los criterios de inclusión.

## 4.2 Tamaño de muestra

Se determinó el tamaño de muestra manualmente, utilizando la siguiente fórmula:

$$N = \frac{z^2 Npq}{e^2(N - 1) + z^2 pq}$$

Donde  $Z = 1,96$  para un nivel de confianza del 95%,  $e$  es el error de muestreo (tipo  $\alpha$ ) tomado como 0,05, y  $p$  es la proporción de individuos que tiene la característica a estudiar, en este caso, la presencia del alelo 677T y este valor fue obtenido de la frecuencia media de este alelo en poblaciones colombianas previamente reportadas, siendo  $p = 0,4408$  y se denominó  $q$  como la no presencia del alelo 677T ( $q = 1 - p$ ) y  $N$  es el tamaño total de la población a estudio. Al ser esta última la población colombiana, se decidió extrapolar la fórmula a para poblaciones muy grandes así:

$$N = \frac{z^2 pq}{e^2}$$

De esta manera se obtuvo un tamaño muestral de 378,78 individuos en la población colombiana para tener una confianza del 95%. Los cuales se dividieron en grupos etarios, niños y adultos. Para este proceso se estimó un apareamiento 1:1 tomando el 50% de la muestra total para cada uno de los subgrupos por población etaria. De esta manera, se hizo necesaria la obtención no menor de 189,39 individuos por grupo para lograr una adecuada significancia en los resultados.

### **4.3 Poblaciones de estudio y muestras**

Esta investigación fue aprobada por el comité de Ética de la Universidad del Rosario. Se utilizaron dos consentimientos informados (uno diferentes para cada tipo de muestra) y un asentimiento informado, de acuerdo con la edad de los donantes voluntarios, los cuales fueron aprobados por este mismo comité ([Anexo 2 y 3](#)).

Las muestras, tanto de adultos como de niños, fueron tomadas en la ciudad de Bogotá, D.C. y en la ciudad de Villavicencio, departamento del Meta. Los niños participantes fueron captados en colegios de educación primaria en las dos ciudades o de voluntarios externos. Los participantes adultos fueron captados del personal administrativo y académico de los colegios y otras instituciones educativas.

Las muestras recogidas fueron de dos tipos: para los adultos se tomaron muestras de, sangre periférica (5cc) en tubos con EDTA o de células del epitelio bucal utilizando escobillones (Whatman® wb10003) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, por lo cual se requirieron dos consentimientos informados. Para los niños únicamente se tomaron muestras con escobillón.

### **4.4 Extracción de ADN**

Se realizaron protocolos de extracción de ADN dependientes del tipo de muestra. Para las muestras obtenidas de sangre periférica se realizó el método Salting-out ([Anexo 4](#). Protocolo 1) (98). La extracción de las muestras de escobillón se realizó

con el Kit DNAIQ™ System (Promega®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante ([Anexo 4](#). Protocolo 2). Se realizó la cuantificación de ADN por prueba espectrofotométrica utilizando NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific®). Sólo se incluyeron en el análisis las muestras que tuvieran concentraciones de ADN superiores a 10pmol/µl.

#### **4.5 Amplificación por PCR**

Las amplificaciones fueron realizadas por medio de PCR convencional siguiendo el protocolo previamente descrito por Frosst y colaboradores en 1995 (27). La región fue amplificada con los siguientes *primers*: *Primer forward* - 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' - y *primer reverse* - 5'- AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'. Las condiciones de hibridación fueron verificadas con la herramienta informática Primer3 v.0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Las amplificaciones se hicieron con GoTaq Master Mix (Promega®), en un termociclador T100 (Bio-Rad®) con el siguiente protocolo: 5min a 94°C; 30 ciclos de 94°C durante 30s, 65°C durante 30s y 72°C durante 90s; y 10min a 72°C. Los productos obtenidos fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Cada muestra fue amplificada al menos por triplicado.

#### **4.6 Genotipificación**

La genotipificación fue realizada con enzimas de restricción con el método previamente descrito por Frosst y colaboradores en 1995(27). Se utilizó la enzima

de restricción *Hinfl* (Promega®), la cual reconoce el sitio palindrómico 5'-GANTC-3', de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La sustitución de citosina por timina del polimorfismo 677C→T (NM\_005957.4: c.665C>T) crea un sitio de restricción reconocido por la *Hinfl*. El fragmento amplificado vía PCR de 198pb es digerido produciendo fragmentos de 175pb y 23pb. Cada muestra fue digerida, verificada y evaluada por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% al menos por triplicado.

Se verificaron por secuenciación de Sanger diez muestras al azar (Elim Biopharmaceuticals, Inc.) para ser comparadas con los genotipos obtenidos por digestión enzimática. Las secuencias obtenidas fueron analizadas por medio de la herramienta SEQUENCHER para Windows (Sequencher® ver.5.2 sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA <http://www.genecodes.com>). Se obtuvo la secuencia consenso para la esta región del gen MTHFR a partir del genoma de referencia UCSC hg19 y se realizó el análisis por medio de alineamientos múltiples por medio de la herramienta ClustalW2 (100).

#### **4.7 Análisis genético – poblacional**

A partir de la genotipificación de las muestras, se elaboraron matrices con los datos obtenidos. Se realizó una matriz para la muestra total y se dividió la muestra en grupos de adultos y de niños; luego se subdividieron estos grupos en poblaciones dependientes de la ciudad de origen de manera que se generaron los siguientes grupos: adultos Villavicencio, niños Villavicencio, adultos Bogotá, niños Bogotá. Estos datos fueron corridos con el programa GENEPOP ver.4.2.1(101)

obteniéndose las frecuencias alélicas y las genotípicas. Se evaluaron las diferencias entre los genotipos esperados y los observados por medio de una prueba  $X^2$ .

Posteriormente, se calculó EHW utilizando el programa GENEPOP versión 4.2.1. Inicialmente se realizó un cálculo de EHW global para toda la población (incluyendo niños de Villavicencio y Bogotá D.C. y adultos de Villavicencio y Bogotá D.C.) y luego para cada una de las poblaciones de manera independiente. Para esto se postularon dos hipótesis alternativas ( $H_1$ ): la primera, que la población no se encontraba en EHW debido a un déficit de heterocigotos y la segunda, que esto se debía a un exceso de heterocigotos, y se compararon con la hipótesis nula ( $H_0$  = unión de gametos al azar) usando una prueba de score (U) (102). El valor de  $p$  fue obtenido por método de Cadenas de Markov, con los siguientes parámetros: Número de memorización = 1000, Número de batches (B) = 100, número de iteraciones por batch = 5000 (103).

Se estimó la heterogeneidad genética entre la muestra como un todo y para los grupos de niños y de adultos con el programa FSTAT 2.91 (104).

Con esto se realizó una prueba de diferenciación poblacional asumiendo falta de EHW entre las muestras, con mil permutaciones y un nivel de error ( $\alpha$ ) de 0,05.

El análisis de la diversidad genética de Nei (105), permite calcular el grado de diferencias genéticas en relación a las frecuencias de heterocigotos, dentro de la población total y las subpoblaciones. En él se calcula la heterocigosis esperada ( $H_E$ ), la observada ( $H_O$ ) y la total ( $H_T$ ), para calcular el estadístico  $D_{st} = H_T - H_S$ , el cual determina las diferencias genéticas entre las subpoblaciones y la población

total. El  $D_{ST}$  es corregido por  $G_{ST} = D_{ST} / H_T$ . Valores de  $G_{ST}$  diferentes de cero corresponderán a una alta diferenciación genética entre las subpoblaciones.

Además, se determinó la estructura de las poblaciones por medio de los estadísticos  $F$  de acuerdo con el modelo de Weir & Cockerham (1984), con el estimador de Queller & Goodnight's (106). Esta medida es la relación promedio de los alelos dentro de las muestras, en comparación con el conjunto total de los datos.

Los estadísticos  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  miden el exceso o la deficiencia de los heterocigotos promedio en cada subpoblación y en la población como un todo, respectivamente; el estadístico  $F_{ST}$  mide el grado de diferenciación genética entre las poblaciones.

$F_{IS}$  establece la correlación entre dos gametos tomados al azar desde una subpoblación (*individuos/subpoblación*) promediado sobre las sub poblaciones, con la siguiente expresión

$$F_{IS} = H_s - H_o / H_s ,$$

$F_{IS}$  puede tomar valores entre -1 y +1, donde los primeros indican exceso de heterocigotos (no endogamia) y valores positivos un déficit de heterocigotos (endogamia).

$F_{IT}$  es similar a  $F_{IS}$ , solo que se observan las diferencias entre los individuos con respecto a la población total, lo cual establece la correlación entre dos gametos tomados a la azar desde una individuo (*individuo/población total*) promediado sobre población total. Sus valores también oscilan entre -1 y +1.

Las desviaciones de  $F_{IS}$  y  $F_{IS}$  de cero fueron probadas por la prueba de  $X^2$  con  $k(k - 1)/2$  grados de libertad (107).

$$X^2 = N F^2 (K - 1)$$

$F_{ST}$  mide el efecto de la subdivisión poblacional, la cual es la reducción en la heterocigosis de una subpoblación debido a la deriva genética. Este estadístico también es llamado coeficiente de co-ancestralidad y se define como la correlación de gametos dentro de las subpoblaciones con respecto a los gametos sacados al azar de la población total (*subpoblación/población total*). Y se expresa de la siguiente manera:

$$F_{ST} = H_T - H_S / H_T$$

Los valores de  $F_{ST}$  oscilan entre 0 y 1, donde 0 quiere decir que no hay estructura (subdivisión) dentro de la población, y 1 quiere decir que se presenta un aislamiento total entre las sub poblaciones (subdivisión extrema)

La significancia estadística de las diferencias entre las poblaciones fue probada por la prueba de  $X^2$ :

$$X^2 = 2N F_{st} (K - 1)$$

Con  $(k - 1) (S - 1)$  grados de libertad (*d. f.*), donde N es el tamaño total de la muestra y  $k$  es el número de alelos por locus y  $s$  es el número de subpoblaciones (108).

Se determinó el coeficiente de endogamia ( $f$ ) para la población total y los grupos de poblaciones de niños y adultos, este se define como la probabilidad que dos alelos homólogos en un individuo sean idénticos por descendencia. Expresándose a través del estadístico  $f$  de Wright (109), como:

$$f = 1 - \frac{H_o}{H_e}$$

Así,  $f$  es una función de la tasa de heterocigocidad observada ( $H_o$ ) sobre la heterocigocidad esperada ( $H_E$ ) (en una población sin endogamia). Con endogamia  $H_o < H_E$  y por lo tanto,  $f > 0$ .

Además se realizó un análisis del efecto Wahlund el cual se presenta cuando existen subpoblaciones agrupadas y además hay diferencias en las frecuencias alélicas entre estas sub-muestras. Como consecuencia, se presentará una deficiencia de heterocigotos y un exceso de homocigotos, aún si las proporciones EHW se cumplen en cada sub-muestra.

Se evaluó el efecto de selección a favor del heterocigoto (sobredominancia) del modelo de selección básico. Este se presenta cuando el heterocigoto tiene el *fitness* relativo ( $w$ ) más alto que los dos homocigotos, y de esta manera los dos alelos pueden ser mantenidos en la población. Se asumió como generación 0 al grupo de adultos y sus frecuencias alélicas fueron representadas como  $p_0$  para el alelo 677C y  $q_0$  para el alelo 677T, y la generación 1 fue el grupo de niños, siendo sus frecuencias alélicas  $p_1$ , para el alelo 677C, y  $q_1$ , para el alelo 677T. El *fitness* ( $w$ ) para cada genotipo fue hallado teniendo en cuenta los cambios en las proporciones genotípicas entre adultos las cuales fueron tomadas como las proporciones genotípicas antes de la selección (pre-selección o generación 1 [G1]) y las de los niños tomadas como las proporciones genotípicas después de la selección (post-selección o generación 0 [G0]). De esta manera el *fitness* ( $w$ ) para cada genotipo es:  $677CC = 1 - s_1$ ,  $677CT = 1$  y finalmente  $677TT = 1 - s_2$

En este modelo, el *fitness* máximo ( $w = 1$ ) lo presenta el heterocigoto y  $s_1$  y  $s_2$  son la desventaja selectiva sobre los homocigotos.

Finalmente, se realizaron simulaciones con el programa POPGENE. S<sup>2</sup>(110). Para encontrar las frecuencias alélicas y genotípicas para 10 generaciones. Estos análisis fueron llevados a cabo de manera manual y con ayuda de los programas ya enunciados GENEPOP versión 4.2.1(101), FSTAT 2.91(104), ARLEQUIN versión 3.5.1.2 (111) y POPGENE.S<sup>2</sup>(110).

## **5 Resultados**

### **5.1 Toma de muestra**

Se obtuvieron en total muestras de 702 individuos no emparentados. Las muestras fueron tomadas en Bogotá y en Villavicencio. En la ciudad de Bogotá, D.C. se contó con la participación de niños del Colegio HH Corazonistas, además se obtuvieron muestras de voluntarios que no pertenecían a esta institución. Se recolectaron un total de 168 niños participantes en Bogotá.

Con relación a los adultos, se contó con la participación del personal administrativo y académico de la Universidad del Rosario; también se incluyeron voluntarios del personal administrativo y académico del Colegio HH Corazonistas y voluntarios ajenos de estas instituciones quienes aceptaron participar, para un total de 198 participantes adultos para Bogotá.

En la ciudad de Villavicencio se contó con la participación de niños del colegio Nuestra Señora del Carmen y de la Institución Educativa Colegio John F. Kennedy. También se incluyeron niños voluntarios que no pertenecían a estas

instituciones, para un total de 195 niños participantes de la ciudad del Villavicencio.

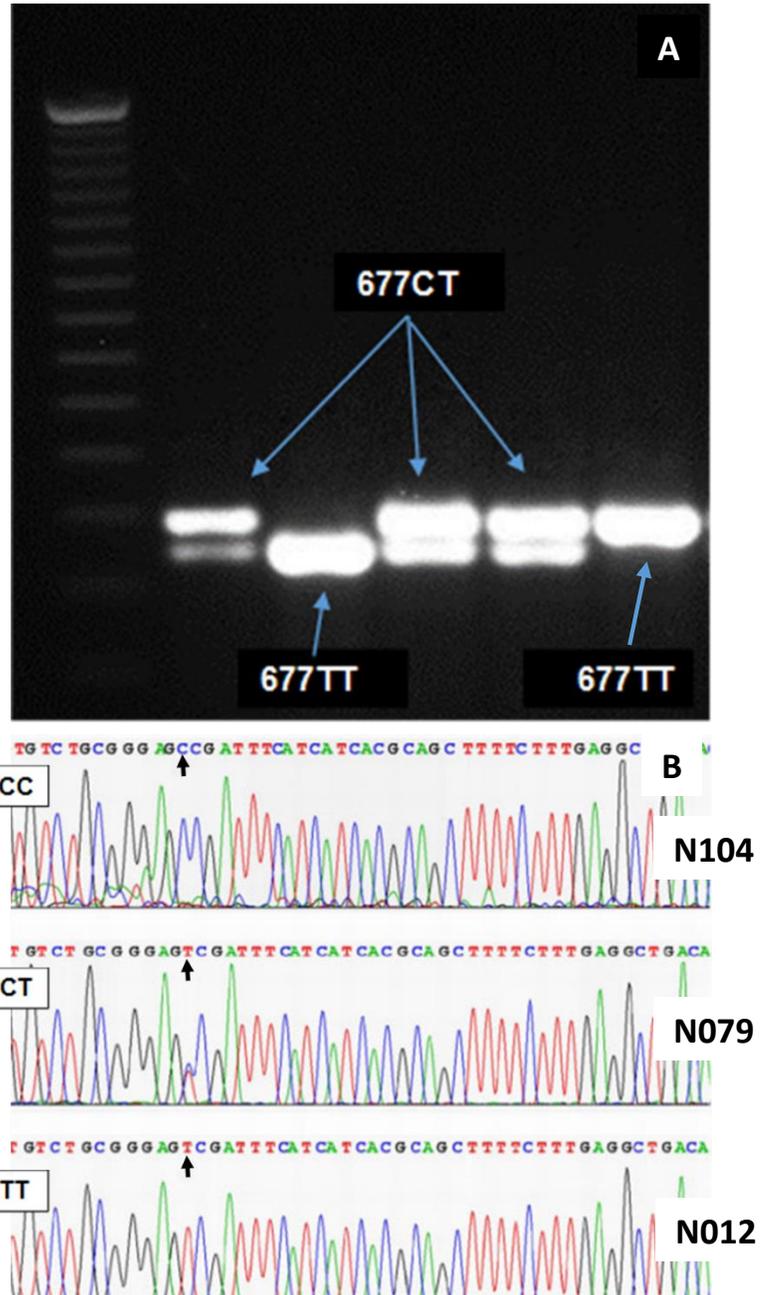
Con relación a los adultos, se contó con la participación del personal administrativo y académico del colegio Nuestra Señora del Carmen y la Institución Universitaria Cedellanos. Además, se obtuvieron voluntarios externos de estas instituciones, para un total de 182 participantes adultos en Villavicencio.

Finalmente, se obtuvo una muestra total de 743 participantes, de los cuales se excluyeron 41 participantes: 24 niños de las dos ciudades por estar emparentados o porque las muestras estaban contaminadas y 17 adultos de las dos ciudades por contaminación de la muestra, para un total de 702 participantes: 343 de la ciudad de Bogotá (150 niños y 193 adultos) y 359 de la ciudad de Villavicencio (189 niños y 170 adultos).

## **5.2 Análisis genético-poblacional**

El producto de amplificación de 198pb de cada uno de los voluntarios incluidos en el estudio fue digerido con la enzima de restricción *HinfI* con lo que se obtuvieron los genotipos para cada individuo. En la [figura 13](#) imagen **A**, se observan los patrones de digestión del homocigoto para el alelo C (carril 6°), el homocigoto para el alelo T (carril 3°) y el heterocigoto (carril 2°, 4° y 5°). Además las digestiones se confirmaron por medio de secuenciación por Sanger de 10 muestras al azar ([Fig 13 B](#)).

En la Tabla 5, se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *MTHFR* 677C→T en diferentes regiones del mundo, en especial se realizó una compilación de estudios realizados en Colombia, los últimos datos pertenecen a los obtenidos en este estudio, los penúltimos son los obtenidos en un estudio anterior realizado por nuestro grupo. Los estudios sombreados en color naranja fueron analizados por Gonzales-Galofre y colaboradores y debido que estos estudios contienen población adulta



**Figura 13. A.** Gel de agarosa al 2% donde se evidencia cada genotipo. En el 1er marcador de peso molecular, 2°, 4° y 5° dos bandas que representan al genotipo heterocigoto, 3° carril genotipo homocigoto 677TT, 6° carril genotipo homocigoto 677CC. **B.** secuenciación por Sanger de los genotipos al azar. 677CC pertenece a la muestra identificada como N104, 677CT a N079, 677 a N012, las flechas negras muestran la posición con el cambio.

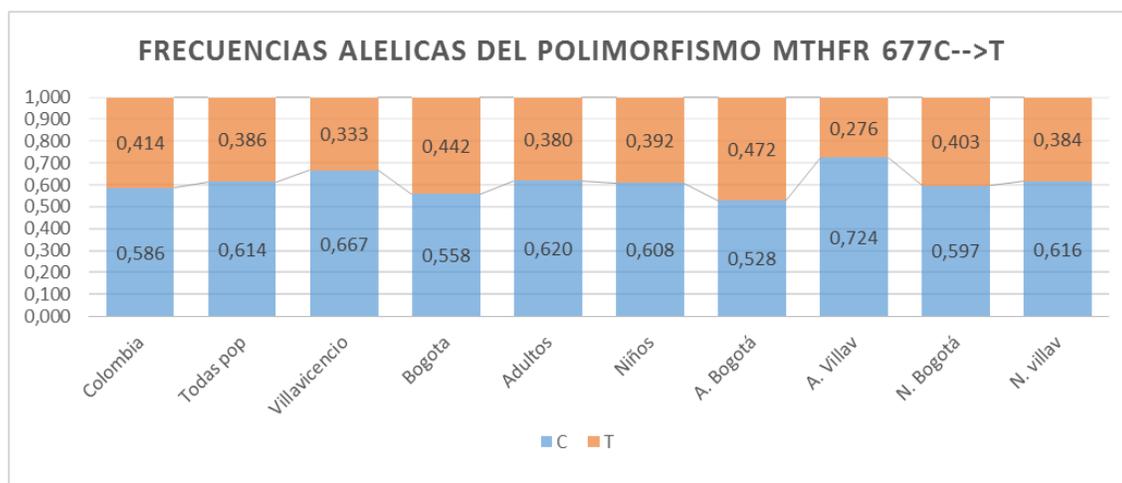
mayor de 30 años, estos análisis fueron utilizados para para comparar con algunos de nuestros datos de población adulta.

A su vez en la [Figura 14](#) se presentan las frecuencias alélicas del polimorfismo *MTHFR* 677C→T para la muestra total y para los subgrupos por ciudad y por grupo etario. Como se puede observar, las frecuencias alélicas entre las poblaciones son similares, a excepción de la población de adultos de Villavicencio que tiene una menor frecuencia para el alelo *MTHFR* 677T. La frecuencia más alta de este alelo se observa en la población de adultos en Bogotá D.C. Además a partir de los estudios sombreados en naranja de la [Tabla 5](#), se obtuvieron las frecuencias alélicas del polimorfismo *MTHFR* 677C→T en la población de estudio sin incluir la población infantil Estos resultados son semejantes a los resultados obtenidos en la población total de nuestro y la de adultos [Figura 14](#).

Región	País	Total N°	Frecuencias genotípicas			Frecuencias Alélicas		Ref.
			CC	CT	TT	C	T	
<b>Asia centro-occidente</b>	India	49	0,980	0,020	0,000	0,990	0,010	(112)
	Irán	391	0,560	0,389	0,051	0,755	0,246	(113)
<b>Asia oriente</b>	China	204	0,641	0,313	0,046	0,798	0,202	(114)
	China	398	0,163	0,525	0,312	0,426	0,574	(115)
	Japón	778	0,434	0,464	0,015	0,666	0,334	(54)
<b>Europa</b>	Turquía	100	0,720	0,260	0,020	0,850	0,150	(116)
	Italia	236	0,292	0,479	0,229	0,532	0,468	(117)
	Francia	133	0,375	0,526	0,098	0,639	0,361	(54)
<b>África</b>	África subsahariana	234	0,867	0,132	0,000	0,934	0,066	(54)
	Zaire & Cameron	67	0,896	0,104	0,000	0,948	0,052	(54)
<b>América del Norte</b>	Estados Unidos (hispanos)	13	0,385	0,385	0,231	0,577	0,423	(118)
	Estados Unidos (afroamericanos)	185	0,821	0,156	0,021	0,875	0,125	(54)
	Estados Unidos (Caucásicos)	307	0,485	0,450	0,065	0,710	0,290	(118)
<b>América</b>	México	631	0,337	0,419	0,244	0,547	0,453	(119)

<b>Latina</b>	Brasil	111	0,369	0,478	0,153	0,608	0,392	(120)
	Colombia (Bogotá D.C.)	150	0,280	0,467	0,253	0,513	0,487	(121)
	Colombia (Bogotá D.C.)	95	0,232	0,516	0,253	0,490	0,511	(122)
	Colombia (Antioquia)	114	0,316	0,491	0,491	0,193	0,561	(123)
	Colombia (Antioquia)	206	0,452	0,403	0,146	0,653	0,347	(124)
	Colombia* (Bogotá D.C.)	206	0,270	0,620	0,110	0,580	0,420	(96)
	Colombia** (Bogotá D.C./Villavicencio)	702	0,339	0,550	0,111	0,614	0,386	Actual

**Tabla 5. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *MTHFR* 677C→T en diferentes regiones del mundo. (\*) Estudio previo realizado por nuestro grupo. (\*\*) Estudio actual.**



**Figura 14.** Frecuencias alélicas para el polimorfismo *MTHFR* 677C→T en cada grupo de poblacional. A. Adultos, N. Niños, Villav. Villavicencio.

Se realizó un análisis de los genotipos obtenidos (tablas 5 – 11), comparando las frecuencias esperadas y las observadas para la muestra total y para los grupos de adultos y niños y los subgrupos de adultos de Villavicencio y Bogotá D.C. y niños de Villavicencio y Bogotá D.C. Estas comparaciones se realizaron por medio de una prueba de  $X^2$  convencional de una cola con un grado de libertad ( $G.l. = 1$ ). En la [Tabla 6](#) se presentan diferencias significativas ( $p = <0,01$ ) para los genotipos heterocigotos y homocigotos 677TT, encontrándose un exceso de los heterocigotos observados con relación a los esperados y una depleción de los

homocigotos 677TT. Se realizó una discriminación por grupo etario, donde en la población de adultos ([Tabla 7](#)) no se evidencian diferencias significativas entre las frecuencias de ninguno de los genotipos. De igual manera se compararon los subgrupos de adultos de Villavicencio y Bogotá ([Tabla 8, 9](#)) sin encontrarse diferencias significativas entre las frecuencias de los genotipos encontrados. Sin embargo, al evaluar la población total de niños ([Tabla 10](#)) se encuentran diferencias significativas ( $p = <0,01$ ) para las frecuencias de todos los genotipos encontrándose una reducción de homocigotos 677CC y 677TT observados con relación a los esperados; a su vez se evidencia un incremento significativo de los heterocigotos observados con relación a los esperados. Se realizó una subdivisión de la muestra total de los niños (Villavicencio y Bogotá) ([Tabla 11, 12](#)) y se encontraron diferencias significativas entre cada uno de los genotipos por exceso de heterocigotos y depleción de homocigotos, a excepción del genotipo 677CC en la población de niños de Villavicencio.

Genotipo	obs	esp	X <sup>2</sup>
677CC	238	264,49	2,65
677CT	386	333,00	8,43**
677TT	78	104,49	6,72**
<b>Total</b>	702	702,00	17,81**

**Tabla 6.** Proporciones genotípicas observadas (obs) y esperadas (esp) para la muestra total. G.l. = 1, (\*)  $p = <0,05$ , (\*\*)  $p = <0,01$

Genotipo	obs	esp	X <sup>2</sup>
677CC	146	139,35	0,3179
677CT	158	171,31	1,0342
677TT	59	52,35	0,8462
<b>Total</b>	363	363,00	2,1982

**Tabla 7.** Proporciones genotípicas observadas (obs) y esperadas (esp) para el grupo de total de adultos. G.l. = 1, (\*)  $p = <0,05$ , (\*\*)  $p = <0,01$ .

Genotipo	obs	esp	X <sup>2</sup>
677CC	90	88,89	0,0138
677CT	66	68,21	0,0718
677TT	14	12,89	0,0949
<b>Total</b>	<b>170</b>	<b>170</b>	<b>0,1804</b>

**Tabla 8.** Proporciones genotípicas observadas (obs) y esperadas (esp) para el subgrupo de adultos de la ciudad de Villavicencio. G.l. = 1, (\*)  $p = <0,05$ , (\*\*)  $p = <0,01$

Genotipo	obs	esp	X <sup>2</sup>
677CC	56	53,78	0,0915
677CT	92	96,54	0,2132
677TT	45,	42,78	0,1150
<b>Total</b>	<b>193</b>	<b>193,00</b>	<b>0,4197</b>

**Tabla 9.** Proporciones genotípicas observadas (obs) esperadas (esp) para el subgrupo de adultos de la ciudad de Bogotá D.C. G.l. = 1, (\*)  $p = <0,05$ , (\*\*)  $p = <0,01$

Genotipo	obs	esp	X <sup>2</sup>
677CC	92	125,06	8,7398**
677CT	228	161,88	27,0078**
677TT	19,	52,06	20,9948**
<b>Total</b>	<b>339</b>	<b>339,00</b>	<b>56,7425**</b>

**Tabla 10.** Proporciones genotípicas observadas (obs) y esperadas (esp) para el grupo total de niños. G.l. = 1, (\*)  $p = <0,05$ , (\*\*)  $p = <0,01$

Genotipo	obs	esp	X <sup>2</sup>
677CC	58	71,69	2,615
677CT	117	89,62	8,368**
677TT	14	27,69	6,770**
<b>Total</b>	<b>189</b>	<b>189</b>	<b>17,753**</b>

**Tabla 11.** Proporciones genotípicas observadas (obs) y esperadas (esp) para el subgrupo de niños de la ciudad de Villavicencio. G.l. = 1, (\*)  $p = <0,05$ , (\*\*)  $p = <0,01$

Genotipo	obs	esp	X <sup>2</sup>
677CC	34	53,28	6,977*
677CT	111	72,44	20,528**
677TT	5	24,28	15,311**
<b>Total</b>	<b>150</b>	<b>150</b>	<b>42,816**</b>

**Tabla 12.** Proporciones genotípicas observadas (obs) y esperadas (esp) para el subgrupo de niños de la ciudad de Bogotá D.C. G.l. = 1, (\*)  $p = <0,05$ , (\*\*)  $p = <0,01$

A partir de las frecuencias alélicas se realizaron los análisis del EHW. La [Tabla 13](#) muestra el cálculo del EHW global, en el cual no se encontraron resultados

significativos para la hipótesis déficit de heterocigotos, en cambio se encontró alta significancia ( $p < 0,01$ ) rechazando el EHW consecuencia de un exceso de heterocigotos. Al analizar cada uno de los subgrupos por separado, se encontró que para la hipótesis déficit de heterocigotos todos los subgrupos se encontraban en EHW, sin embargo, al probar la hipótesis exceso de heterocigotos se encontró que existe un rechazo significativo ( $p < 0,01$ ) del EHW en los grupos de niños, tanto en Villavicencio como en Bogotá. Esta desviación significativa no se observa en ninguno de los grupos de adultos (Tabla 14, 15).

EHW global: déficit de heterocigotos		
Total	$p = 1,000$	D.E = 0,000
EHW global: exceso de heterocigotos		
Total	$p = 0,000^{**}$	D.E = 0,000

**Tabla 13.** Cálculo de equilibrio Hardy-Weinberg global, para cada una de las hipótesis. (\*)  $p = < 0,05$ , (\*\*)  $p = < 0,01$ . D.E. Desviación estándar.

Test EHW: Déficit heterocigotos				
	<i>p-value</i>	D.E	F Weir & Cockerhan	F Robertson & Hill
N. Bogotá	1,000	0,000	-0,535	-0,536
N. Villav	1,000	0,000	-0,307	-0,307
A. Villav	0,309	0,009	0,046	0,046
A. Bogotá	0,395	0,010	0,033	0,033

**Tabla 14.** Cálculo de equilibrio Hardy-Weinberg para cada subgrupo, para la hipótesis déficit de heterocigotos. (\*)  $p = < 0,05$ , (\*\*)  $p = < 0,01$ . D.E. Desviación estándar.

Test EHW: Exceso heterocigotos				
	<i>p-value</i>	D.E	F weir & Cockerhan	F Robertson & Hill
N. Bogotá	0,000 <sup>**</sup>	0,000	-0,535	-0,536
N. Villav	0,000 <sup>**</sup>	0,000	-0,307	-0,307
A. Villav	0,783	0,007	0,046	0,046
A. Bogotá	0,738	0,005	0,033	0,033

**Tabla 15.** Cálculo de equilibrio Hardy-Weinberg para cada subgrupo, para la hipótesis exceso de heterocigotos. (\*)  $p = < 0,05$ , (\*\*)  $p = < 0,01$ . D.E. Desviación estándar.

Tras realizar el cálculo del EHW se estimó la heterogeneidad genética. Como se puede observar en la [Tabla 16](#) se calcularon las heterocigocidades intra e interpoblacionales. Se encontraron resultados significativos para la población de niños, tanto de Bogotá como de Villavicencio, lo que significa que hay un incremento de la heterocigocidad observada entre los individuos con relación a la heterocigocidad esperada entre los individuos entre las poblaciones. Por el contrario, el análisis de heterocigocidad en poblaciones adultas no muestra diferencias significativas.

	1-Qintra	1-Qinter	P-Value	D.E.
<b>N. Bogotá</b>	0,740	0,482	0,00000**	0,00000
<b>N. Villav</b>	0,619	0,474	0,00002**	0,00000
<b>A. Villav</b>	0,477	0,500	0,56727	0,00046
<b>A. Bogotá</b>	0,388	0,401	0,70375	0,00046

**Tabla 16.** Cálculo de diversidad (Heterocigocidad) entre los individuos ( $1 - Q_{intra}$ ) y entre los individuos entre las poblaciones ( $1 - Q_{inter}$ ). (\*)  $p = <0,05$ , (\*\*)  $p = <0,01$ . D.E. Desviación estándar. N: niños, A: adultos, Villav: Villavicencio.

Estos resultados son consistentes con los resultados obtenidos para las estimaciones de diversidad de Nei ([Tabla 16](#)). Los valores de  $G_{st}'$  para la muestra total corresponden a valores significativamente mayores de 0, con lo cual se considera que las cuatro poblaciones no se comportan como una sola. Al evaluar cada uno de estos parámetros entre los grupos de estudios se encuentra que el grupo de niños no presenta valores mayores a 0 ([Tabla 17](#)). Sin embargo, llama la atención los valores de  $G_{st}'$  para la población de adultos encuentra valores ligeramente significativos (diferentes a cero), lo que se correlaciona con que entre las poblaciones de adultos pueda encontrarse sub-estructuración poblacional.

<b>Población total</b>										
Locus	Ho	Hs	Ht	Dst	Dst'	Ht'	Gst	Gst'	Gis	
<b>C677T</b>	0,556	0,464	0,473	0,009	0,012	0,476	0,019	0,025	-0,198	

Niños									
Locus	Ho	Hs	Ht	Dst	Dst'	Ht'	Gst	Gst'	Gis
C677T	0,680	0,478	0,478	0,000	0,000	0,477	0,000	0,000	-0,422
Adultos									
Locus	Ho	Hs	Ht	Dst	Dst'	Ht'	Gst	Gst'	Gis
C677T	0,432	0,451	0,469	0,018	0,037	0,487	0,039	0,075	0,040

**Tabla 17.** Estimaciones de diversidad de Nei.

El cálculo de los estadísticos F mostró resultados similares a las estimaciones de diversidad de Nei, encontrándose que los valores de  $F_{st}$  para la muestra total son significativos ( $p < 0,01$ ) (Tabla 18), lo que se relaciona con un posible efecto de estructuración población entre la muestra total y las subpoblaciones; de igual manera, este efecto sobre la población total es consecuencia de una estructura poblacional que es evidente entre el grupo de adultos ( $p < 0,01$ ) (Tabla 19). En el grupo de niños no se encuentra estructuración poblacional ( $X^2 = 0.678$ ,  $p = 0,7693$ ) (Tabla 20) lo que quiere decir que la población de niños (Bogotá y Villavicencio, combinadas) se comporta como una sola población.

Se calcularon los valores de significancia para las  $F_{st}$  asumiendo, o sin asumir, EHW (Tabla 21). Estos resultados fueron significativos para la muestra total y para el grupo de adultos, mientras que no fue significativo para la muestra de niños.

$F_{it}$	$\chi^2$	$F_{st}$	$\chi^2$	$F_{is}$	$\chi^2$
<b>-0,152</b>	16,219**	0,026	36,504**	-0,182	23,253**

**Tabla 18.** Estadísticos F para la muestra total. Grados de libertad = 1, (\*)  $p = < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ .

$F_{it}$	$\chi^2$	$F_{st}$	$\chi^2$	$F_{is}$	$\chi^2$
<b>0,112</b>	4,553*	0,075	54,450**	0,041	0,610

**Tabla 19.** Estadísticos F para el grupo de Adultos. Grados de libertad = 1, (\*)  $p = < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ .

$F_{it}$	$\chi^2$	$F_{st}$	$\chi^2$	$F_{is}$	$\chi^2$
<b>-0,41</b>	56,986**	-0,001	-0,678	-0,409	56,708**

**Tabla 20.** Estadísticos F para el grupo de niños. Grados de libertad (\*)  $p = < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ .

	$F_{st}$ Asumiendo EHW	$F_{st}$ sin asumir EHW
<b>Muestra total</b>	<0,001	<0,001
<b>Adultos</b>	<0,001	<0,001
<b>Niños</b>	0,622 -0,569	0,538 - 0,480

**Tabla 21.** Significancia del estadístico  $F_{st}$  asumiendo o sin asumir EHW.

Finalmente, se analizaron otros estadísticos F encontrando que en la muestra total se encuentran valores negativos de  $F_{is}$  y  $F_{it}$  al igual que en el grupo de niños. A su vez el grupo de adultos muestra un  $F_{it}$  significativo al igual que el  $F_{is}$ , lo que es corroborado por el coeficiente de endogamia ( $f$ ) de Wright ([Tabla 22](#)).

$f$ de Wright	
<b>Muestra total</b>	-0,198
<b>Adultos</b>	0,042
<b>Niños</b>	-0,423

**Tabla 22.** Coeficiente de endogamia ( $f$ ) de Wright.

Al observar la F de Weir & Cockerham y la F de Robertson & Hill ([Tabla 15](#)), encontramos que este déficit de heterocigotos se observa tanto en los subgrupos de adultos de Villavicencio como de Bogotá. Así, los dos subgrupos contribuyen a los resultados observados en los estadísticos F en el grupo total de adultos.

Se realizó un modelo de ventaja del heterocigoto (sobredominancia) bajo el modelo básico de selección. Como se observa en la [Tabla 23](#) se realizó manualmente la estimación del *fitness* relativo teniendo en cuenta cada uno de los genotipos, suponiendo que la fuerza selectiva se presentó en un momento intermedio entre los adultos (pre-selección) y los niños (post-selección). Este momento se dibujó con una línea roja. Además, se obtuvo el coeficiente de selección para cada genotipo siendo la  $S_1$  la selección sobre el genotipo 677C y  $S_2$  la selección sobre el genotipo 677TT.

	677CC	677CT	677TT
<b>Genotipos Adultos</b>	146	158	59
<b>Genotipos Niños</b>	92	228	19
<b>Fitness absoluto (<math>W</math>)</b>	0,630	1,443	0,322
<b>Fitness relativo (<math>w</math>)</b>	0,437	1,000	0,223
<b>Coefficiente selección (<math>s</math>)</b>	0,563	0,000	0,777

**Tabla 23.** Parámetros de Selección. Línea roja representa el evento de selección sobre los genotipos iniciales. \* Coeficiente de selección 1 ( $S_1$ ), \*\* coeficiente de selección 2 ( $S_2$ ).

En la [Tabla 24](#). Observamos las frecuencias esperadas, asumiendo EHW, antes y después de la acción de la fuerza selectiva. Además, se calculó la contribución del *fitness* relativo sobre las cada una de las frecuencias genotípicas antes de la selección y el *fitness* promedio ( $\bar{w}$ ). Con esto último se calcularon las frecuencias esperadas después de la selección.

	677CC	677CT	677TT	
<b>Fitness relativo (<math>w</math>)</b>	0,437	1,000	0,223	
<b>Fq antes de selección</b>	0,384	0,471	0,144	1,000
<b>Contribución del <math>w</math></b>	0,168	0,471	0,032	$\bar{w} = 0,671$
<b>Fq después de Selección</b>	0,250	0,702	0,048	1,000

**Tabla 24.** Frecuencias (Fq) de los genotipos antes y después de la selección asumiendo EHW. *Fitness* promedio ( $\bar{w}$ ).

Post-selección				
Alelo	Fq observadas	Fq esperada	$\chi^2$	Valor p
<b>677C (<math>p_1</math>)</b>	0,608	0,588	0,0007	0,9789
<b>677T (<math>q_1</math>)</b>	0,392	0,411	0,0009	0,9761

**Tabla 25.** Comparación entre las frecuencias alélicas observadas y esperadas después de la selección (post-selección). Grados de libertad = 1. (\*)  $p = <0,05$ , (\*\*)  $p = <0,01$ .

Se obtuvo la frecuencia esperada para el alelo 677T posterior a la selección ( $q_1$ ) y, a partir de éste, se obtuvo la frecuencia del alelo ( $p_1 = 1 - q_1$ ). Estos valores se compararon con las frecuencias observadas en los niños (post-selección), sin encontrarse diferencias significativas ([Tabla 25](#)). A partir de las frecuencias alélicas esperadas se obtuvieron los genotipos esperados después de la selección

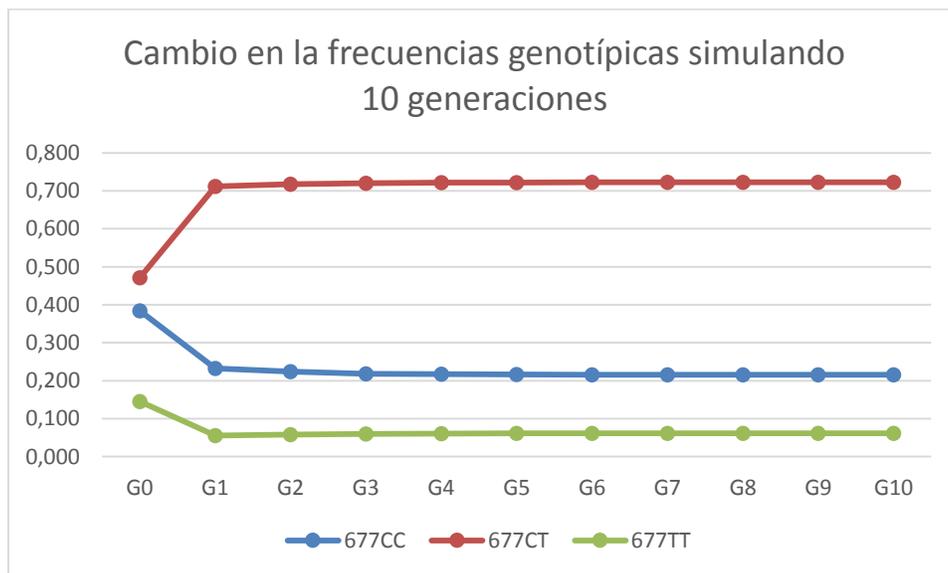
y se compararon con las frecuencias observadas para cada genotipo suponiendo que ha transcurrido una sola generación humana lo cual muestra que no hay diferencias significativas entre los genotipos lo que explica que el modelo de selección por el heterocigoto se comporta igual que los datos observados ([Tabla 26](#)).

Genotipos	Frecuencias Esperadas		Frecuencias observadas		$\chi^2$	
	Pre-selección	Post-selección	Pre-selección	Post-selección	Post-selección	Post-selección
<b>677CC</b>	0,384	0,232	0,402	0,271	0,0009	0,0067
<b>677CT</b>	0,471	0,711	0,435	0,673	0,0027	0,0021
<b>677TT</b>	0,145	0,055	0,163	0,056	0,0021	0,0000

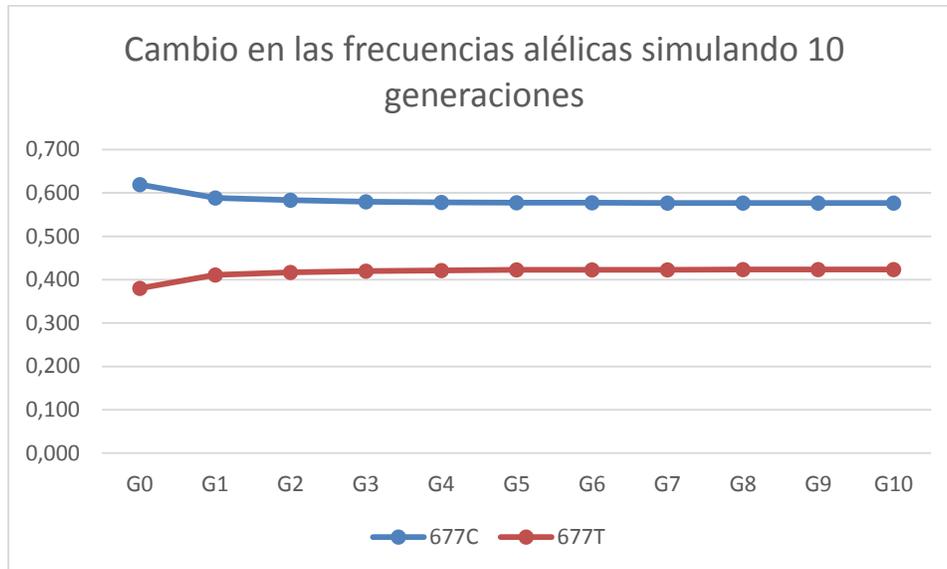
**Tabla 26.** Comparación entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas luego de una generación, antes y después de la selección. Adultos (pre-selección), niños (post-selección). Grados de libertad = 1. (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ .

Se realizaron simulaciones con el programa POPGENE.S<sup>2</sup> para evaluar el comportamiento de las frecuencias alélicas y genotípicas en las siguientes diez generaciones, asumiendo que se mantiene el *fitness* relativo para cada genotipo y, por ende, los mismos coeficientes de selección para los homocigotos. En el [Figura 15](#) se muestra la simulación de los cambios en las frecuencias genotípicas en cada generación, observándose un incremento súbito en la frecuencia del genotipo heterocigoto (677CT) entre la generación 0 (G0) y la generación 1 (G1), posteriormente, se evidencia un ligero incremento de las frecuencias de este genotipo entre la G1 y la G6 donde se estabiliza y la frecuencia del el heterocigoto se mantiene (677CT) = 0,723 en las siguientes generaciones. Por el contrario, las frecuencias de los genotipos homocigotos (677CC y 677TT) presentan una disminución súbita entre G0 y G1. Así mismo, la frecuencia del genotipo 677CC decrece levemente ente la generación G1 y la G8, donde se estabiliza y se

mantiene la frecuencia del homocigoto (677CC) = 0,215 y la frecuencia del genotipo 677TT presenta un crecimiento ligero a partir de la G1 alcanzando su máxima frecuencia en la G6 (677TT) = 0,062. Se simularon los cambios en las frecuencias alélicas, encontrándose el mayor cambio entre la G0 y la G1, donde el alelo 677C reduce su frecuencia y, posteriormente, presenta una disminución ligera hasta llegar a su mínima alélica frecuencia (677C) = 0,577 en la G6. Por el contrario, la frecuencia del alelo 677T se incrementa ligeramente a partir de la G1 hasta alcanzar su frecuencia máxima en la G6 (677C) = 0.423 (Fig 16).



**Figura 15.** Simulación del cambio de las frecuencias genotípicas en 10 generaciones. Modelo de selección del heterocigoto, si se mantienen los mismos valores de *fitness* relativo para cada genotipo.



**Figura 16.** Simulación en el cambio de las frecuencias alélicas en 10 generaciones bajo un modelo de selección de heterocigoto, si se mantiene los mismos valores de *fitness* relativo para cada genotipo.

## 6 Discusión

### 6.1 Análisis de genotipos y frecuencias alélicas

Al realizar la comparación de las frecuencias alélicas obtenidas en este estudio ([Fig 14](#)), se puede observar que en todos los casos más del 50% de los alelos corresponden al alelo 677C, encontrándose valores entre 53% y 72%, siendo las diferencias máximas las encontradas al comparar la población adulta de Villavicencio con la de Bogotá (72% y 60% respectivamente). En el caso de las poblaciones de niños, se identificó que son mucho más homogéneas y que la diferenciación entre las dos poblaciones muestreadas es de menos del 2%.

Estos valores fueron comparados con los reportados previamente para la población colombiana ([Tabla 5](#)) y se puede observar que las frecuencias de la población total de nuestro estudio se encuentran en un mismo rango en relación

con las del territorio nacional (entre 58% y el 61%), sin embargo, los resultados de la población colombiana son comparables únicamente con el grupo de adultos de nuestro estudio debido a que comparten los mismo rangos de edad (individuos mayores de 30 años aproximadamente). Así, se puede observar que las similitudes se mantienen para adultos de Bogotá, los cuales se encuentran en un rango entre el 53% y el 58%, de manera similar a los valores reportados previamente.

La gran diferencia se observa al comparar la población adulta de Villavicencio, la cual tiene una frecuencia mucho mayor del alelo 677C a la reportada para otras poblaciones colombianas ([Tabla 5](#)). Esto puede deberse a las diferencias en los procesos de colonización del departamento del Meta al ser comparados con los departamentos previamente reportados (Antioquia y Bogotá, D.C.), lo que indicaría que la población adulta de Villavicencio refleja una historia demográfica diferente a la encontrada en la zona Andina en Colombia. Esta diferenciación no se mantiene al comparar las poblaciones infantiles en estas dos zonas, lo que puede indicar procesos de migración masivos desde el centro del país o algún evento biológico que esté aumentando de manera importante la frecuencia del alelo 677T y haga que los niños de Villavicencio y Bogotá D.C. se comporten de la misma manera.

Llama la atención que en Colombia y el mundo no haya datos acerca del comportamiento de este polimorfismo en población infantil, por lo tanto, los datos obtenidos en los niños son únicos y no pueden ser comparados con reportes para infantes. Los datos más cercanos podrían obtenerse de dos estudios realizados uno en Colombia y otro en España. En el estudio español (46) se evaluaron los

cambios en las frecuencias genotípicas y alélicas a través del tiempo en la población española, desde el año 1900 hasta el 2000. Ellos dividieron la población en cuatro grupos de estudio de la siguiente manera, aquellos nacidos entre 1900-1925 (n=206), 1926-1950 (n=320), 1951-1975 (n=408) y 1976-2000 (n=371). Este trabajo encuentra diferencias en las frecuencias alélicas en el grupo de 1976 – 2000 con relación a los otros grupos de estudio. Aunque los datos de este estudio no son perfectamente comparables por edad con los nuestros, si pueden ser comparados con los resultados obtenidos por González-Galofre y colaboradores en Colombia en el 2010 (96) quienes incluyeron individuos en un rango de edad similar (nacidos entre 1985 y 1993), encontrándose similitudes en las frecuencias alélicas, las cuales se mantiene en el mismo rango para el alelo 677C (entre 53% y 58%).

Resulta interesante las diferencias observadas entre las frecuencias alélicas del estudio español y el de González –Galofre, al compararlas con las de los niños de este estudio. En los niños, se ve un incremento en la frecuencia del alelo 677C (60%), lo que sugiere que las diferencias temporales, y no solo las diferencias espaciales, están afectando este polimorfismo.

Estos cambios en las frecuencias alélicas reflejan la dinámica de los genotipos en la población de estudio. Así, al analizar la población global (adultos niños), incluidos en este trabajo, encontramos un incremento significativo en la proporción de heterocigotos observados y un déficit de homocigotos observados para 677TT con relación a los esperados ([Tabla 6](#)), cambios que no se observan en la

población de adultos ([Tabla 7](#)), pero si son evidentes al comparar con los datos de los genotipos de los niños ([Tabla 10](#)).

Al comparar los datos genotípicos con los reportes previos de la población colombiana (96), observamos que las proporciones genotípicas previamente reportadas presentan similitudes con las frecuencias genotípicas de los adultos (tanto de Bogotá como de Villavicencio), mientras que las del estudio de González-Galofre se asemejan más a las de los niños. Este cambio en las frecuencias alélicas soporta nuestra hipótesis de que los cambios de la dinámica genético-poblacional para el polimorfismo *MTHFR* 677C→T se producen por las diferencias temporales. No obstante Mayor-Olea y colaboradores (46) observaron que estos cambios genotípicos en la población española son diferentes y que la frecuencia del alelo 677T es consecuencia de un exceso de homocigotos 677TT y no de heterocigotos, como es el caso de las dos poblaciones infantiles colombianas. Ellos sugieren que estos cambios puede ser consecuencia de un evento selectivo sobre la población nacida entre 1976 y 2000, sin embargo, no descartan un posible efecto Wahlund en su población, lo que podría explicar estas observaciones. Como se discutirá más adelante, en la población colombiana no encontramos evidencia de efecto Wahlund.

## **6.2 Análisis de equilibrio Hardy-Weinberg**

Al realizar la medición del EHW en este estudio se observó que la población total no se encuentra en EHW ( $p = 0,000$ ) aceptando la hipótesis alternativa de exceso de heterocigotos ([Tabla 13](#)). Esta desviación del EHW total es consecuencia de la

pérdida del EHW observada en el grupo de niños ([Tabla 15](#)), tanto en niños de Villavicencio como de Bogotá D.C., a diferencia de los dos grupos de adultos quienes se encontraron en EHW ([Tabla 15](#)). La desviación en EHW observada en los niños y no en los adultos sugiere que puede existir algún evento biológico entre los niños, que está alterando las frecuencias genotípicas y alélicas, que no se observa en los adultos.

El trabajo reportado por González-Galofre reporta también pérdida en el EHW ( $p = 0,0001$ ) en su población de estudio(96), así como Mayor-Olea y colaboradores en España. En todos los casos se encuentra la desviación en el EHW en la población nacida en el último cuarto del siglo XX(46). Estos cambios en la población de González-Galofre (población colombiana) son similares a los observados en los niños de nuestro estudio, así que es posible que el mismo evento biológico esté afectando las dos poblaciones y el hecho de que los adultos se encuentren en EHW sugiere que este evento se pudo presentar en un momento posterior a 1976. Así las diferencias en las desviaciones con las población española puede ser consecuencia de las diferencias genético-poblacionales entre las poblaciones Europeas y las Americanas entre estas Colombia (125). Para lo cual se realizó con los datos obtenidos por Mayor-Olea el análisis de EHW encontrándose que la población nacida antes de 1976 ( $n = 936$ ) se encontraban en equilibrio para dos hipótesis, déficit y exceso de heterocigotos ( $p = 0,8995$  y  $0,9359$  respectivamente), con lo que las diferencias con la población española no podrían ser explicadas como consecuencias de los acervos genéticos propios de cada población, por lo tanto la desviación del EHW afectando un único locus se

presente coincidente con la misma escala temporal, lo que sugiere que esto puede ser consecuencia del mismo evento biológico que afecta a las poblaciones colombianas, pero puede diferir en su intensidad. Así, sugerimos que este comportamiento no es exclusivo de la población colombiana o inherente de esta lo que descarta un posible efecto fundador.

Dos eventos biológicos pueden producir estos cambios en la magnitud encontrada: selección y efecto Wahlund, ya que estos dos eventos no afectan por igual a todo el genoma, como la endogamia, sino a partes puntuales de él. El efecto Wahlund, o efecto de subdivisión poblacional, promueve el aumento de homocigotos y la disminución de heterocigotos como se puede observar en el estudio de la población española(46). Aunque el efecto Wahlund puede desviar también las estimaciones del EHW, algunos elementos ponen en duda este evento para la población de niños de este trabajo. En primer lugar, la desviación del EHW en esta población se presenta por un exceso de heterocigotos, lo cual no es producido por efecto Wahlund; en segundo lugar, las diferencias genéticas entre la población de niños no son significativas, como lo reflejan el  $G_{ST}'$  ([Tabla 17](#)) y los estadísticos F de Wright ([Tabla 20](#)). En tercer lugar, el efecto Wahlund es menos probable debido al alto flujo génico entre la población de la región Andina y la región de la Orinoquia posterior al 1974 con la construcción del viaducto y la carretera Bogotá D.C – Villavicencio, lo que ha promovido que muchas de las personas migrantes se establezcan y formen familias con personas residentes de cada región, homogenizando las poblaciones. Por lo tanto, la no existencia de EHW por efecto Wahlund es poco probable.

En nuestro trabajo, la desviación del EHW es consecuencia de un exceso de heterocigotos, lo que puede deberse más comúnmente a un evento de selección. Esta puede estar actuando de dos maneras, directamente sobre el polimorfismo *MTHFR* 677C→T o sobre un haplotipo que lo contenga, lo que requiere de estudios para otros marcadores y de análisis de desequilibrio de ligamiento.

Esto significa que el evento selectivo por ventaja del heterocigoto puede ser el evento biológico más probable y más parsimonioso de acuerdo con los sesgos observados respecto al EHW en la población de niños.

### **6.3 Diversidad y estructura poblacional**

Las estimaciones de diversidad de Nei ([Tabla 16](#)) y  $G_{ST}$  muestran que la mayor heterogeneidad se encuentra en la población total, como consecuencia de los comportamientos diferentes de las poblaciones de niños y adultos. Al analizar la población de adultos, puede explicarse la diferenciación poblacional con las  $G_{ST}$  restricciones en el flujo génico entre las poblaciones de Villavicencio y Bogotá D.C antes de 1976. Este aislamiento puede ser explicado por la cordillera Oriental, la cual es una barrera geográfica que separa la región Andina, en la que se encuentra la ciudad de Bogotá, y la región de la Orinoquia, a la que pertenece la ciudad de Villavicencio, limitando las migraciones entre ellas.

Históricamente, la comunicación entre estas dos regiones solo se hace por dos carreteras; la vía Villavicencio – Barranca de Upía – Yopal – Sogamoso y la vía Bogotá – Villavicencio, siendo esta última la principal vía de comunicación e intercambio mercantil entre estas dos regiones. Sin embargo, no es hasta

mediados de los setentas cuando se culmina la adecuación de esta carretera para el transporte masivo y a finales de los noventas, se pone en funcionamiento la Autopista al Llano, la cual ha reducido los tiempos de viaje y ha favorecido durante las últimas décadas la migración y flujo génico entre estas regiones. Según el DANE estos movimientos migratorios se realizan en mayor medida desde Bogotá D.C. hacia Villavicencio lo que es explicado por el saldo neto migratorio (SNM) positivo del Meta entre 1996-2000 (SNM = 20254) con relación a los de 1985-1990 (SNM = -9059) y entre 1990 y 1995 (SNM = -9206)(126), lo que sugiere que antes de 1995 se presentaba más emigración y después de 1996 se observa mayor inmigración, la cual sin duda ha sido favorecida con las mejoras viales hacia Villavicencio .

Los análisis de los estadísticos  $F$  encuentran sub-estructura en la población de adultos, lo que corrobora los resultados obtenidos con las estimaciones de diversidad de Nei ([Tabla 20](#)) y sustentan la estructura poblacional de nacimiento de los adultos discutida antes. Además, estos resultados muestran que los niños se comportan como una única población, lo que sugiere que este aislamiento geográfico pudo disiparse entre 1976 y el 2000 (fechas limitantes de los grupos muestreados), lo que concuerda con los datos históricos de la construcción de la vía Bogotá-Villavicencio.

El estadístico  $F_{ST}$ , y sus modificaciones, han sido usados históricamente para detectar fenómenos de adaptación en ambientes locales. Variaciones entre poblaciones con valores de  $F_{ST}$ , inusualmente elevados a los esperados son típicamente interpretadas como resultado de presiones de selección positiva que

están restringidos a ambientes específicos o especializados a ciertos componentes dietarios en las subpoblaciones(127). No obstante, resultados de la  $F_{ST}$  también pueden ser explicados por diferencias en fenómenos ambientales y nutricionales a los que podrían estar sometidos, en nuestro caso, las poblaciones de adultos y niños o, más específicamente, los padres de estos.

Los climas de la región Andina y la Orinoquia no han exhibido mayores cambios durante el último siglo, pero los patrones nutricionales de las dos poblaciones si lo han hecho como consecuencia del aislamiento geográfico al que ha sido sometidas, lo que promovió el mayor consumo de alimentos animales en la región de la Orinoquia, a diferencia de la región Andina donde la alimentación se basaba en mayor parte a los productos obtenidos de la agricultura. Sin embargo, con la creación de la autopista Bogotá-Villavicencio, las características dietarias se han homogenizado como consecuencia de las facilidades de intercambio de productos, lo que soporta el comportamiento poblacional de los niños. De esta manera, los cambios culturales con relación a la dieta y al aislamiento geográfico son dos factores que han influido de manera rápida a través del tiempo y podrían explicar los resultados obtenidos en este estudio.

Los valores obtenidos de  $F_{IT}$  y  $F_{IS}$  en la población general son negativos, sin embargo, al realizar un análisis en las subpoblaciones, encontramos que la población de adultos presenta valores positivos ([Tabla 19](#)), lo que se explica por el ligero déficit de heterocigotos e incremento de homocigotos y soporta posibles eventos de endogamia o, más posiblemente, efecto Wahlund. El posible efecto

Wahlund puede ser considerado una explicación al exceso de homocigotos si se tienen en cuenta los factores de aislamiento geográfico presentados antes.

Es importante remarcar que la población de niños presenta valores de  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  negativos ([Tabla 20](#)), por lo tanto, es poco probable que se encuentre bajo los efectos de la endogamia. Esto, asociado a los cambios observados a través del tiempo y a las diferencias entre las frecuencias alélicas para el polimorfismo *MTHFR* 677C→T entre las poblaciones de estudio y a nivel global, soportaría la hipótesis basada en posibles presiones selectivas que favorecen al heterocigoto, manteniendo la presencia de este polimorfismo.

#### **6.4 Modelo de selección**

A partir de los resultados discutidos anteriormente, elegimos el modelo de selección a favor del heterocigoto, o selección estabilizante, como el mejor modelo para soportar nuestros resultados. Ha sido sugerido en un estudio previo sobre las frecuencias del polimorfismo *MTHFR* 677C→T en la población de Noruega que se cuenta con un mayor *fitness* relativo para el heterocigoto en una cohorte de individuos adultos, sin llegar a ser comprobado(128). Bajo este modelo, los dos alelos del polimorfismo se mantendrán en la población, debido a que el mayor *fitness* ( $w = 1$ ) lo tiene el heterocigoto.

Mayor-Olea y colaboradores en su estudio (46) proponen un modelo de selección que puede ser clasificado como de dominancia incompleta o direccional, donde un único alelo se fijará en la población si el evento de selección que generó el cambio abrupto de las frecuencias en los últimos 25 años del siglo XX es persistente en el

futuro. La diferencia de los dos modelos es consecuencia de la divergencia entre las hipótesis de desviación de EHW obtenidas en nuestro estudio y el de la población española, exceso de heterocigotos y exceso de homocigotos respectivamente. Estos modelos serán útiles para simular los comportamientos entre generaciones, sin embargo, la falla de estos modelos se debe a que las generaciones humanas son sobrelapantes y no se comportan como independientes, sin embargo, se manejaron como independiente para explicar nuestro modelo.

Al usar el modelo de selección propuesto aquí, observamos que el cambio de las frecuencias alélicas se presenta rápidamente durante la primera generación (entre G0 y G1) y se mantiene a lo largo de las generaciones subsiguientes, alcanzando valores cercanos a 50%, sin presentar mayores cambios en la generaciones futuras teniendo en cuenta una presión de selección constante. Con relación a los cambios de los genotipos, encontramos que a un *fitness* constante entre generaciones, el genotipo que prevalecerá será el heterocigoto 677CT el cual alcanzará frecuencias máximas de hasta 72% lo que favorece que los dos alelos permanezcan en la población ([Fig 16](#)). Aunque nuestro modelo explica los cambios de las frecuencias en el tiempo y predice su comportamiento, no es claro cuál es la presión de selección que modela este comportamiento genético-temporal.

En el caso de la población española(46), los autores sugieren que el tratamiento con vitaminas y folatos a las embarazadas es la presión de selección emergente y ubican el inicio de esta política en España a partir de 1998. Ellos argumentan que

los folatos incrementan la viabilidad de los fetos con genotipo homocigoto 677TT; esta hipótesis está basada en el incremento del número de individuos con el polimorfismo a mediados de 1970, el coincidente incremento en la ingesta de vitaminas y folatos por mujeres embarazadas en España y los resultados observados en el grupo 1976 - 2000.

## **6.5 Selección, folatos y ácido fólico**

El estudio español no es el único que relaciona un posible efecto de selección entre el folato/ácido fólico y el polimorfismo *MTHFR* 677C→T. Múltiples publicaciones proponen una relación genético-ambiental, una hipótesis de interacción gen-nutriente, que influencia la selección gamética y la viabilidad de los embriones que portan el polimorfismo *MTHFR* 677C→T con relación a la cantidad de folatos en el ambiente(94,128).

Wong y colaboradores en el 2002(129) encontraron un incremento del 74% en el recuento espermático en hombres subfértiles, mas no en fértiles, después de ser suplementados con ácido fólico y sulfato de zinc. Posteriormente, Ebisch y colaboradores(130) relacionan los genotipos del polimorfismo *MTHFR* 677C→T con los resultados de Wong y colaboradores, encontrando un incremento en el recuento espermático en hombres subfértiles y fértiles luego de la intervención con ácido fólico y sulfato de zinc pero, únicamente, en aquellos que presentaban el genotipo 677CC. Lucock y Yates han sido grandes expositores de esta hipótesis en múltiples publicaciones(72,92,131,132)y han presentado como hipótesis que cuando los niveles de folato, o ácido fólico, no están restringidos, se favorece la

supervivencia *in utero* para los homocigotos 677TT debido a que el genotipo incrementa los niveles de 5-10 metilendetrahidrofolato favoreciendo la síntesis y estabilidad del ADN(72,94). Con relación a lo anterior, otros estudios(46,93) encontraron que los genotipos 677CT y 677TT están sobrerrepresentados en productos de aborto recolectados durante la década de 1982 – 1990(46).

Además, se promueve la actividad de la vía de transulfuración de la homocisteína y no su remetilación, favoreciendo la reducción en la concentración de la misma. Esto favorece la reducción de los NTDs en un ambiente con exceso de folatos(90,131), a diferencia del homocigoto 677CC que puede beneficiar a los embriones cuando hay menor abundancia de ácido fólico debido a la aumentada eficiencia de la enzima con la variante silvestre.

Por su parte, Lucock y colaboradores (91) realizan un primer acercamiento a los cambios en las frecuencias del polimorfismo *MTHFR* 677C→T y a la disponibilidad de folatos en las diferentes estaciones climáticas, en individuos nacidos en Inglaterra y en Australia, antes de la implementación de la suplementación con ácido fólico en estos dos países, encontrando una mayor frecuencia del alelo 677T en las gestaciones que empezaron entre julio- septiembre comparadas con aquellas iniciadas en enero-febrero y octubre-diciembre. Este pico puede ser consecuencia del pico natural de abundancia de frutos en verano/otoño, lo que sugiere que el folato dietario puede conferir ventajas entre poblaciones dependientes de fuentes alimenticias obtenidas durante las estaciones modificando el estado vitamínico individual en el momento de la concepción(91).

Estos datos señalan a los folatos y al ácido fólico como posibles fuerzas selectivas sobre el particular comportamiento del polimorfismo *MTHFR* 677C→T a nivel mundial incluyendo nuestra población de estudio. Esta hipótesis se ajusta temporalmente con nuestros datos, debido a que los patrones de selección en nuestro estudio son observados en la población de niños (nacidos después del año 2000), al igual que González-Galofre en una población joven (nacidos entre 1985 y 1993) y Mayor Olea durante el último cuarto del siglo XX (nacidos entre 1976 y 2000) coinciden con el inicio de las campañas masivas de fortificación de las harinas y granos, y la suplementación a las gestantes con ácido fólico para la prevención de los NTDs, aunque existe gran controversia, en especial en países en vías de desarrollo, con relación a si esta normatividad se lleva cabo o no, debido a la alta incidencia de embarazos no planeados, el escepticismo de las gestantes o la falta de acatamiento de la norma.

Güenther y colaboradores(30) demuestran *in vitro* que diferentes concentraciones de folato pueden reducir marcadamente la pérdida de afinidad al cofactor y así los portadores de las variantes podrán comportarse como el genotipo silvestre ([Fig 10](#)). Por lo tanto, las características físico-químicas del ácido fólico con relación al folato, tales como la menor degradación al calor y la gran biodisponibilidad (98% del ácido fólico vs 30% del folato en los alimentos), sugieren que la fortificación de las harinas aportaría suficiente ácido fólico en la dieta lo que favorecería el desarrollo de embriones portadores del alelo 677T y su persistencia en la especie humana.

## 6.6 Nutrición y evolución humana

El mayor cambio dietario al que ha sido sometida la especie humana fue el origen de la agricultura y la domesticación animal, hace cerca de ~12.000 años atrás en diferentes partes del mundo, Asia, Europa, Suramérica y África(133), lo que generó cambios en los comportamientos culturales, sociales y nutricionales entre nuestros antepasados cazadores-recolectores y los grupos pastores-agricultores, tales como el decrecimiento del nomadismo y el incremento en la densidad poblacional. Sin embargo, el desarrollo de la agricultura lleva a la reducción de la diversidad nutricional en la dieta (por ejemplo, 50-70% de las calorías de la dieta desde la agricultura son almidones) y está asociado a esta reducción en la diversidad dietaria; la agricultura también se ha asociado a consumos excesivos de calorías, superiores a las cantidades requeridas diarias, lo que podría favorecer el desarrollo de ciertas enfermedades de la modernidad como consecuencia de la hipótesis de Neel “genotipo ahorrador”, la cual se propuso que a través de la selección natural requerida para mantener la eficiencia metabólica se seleccionaron en el genoma ciertas variantes que favorecen la máxima obtención calórica desde los alimentos consumidos. Así, debido al cambio dietario rápido, y a la alta disponibilidad de alimentos en nuestra sociedad actual, no se ha permitido la acción de la selección natural con lo cual “el genotipo ahorrador” persiste en nuestro genoma, favoreciendo el desarrollo de enfermedades prevalentes como la diabetes mellitus tipo 2 y la obesidad(134).

Estas observaciones son sustentadas por los regímenes de alimentación de las sociedades cazadoras-recolectoras actuales, cuyos comportamientos alimenticios

se asemejan a los de los humanos antes de la agricultura y sugieren que cerca de un ~65% de la dieta proviene de alimentos vegetales y el 35% restante de la dieta proviene de fuentes animales, lo que constituye dietas altas en proteínas y bajas en carbohidratos, a diferencia de las dietas encontradas en poblaciones agricultoras, por lo tanto, aún es posible que el cambio en el contenido de proteína durante la transición, de cazadores recolectores a cultivadores, represente una presión de selección sobre señales de la insulina y el metabolismo humano(135,136). De esta manera, los patrones dietarios varían temporalmente al igual que lo hacen espacialmente. Así, la respuesta adaptativa a nuevas presiones de selección local puede generar nuevos alelos por mutación o selección, lo cual favorece alelos ya existente, neutrales o ligeramente deletéreos, antes del cambio ambiental. Estos escenarios fuerzan a una respuesta adaptativa rápida y por lo tanto incrementar la frecuencia entre las especies sometidas a estos cambios dramáticos, tanto ambientales como dietarios(133) ([Fig 17](#)) .

La evolución cultural, a diferencia de la selección natural, sucede rápidamente; así, los cambios dietarios conllevan diferencias en el aporte nutricional y vitamínico a través del tiempo. Con relación al folato no es diferente, las poblaciones cazadoras-recolectoras presentaban un aporte constante de folatos debido al consumo de carne y vísceras (como hígado y riñón), alimentos que presentan grandes concentraciones de folato, esto, junto al consumo de tubérculos y productos vegetales, favorecía la persistencia de los folatos en la dieta. Sin embargo, el advenimiento de las nuevas tecnologías, como el fuego, lleva a reducción del aporte vitamínico de los alimentos por cocción y degradación por

calor, lo que causa la reducción en el aporte de folato natural. Posteriormente, esta reducción en el aporte de folatos se ve nuevamente modificada debido al desarrollo de la agricultura, con la consecuencia de la baja diversidad dietaria, la sobrerrepresentación de cereales y granos pobres en folatos; el almacenamiento y la cocina de estos alimentos pudieron favorecer largos periodos de privación de folato en la dieta post-agricultura.

Estos fenómenos históricos pudieron generar ventajas o desventajas selectivas en ciertos genes en el metabolismo del folato. Un ejemplo es el gen *NAT2*, que junto al *NAT1* mantiene el balance de folatos en los humanos por medio del catabolismo por vía de la acetilación de p-ABGlu. Se ha propuesto que el incremento en la frecuencia de múltiples haplotipos de *NAT2* que favorecen el incremento en los fenotipos acetiladores lentos, son consecuencia de los regímenes dietarios(137). Debido que el fenotipo acetilador rápido es neutral o ligeramente ventajoso, la limitación de folatos reduce el *fitness* de los acetiladores rápidos al incrementar la tasa de degradación de folatos. En las mismas condiciones el fenotipo acetilador lento o intermedio favorece la retención de folatos, reduciendo las pérdidas fetales y los defectos en el nacimiento, por incremento de su *fitness* bajo restricciones de folatos en la dieta como las presentes con la introducción de la agricultura.

Los cambios culturales respecto a la dieta no se han detenido. Múltiples fenómenos han alterado la forma de pensar con relación a las dietas en las sociedades, entre estos, la invención del arado, la agricultura química y la industrialización han favorecido cambios constantes. Sin embargo, un nuevo fenómeno cultural está cambiando nuestra sociedad como consecuencia del

rápido crecimiento económico, la urbanización y la globalización que ocurre en la actualidad. Los patrones de la dieta occidental, es decir, los hábitos de dieta en los países desarrollados y en vías de desarrollo caracterizados por el alto consumo de carbohidratos (50%) y grasas (35%), lo que incluye endulzantes, bebidas dulces, carnes procesadas y altas cantidades de harinas y granos refinados(138).

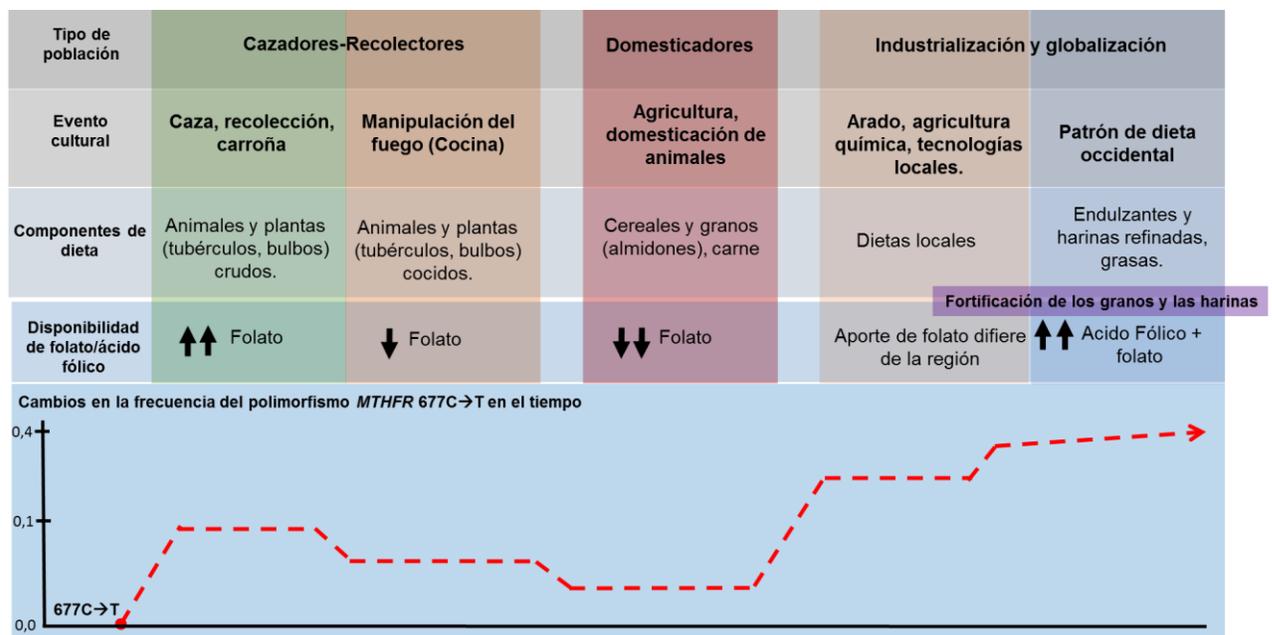
Estos cambios nutricionales a favor del consumo de carbohidratos derivados de las harinas, asociado a las campañas de fortificación, someten a las poblaciones actuales al incremento en la disponibilidad de ácido fólico, con lo cual se pueden favorecer los cambios observados en las frecuencias del alelo 677T en el mundo y a través del tiempo.

### **6.7 Cambios culturales, ácido fólico y el polimorfismo *MTHFR* 677C→T**

Es claro que la fortificación de las harinas y granos no se realiza de manera homogénea en el mundo, existen varios países principalmente en Europa, África y Asia donde no es obligatorio(139). Por lo tanto, llaman la atención los cambios observados en la población española, debido a que España no realiza fortificación de las harinas ([Fig 3](#)).

La reglamentación de la fortificación de las harinas se inició en Colombia en el año de 1996. Las harinas de trigo son de obligatoria fortificación, mientras que la fortificación de los granos y del arroz es voluntaria. El consumo diario en promedio en Colombia por persona es: harinas=81g, arroz= 96g y maíz=109g(139) y la fortificación se realiza con 1.54 mg de ácido fólico por cada kilogramo de harina(15) lo que genera aportes de ácido fólico de aproximadamente ~120 µg/día,

únicamente por las harinas consumidas. Además, se debe tener en cuenta el aporte proveniente de las fuentes naturales, el de los granos fortalecidos y el promovido por los alimentos enriquecidos, por ejemplo los cereales con contenidos de 100% el valor diario (DV) requerido de ácido fólico (400 µg/día) por porción ([Anexo 5](#)). De esta manera, es posible alcanzar valores cercanos de las concentraciones necesarias de ácido fólico para las gestantes únicamente con el aporte dietario.



**Figura 17.** Resumen y modelo de las interacciones culturales y los cambios en las frecuencias del polimorfismo *MTHFR* 677C→T a través de diferentes momentos de la historia humana fuera de África. La línea roja muestra el origen ancestral del polimorfismo y sus fluctuaciones a través del tiempo con relación a la disponibilidad de folato.

Así, proponemos una extensión del modelo gen/nutriente, que favorece la selección del polimorfismo *MTHFR* 677C→T, a un modelo de *cultura/gen*. En la **Figura 17**, se presenta una relación entre los tipos de sociedades humanas a través de la historia, los cuales he dividido en tres grupos (cazadores-recolectores, domesticadores, industrialización-globalización), posteriormente, se presentan los eventos culturales que promovieron los cambios en los componentes de la dieta,

luego la disponibilidad de folato y ácido fólico en cada momento histórico y por último se grafica el comportamiento hipotético de la frecuencia del polimorfismo *MTHFR* 677C→T a través del tiempo como consecuencia de las presiones de selección resultado de los cambios ambientales y culturales de cada tipo de sociedad por el que ha pasado la especie humana. Además, presentamos las fluctuaciones de la frecuencia del polimorfismo *MTHFR* 677C→T a través de la historia cultural humana. Partiendo de estos postulados nuestro modelo cultura/gen se ajusta a los resultados aquí presentados resultados y establece la fortificación y suplementación con ácido fólico como la posible presión de selección en nuestro modelo de ventaja del heterocigoto favoreciendo el incremento de la frecuencia del polimorfismo *MTHFR* 677C→T en nuestra población.

## **6.8 Consideraciones finales**

La selección a favor del heterocigoto, es un evento poco común en la especie humana. Pocos eventos han sido comprobados y suelen presentarse cuando el genotipo heterocigoto confiere alguna capacidad de protección contra agentes infecciosos, por ejemplo mutaciones del gen *G6PD* asociadas con fenotipos de hemólisis consecuencia de estrés oxidativo producido por la exposición a algunos agentes ambientales, donde los individuos heterocigotos presentan fenotipos leves de deficiencia de *G6PD* y protección contra infección por *Plasmodium falciparum*(140,141). Otros ejemplos en humanos son los relacionados con el gen *HbS*, el cual se relaciona con la enfermedad de células falciformes y en estado heterocigoto confiere protección contra malaria, al igual que algunos genotipos de

talasemias(142). Estos fenómenos de ventaja del heterocigoto fomentan la persistencia de variantes deletéreas en la salud humana que son adaptativas entre ciertas poblaciones humanas.

Al igual que en los ejemplo anteriores, la ventaja a favor del heterocigoto que es propuesta en este trabajo para el polimorfismo *MTHFR* 677C→T promueve la persistencia del alelo 677T el cual se ha asociado con múltiples condiciones clínicas deletéreas en la especie humana ([Tabla 3](#)). Sin embargo, muchas de estas enfermedades se presenta en la población adulta (en edades post-reproductivas), por lo tanto, no hay una reducción marcada del *fitness* de los portadores, lo que hace que este polimorfismo se presente en la población como casi-neutral y permitiendo a esta fuerza de selección (el ácido fólico) actuar únicamente sobre los embriones y el mantenimiento del embarazo, lo que favorece la persistencia del alelo 677T, aunque se espera que en una proporción más baja que la del alelo 677C.

Otras hipótesis han sido formuladas en la comunidad científica para explicar los cambios poblacionales del polimorfismo *MTHFR* 677C→T. Uno es el complejo regulatorio epistático explicado por la relación sinérgica del genotipo 677TT y otros SNPs que pueden regular los niveles tóxicos de homocisteína de manera positiva, los cuales pueden encontrarse en desequilibrio de ligamiento y de esta manera se está seleccionando el haplotipo(128).

Por otra parte, una hipótesis de protección contra agentes infecciosos ha surgido recientemente con los resultados de ciertos estudios genético-poblacionales y experimentales, por ejemplo, protección contra la infección por virus de hepatitis B

observada en una población africana(143), reducción en la replicación del citomegalovirus (CMV) en modelos murinos(144) y, recientemente, la protección contra la infección por *Plasmodium falciparum*(145). Sin embargo, estas hipótesis no han sido comprobadas en la especie humana y no se ajustan a los cambios temporales que si pueden ser explicados por nuestro modelo cultura/gen.

## 7 Conclusiones

Este es el estudio de análisis del polimorfismo *MTHFR* 677C→T realizado en Colombia con el número poblacional más grande hasta la fecha, lo que lo convierte en un punto de referencia para posteriores estudios poblacionales, tanto en el territorio nacional como a nivel internacional. Además, es el primer estudio en Colombia y en el mundo que evalúa el polimorfismo *MTHFR* 677C→T en población infantil. Por lo tanto, esta población no es comparable con otras previamente reportadas. El análisis de genotipos y frecuencias alélicas en este trabajo encuentra diferencias significativas entre la población de adultos y la de niños, lo que sugiere que estas dos poblaciones se comportan genéticamente de maneras diferentes, lo que al parecer está influenciado por historias demográficas diferentes, comportamientos nutricionales y eventos biológicos de selección.

En el análisis de diversidad genética se observó estructuración del grupo de estudio de adultos, lo que es explicado por el aislamiento geográfico y cultural de la región Andina y la Orinoquia antes de la década de 1970. Asimismo, el desarrollo en términos viales entre estas dos regiones ha generado procesos migratorios que han homogenizado las poblaciones haciendo que estas se comporten como una sola, fenómeno que se observa en los niños.

Los cambios en las frecuencias del polimorfismo *MTHFR* 677C→T sugieren un evento selectivo sobre la población de niños. La selección es una de las principales fuerzas que llevan a evolución y suele requerir de largos periodos de

tiempo para actuar. Como se puede observar en este trabajo los cambios culturales en este caso nutricionales y el sometimiento de la población a influjos altos de ácido fólico pueden estar favoreciendo la selección en corto tiempo. En nuestro caso, la selección se produce por ventaja del heterocigoto, lo que se ajusta con el incremento en la frecuencia del alelo 677T, sin embargo, la intensidad de esta presión de selección no ha sido suficiente para fijar este alelo en ninguna población, lo que explica por qué se han manteniendo los dos alelos (677C y 677T) en la especie humana.

La presencia del alelo 677T no presenta una ventaja selectiva sobre el individuo que lo porta en homocigosis, en cambio, puede generar susceptibilidad a múltiples enfermedades crónico-degenerativas en el adulto, por lo tanto, el mantenimiento de este alelo en la población podría aumentar el riesgo de enfermedades de la vida adulta en las generaciones futuras.

La ventaja selectiva del ácido fólico probablemente está ejerciéndose durante el periodo embrionario lo que favorece el desarrollo normal y el mantenimiento del embarazo hasta el término, en especial a los individuos heterocigotos.

En este trabajo proponemos por primera vez una perspectiva novedosa que soporta la hipótesis gen-nutriente propuesta por Lucock(131) bajo un modelo de coevolución cultura/gen, el cual es explicado por las fluctuaciones en la disponibilidad del folato a través de la historia de nuestra especie, lo que concuerda con los cambios recientes observados en la frecuencia del polimorfismo *MTHFR* 677C→T.

Finalmente, es interesante la relación de los datos genéticos con los fenómenos sociales y culturales que suceden en una región o un país, lo que reafirma el rol de la genética de poblaciones en la reconstrucción de la historia de la población colombiana.

## 8 Perspectivas

Aunque nuestros análisis se han realizado de manera exhaustiva es necesario el estudio de otros marcadores para descartar otros eventos biológicos que pueden estar afectando a los adultos tales como la endogamia.

Además, es importante realizar un estudio de haplotipos para corroborar el posible evento de selección al que puede estar sometido el alelo 677T y no se descarta el análisis de secuencias para llevar a cabo diferentes tests genéticos poblacionales de selección que pueda soportar nuestros resultados.

Múltiples estudios serán necesarios para comprobar que el ácido fólico es la fuerza selectiva a la que está sometido el alelo 677T. Un *knockout* condicional del gen *MTHFR* y su exposición a ácido fólico serían el mejor modelo para explicar estos eventos selectivos. Sin embargo, las limitaciones económicas y en infraestructura de la investigación en nuestro país hacen aún lejana la posibilidad de desarrollar este tipo de estudios.

Es importante comprobar en poblaciones humanas la hipótesis de selección por protección contra agentes infecciosos que han sido propuestas para el polimorfismo *MTHFR* 677C→T en otras especies de mamíferos.

## 9 Referencias

1. Luccock M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab.* 2000; 71(1-2): 121–38.
2. Tamura T, Picciano MF. Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83(5): 993–1016.
3. Wills L. Treatment of “pernicious anaemia of pregnancy” and “tropical anaemia” with special reference to yeast extract as a curative agent. *Br Med J.* 1931;1059–64.
4. Mitchell HK, Snell EE, Williams RJ. Folic acid I. Concentration from spinach. *J Am Chemest Soc.* 1944;66:267–68.
5. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbols for folic acid and related compounds. Recommendations 1986. *Eur J Biochem.* 1987; 168(2): 251–3.
6. McNulty H, Pentieva K. Folate Bioavailability. Chap. 2. En: Bailey LB. Folate in health and disease. Second edition. CRC Press. 2010..
7. Varela-Moreiras G, Alonso Aperte E, Póo Prieto R. E4. La determinación “*in vitro/in vivo*” de la biodisponibilidad del ácido fólico contenido en la cerveza Centro de Información Cerveza y Salud. 2000. Disponible en [http://www.cervezaysalud.es/pdf\\_biblioteca/4\\_biodisponibilidad\\_acido\\_folico\\_en\\_cerveza\\_63.pdf](http://www.cervezaysalud.es/pdf_biblioteca/4_biodisponibilidad_acido_folico_en_cerveza_63.pdf) .
8. Hibbard BM. The role of folic acid in pregnancy; with particular reference to anaemia, abruption and abortion. *J Obstet Gynaecol Br Commonw.* 1964; 71: 529–42.
9. Milunsky A, Jick H, Jick SS, Bruell CL, MacLaughlin DS, Rothman KJ, et al. Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *JAMA.* 1989; 262(20): 2847–52.
10. Mulinare J, Cordero JF, Erickson JD, Berry RJ. Periconceptional use of multivitamins and the occurrence of neural tube defects. *JAMA.* 1988; 260: 3141–5.
11. MRC Vitamin Study Research Group: Prevention of neural tube defects; results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet.* 1991; 38: 131–7.

12. US Food and Drug Administration. Food Standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. Final rule. Fed Regist. 1996; 61(44): 8781–97.
13. Imbard A, Benoist J-F, Blom HJ. Neural tube defects, folic acid and methylation. Int J Environ Res Public Health. 2013; 10(9): 4352–89.
14. Burdige GC, Lillycrop KA. Folic acid supplementation in pregnancy: Are there devils in the detail? Br J Nutr. 2012; 108(11): 1924–30.
15. Decreto número 1944 de 1996. Ministerio de Salud. República de Colombia.
16. Resolución número 412 de 2000. Ministerio de Salud. República de Colombia
17. Blencowe H, Cousens S, Modell B, Lawn J. Folic acid to reduce neonatal mortality from neural tube disorders. Int J Epidemiol. 2010; 39 Suppl 1: i110–21
18. Kibar Z, Capra V, Gros P. Toward understanding the genetic basis of neural tube defects. Clin Genet. 2007; 71(4): 295–310.
19. Taruscio D, Carbone P, Granata O, Baldi F, Mantovani A. Folic acid and primary prevention of birth defects. Biofactors. 2011; 37(4): 280–4.
20. Daubner SC, Matthews RG. Purification and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from pig liver. J Biol Chem. 1982; 257(1): 140–5.
21. Goyette P, Summer JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. Nat Genet. 1994; 7: 195 – 200.
22. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). Mamm Genome. 1998; 9(8): 652–6.
23. Tran P, Leclerc D, Chan M, Pai A, Hiou-Tim F, Wu Q, et al. Multiple transcription start sites and alternative splicing in the methylenetetrahydrofolate reductase gene result in two enzyme isoforms. Mamm Genome..2002; 13(9): 483–92.
24. Gaughan DJ, Barboux S, Kluijtmans LA, Whitehead AS. The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic

- organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene*. 2000; 257(2): 279–89.
25. Homberger A, Linnebank M, Winter C, Willenbring H, Marquardt T, Harms E, et al. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet*. 2000; 8(9): 725–9.
  26. Martínez-Frías ML. The biochemical structure and function of methylenetetrahydrofolate reductase provide the rationale to interpret the epidemiological results on the risk for infants with Down syndrome. *Am J Med Genet A*. 2008; 146A(11): 1477–82.
  27. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995; 10(1): 111–3.
  28. Matthews RG. Methylenetetrahydrofolate reductase : a common human polymorphism and its biochemical implications. 2002; 2(1): 4–12.
  29. Matthew RG, Vanoni MA, Hainfeld JF, Wall J. Methylenetetrahydrofolate reductase. Evidence for spatially distinct subunit domains obtained by scanning transmission electron microscopy and limited proteolysis. *J Biol Chem*. 1984; 259(19): 11647–50.
  30. Güenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Biol*. 1999; 6(4): 359–65.
  31. Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(8): 5606-11
  32. Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(26): 14853–8.
  33. Sheppard CA, Trimmer EE, Matthews RG. Purification and properties of (MetF) from *Escherichia coli* purification and properties of NADH-dependent (MetF) from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1999; 181(3): 718–725.

34. Stover PJ. One-carbon metabolism-genome interactions in folate-associated pathologies. *J Nutr.* 2009; 139(12): 2402-5.
35. Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, Lussier-Cacan S, et al. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(5): 433–43.
36. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci.* 2001; 22(4): 195–201.
37. Kluijtmans LA, Wendel U, Stevens EM, van den Heuvel LP, Trijbels FJ, Blom HJ. Identification of four novel mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Eur J Hum Genet.* 1998; 6(3): 257–65.
38. Sibani S, Leclerc D, Weisberg IS, O’Ferrall E, Watkins D, Artigas C, et al. Characterization of mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency reveals an FAD-responsive mutation. *Hum Mutat.* 2003; 21(5): 509–20.
39. Goyette P, Christensen B, Rosenblatt DS, Rozen R. Severe and mild mutations in *cis* for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, and description of five novel mutations in MTHFR. *Am J Hum Genet.* 1996; 59(6): 1268–75.
40. Leclerc D, Sibani S, Rozen R. Molecular biology of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and overview of mutations/polymorphisms. En: *Madame Curie Bioscience Database.* Austin (TX): Landes Bioscience; 2000.
41. Goyette P, Frosst P, Rosenblatt DS, Rozen R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1995; 56(5): 1052–9.
42. Rosenblatt DS, Fenton WA. . Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. En: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Metabolic Disease*, 8th edn. (ed. by C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly & D. Valle), (Co-ed. by B. Childs, K.W. Kinzler & B. Vogelstein), pp. 3897–3933. McGraw-Hill, New York. 2001/
43. Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, van Oost BA, et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a

- common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet.* 1996; 58(1): 35–41.44. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom a G, Chen Z, Curtis Ellison R, et al. The 1298A-->C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): *in vitro* expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis.* 2001; 156(2): 409–15.
45. Castro R, Rivera I, Ravasco P, Jakobs C, Blom HJ, Camilo ME, de Almeida IT. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase 677C->T and 1298A->C mutations are genetic determinants of elevated homocysteine. *QJM.* 2003 96(4): 297–303.
  46. Mayor-Olea A, Callejón G, Palomares AR, Jiménez AJ, Gaitán MJ, Rodríguez A, et al. Human genetic selection on the MTHFR 677C>T polymorphism. *BMC Med Genet.* 2008; 9: 104.
  47. Linnebank M, Homberger A, Nowak-Göttl U, Marquardt T, Harms E, Koch HG. Linkage disequilibrium of the common mutations 677C > T and 1298A > C of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene as proven by the novel polymorphisms 129C > T, 1068C > T. *Eur J Pediatr.* 2000; 159(6): 472–3.
  48. Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, Opare-Sem O, Zivelin A, Geffen E, et al. The frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, Japanese, and Africans. *Am J Hum Genet.* 2002; 70(3): 758–62.
  49. Viel A, Dall’Agnese L, Simone F, Canzonieri V, Capozzi E, Visentin MC, et al. Loss of heterozygosity at the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase locus in human ovarian carcinomas. *Br J Cancer.* 1997; 75(8): 1105–10
  50. 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(3): 169–72.
  51. Rady PL, Szucs S, Grady J, Hudnall SD, Kellner LH, Nitowsky H, et al. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas ; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. *Am J Med Genet.* 2002; 107(2): 162-8.
  52. Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet.* 1988; 43(4): 414–21

53. Leclerc D, Rozen R. Génétique moléculaire de MTHFR. Les polymorphismes ne sont pas tous bénins. *Med & Sci*. 2007; 3 (23): 297–302.
54. Botto LD, Yang Q. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2000; 151(9): 862–77.
55. Brattström L, Wilcken DEL, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation*. 1998; 98(23): 2520–6.0
56. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ*. 2002; 325(7374): 1202.
57. Hubner RA, Muir KR, Liu J-F, Sellick GS, Logan RFA, Grainge M, et al. Folate metabolism polymorphisms influence risk of colorectal adenoma recurrence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006; 15(9): 1607–13.
58. Huang Y, Han S, Li Y, Mao Y, Xie Y. Different roles of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms in colorectal adenoma and colorectal cancer: a meta-analysis. *J Hum Genet*. 2007; 52(1): 73–85.
59. Lewis SJ, Ebrahim S, Davey Smith G. Meta-analysis of MTHFR 677C->T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate? *BMJ*. 2005; 331(7524): 1053.
60. Zintzaras E. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms with genetic susceptibility to gastric cancer: a meta-analysis. *J Hum Genet*. 2006; 51(7): 618–24.
61. Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. Folate intake, MTHFR polymorphisms, and risk of esophageal, gastric, and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology*. 2006; 131(4): 1271–83.
62. Gilbody S, Lewis S, Lightfoot T. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genetic polymorphisms and psychiatric disorders: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2007; 165(1): 1–13.
63. Lewis SJ, Zammit S, Gunnell D, Smith GD. A meta-analysis of the MTHFR C677T polymorphism and schizophrenia risk. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005; 135B(1): 2–4.

64. Kim RJ, Becker RC. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies. *Am Heart J.* 2003; 146(6): 948–57
65. Haywood S, Liesner R, Pindora S, Ganesan V. Thrombophilia and first arterial ischaemic stroke: a systematic review. *Arch Dis Child.* 2005; 90(4): 402–5.
66. Wu AH, Tsongalis GJ. Correlation of polymorphisms to coagulation and biochemical risk factors for cardiovascular diseases. *Am J Cardiol.* 2001; 87(12): 1361–6.
67. Zintzaras E, Chatzoulis DZ, Karabatsas CH, Stefanidis I. The relationship between C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and retinopathy in type 2 diabetes: a meta-analysis. *J Hum Genet.* 2005; 50(6): 267–75.
68. Cahill MT, Stinnett SS, Fekrat S. Meta-analysis of plasma homocysteine, serum folate, serum vitamin B12, and thermolabile MTHFR genotype as risk factors for retinal vascular occlusive disease. *Am J Ophthalmol.* 2003; 136(6): 1136–50.
69. Den Heijer M, Lewington S, Clarke R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost.* 2005; 3(2): 292–9.
70. Jang MJ, Jeon YJ, Choi W-I, Choi YS, Kim SY, Chong SY, et al. The 677C>T mutation of the MTHFR gene increases the risk of venous thromboembolism in Koreans and a meta-analysis from Asian population. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2013; 19(3): 309–14.
71. Cao Y, Xu J, Zhang Z, Huang X, Zhang A, Wang J, et al. Association study between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Gene.* 2013; 514(2): 105–11.
72. Lucock M, Yates Z. Folic acid - vitamin and panacea or genetic time bomb? *Nat Rev Genet.* 2005; 6(3): 235–40.
73. Thögersen AM, Nilsson TK, Dahlen G, Jansson JH, Boman K, Huhtasaari F, et al. Homozygosity for the C677-->T mutation of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and total plasma homocyst(e) ine are not associated with greater than normal risk of a first myocardial infarction in northern Sweden. *Coron Artery Dis.* 2001; 12(2): 85–90.

74. Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Redlund M, et al. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide.. *J Med Genet.* 2003; 40(8): 619-25.
75. Nelis M, Esko T, Mägi R, Zimprich F, Zimprich A, Toncheva D, et al. Genetic structure of Europeans: a view from the North-East. *PLoS One.* 2009; 4(5): e5472.
76. Zak I, Sarecka-Hujar B, Kopyta I, Emich-Widera E, Marszal E, Wendorff J, et al. The T allele of the 677C>T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an increased risk of ischemic stroke in Polish children. *J Child Neurol.* 2009; 24(10): 1262–7.
77. Prasmusinto D, Skrablin S, Hofstaetter C, Fimmers R, van der Ven K. The methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-->T polymorphism and preeclampsia in two populations. *Obstet Gynecol.* 2002; 99(6): 1085–92.
78. Matevska N, Josifovski T, Kapedanovska A, Sterjev Z, Serafimoska Z, Panovski M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and risk of colorectal cancer in the Macedonian population.: *BJMG* 2008; 11(2): 17–24.
79. Pepe G, Camacho Vanegas O, Giusti B, Brunelli T, Marcucci R, Attanasio M, et al. Heterogeneity in world distribution of the thermolabile C677T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet.* 1998; 63(3): 917–20.
80. Chillemi R, Angius A, Persico I, Sassu A, Prodi DA, Musumeci S. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) from Mediterranean to Sub-Saharan areas. *Online Journal of Biological Sciences* 2005; 6(1): 28–34.
81. Li JZ, Absher DM, Tang H, Southwick AM, Casto AM, Ramachandran S, et al. Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science.* 2008; 319(5866): 1100–4.
82. Hambaba L, Abdessemed S, Yahia M, Laroui S, Rouabah F. Relation entre hyperhomocystéinémie et polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase dans la population algérienne saine. *Ann Biol Clin.* 2008; 66(6): 637–41.
83. Rouissi K, Ouerhani S, Oliveira E, Marrakchi R, Cherni L, Ben Othman F, et al. Polymorphisms in one-carbon metabolism pathway genes and risk for bladder cancer in a Tunisian population. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009; 195(1): 43–53.

84. Bennouar N, Allami A, Azeddoug H, Bendris A, Laraqui A, El Jaffali A, et al. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and homocysteine are risk factors for coronary artery disease in Moroccan population. *J Biomed Biotechnol.* 2007; 2007(1): 80687
85. Owusu M, Thomas J, Wiredu E, Pufulete M. Folate status of Ghanaian populations in London and Accra. *Br J Nutr.* 2010; 103(3): 437–44.
86. Guéant-Rodríguez R, Guéant J, Debard R, Thitton S, Hong XL, Bronowicki J, et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83(3): 701–7.
87. Carr DF, Whiteley G, Alfirevic A, Pirmohamed M, FoIATED study team.. Investigation of inter-individual variability of the one-carbon folate pathway: a bioinformatic and genetic review. *Pharmacogenomics J.* 2009; 9(5): 291–305.
88. Kelly TLJ, Neaga OR, Schwahn BC, Rozen R, Trasler JM. Infertility in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)-deficient male mice is partially alleviated by lifetime dietary betaine supplementation. *Biol Reprod.* 2005; 72(3): 667–77.
89. Chan A, Ortiz D, Rogers E, Shea TB. Supplementation with apple juice can compensate for folate deficiency in a mouse model deficient in methylene tetra hydrofoate reductase activity. *J Nutr Health Aging.* 2011; 15(3): 221–5.
90. Lucock M, Yates Z. Synergy between 677 TT MTHFR genotype and related folate SNPs regulates homocysteine level. *Nutr Res.* 2006; 26(4): 180–5.
91. Lucock M, Yates Z, Ng X, Veysey M, Blades B, Travers C, et al. Preliminary evidence for genetic selection of 677T-MTHFR by natural annual cycle of folate abundance. *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 2008; 1(1-2): 24–9.
92. Lucock M, Yates Z. Folic acid fortification: a double-edged sword. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2009; 12(6): 555–64.
93. Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet.* 2000; 67(4): 986–90.
94. Lucock M, Yates Z, Glanville T, Leeming R, Simpson N, Daskalakis I. A critical role for B-vitamin nutrition in human developmental and evolutionary biology. *Nutr Res.* 2003; 23(11): 1463–75.

95. Muñoz-Moran E, Diéguez-Lucena JL, Fernández-Arcas N, Perán-Mesa S, Reyes-Engel A. Genetic selection and folate intake during pregnancy. *Lancet*. 1998; 352(9134): 1120-1.
96. González-Galofre ZN, Villegas V, Martínez-Agüero M. Determinación del polimorfismo C677T de metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en una población piloto de estudiantes de la Universidad del Rosario. *Revista Ciencias de la Salud* 2010; 8(1):7-21
97. Boyles AL, Hammock P, Speer MC. Candidate gene analysis in human neural tube defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2005; 135C(1): 9–23.
98. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(3): 1215.
99. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*. 2007; 23(10): 1289–91..
100. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007; 23(21): 2947–8.
101. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered*. 1995; 86(3): 248–249.
102. Rousset F, Raymond M. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics*. 1995; 140(4): 1413–9.
103. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 1992; 48(2): 361–72.
104. Goudet J. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *J Hered*. 1995; 86(6): 485–486. 105. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973; 70(12): 3321–3. 106. Queller DC, Goodnight KF. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*. 1989; 43(2): 258–75.
107. Li CC, Horvitz DG. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *Am J Hum Genet*. 1953; 5(2): 107–17.
108. Cheseer RK. Genetic variability within and among populations of the black-tailed prairie dogs. *Evolution*. 1983; 37(2): 320–31..

109. Wright S. The interpretation of population structure by F-Statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*. 1965; 19(3): 395–420.
110. Yeh FC, Boyle TJB. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian J Bot*. 1997; 129: 157..
111. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Res*. 2010; 10(3): 564–7..
112. 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(1): 40–4.
113. Golbahar J, Fathi Z, Tamadon M. Distribution of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (C667T) polymorphism and its association with red blood cell 5-methyltetrahydrofolate in the healthy Iranians. *Clin Nutr*. 2005; 24(1): 83–7.
114. Baum L, Wong KS, Ng HK, Tomlinson B, Rainer TH, Chan DKY, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene A222V polymorphism and risk of ischemic stroke. *Clin Chem Lab Med*. 2004; 42(12): 1370–6.
115. Stolzenberg-Solomon RZ, Qiao Y-L, Abnet CC, Ratnasinghe DL, Dawsey SM, Dong ZW, et al. Esophageal and gastric cardia cancer risk and folate- and vitamin B(12)-related polymorphisms in Linxian, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003; 12(11 Pt 1): 1222–6.
116. Ilhan N, Kucuksu 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(1): 125–30.
117. Fabris C, Toniutto P, Falletti E, Fontanini E, Cussigh A, Bitetto D, et al. 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(1): 102–7.
118. Li D, Ahmed M, Li Y, Jiao L, Chou T, Wolff RA, et al. 5,10 -methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and the risk of pancreatic cancer and the risk of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14(6): 1470–6.
119. Lacasaña-Navarro M, Galván-Portillo M, Chen J, López-Cervantes M, López-Carrillo L. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T

- polymorphism and gastric cancer susceptibility in Mexico. *Eur J Cancer*. 2006; 42(4): 528–33.
120. 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(2): 133–6.
  121. Camacho Vanegas O, Giusti B, Restrepo Fernandez CM, Abbate R, Pepe G. Frequency of factor V (FV) Leiden and C677T methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations in Colombians. *Thromb and Haemost*. 1998; 79(4): 883-4..
  122. Bermúdez M, Briceño I, Gill F, Bernal J. Homocisteína y polimorfismos de cistationina  $\beta$  sintasa y metilentetrahidrofolato reductasa en población sana de Colombia. *Colomb Med*. 2006; 37(1): 46–52.
  123. Torres JD, Cardona H, Alvarez L, Cardona-Maya W, Castañeda SA, Quintero-Rivera F, et al. Inherited thrombophilia is associated with deep vein thrombosis in a Colombian population. *Am J Hematol*. 2006; 81(12):933–7.
  124. Cardona H, Gómez JG, Castañeda S, Gómez JM, Bedoya G, Álvarez L. relación entre los polimorfismos de la metilentetrahidrofolato-reductasa y los niveles de homocisteína en mujeres con pérdida gestacional recurrente: perspectiva desde la nutrigenética. *Nutr Hosp*. 2008; 23(3): 277–82.
  125. Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovsky LA, et al. Genetic structure of human populations. *Science*. 2002; 298(5602): 2381–5.
  126. DANE. Estimación de migración 1973 - 2005. Bogotá, D.C..2008. p. 35–37  
Disponible en:  
[http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/poblacion/migraciones/doc\\_est\\_mig\\_1973\\_2005.pdf](http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/poblacion/migraciones/doc_est_mig_1973_2005.pdf)
  127. Lewontin RC, Krakauer J. Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms. *Genetics*. 1973; 74(1): 175–95..
  128. Jennings BA, Willis GA, Skinner J, Relton CL. Genetic selection? A study of individual variation in the enzymes of folate metabolism. *BMC Med Genet*. 2010; 11: 18.

129. Wong WY, Merkus HM, Thomas CM, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP.. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility : a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril.* 2002; 77(3): 491-8..
130. Ebisch IM, van Heerde WL, Thomas CM, van der Put N, Wong WY, Steegers-Theunissen RP. C677T methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism interferes with the effects of folic acid and zinc sulfate on sperm concentration. *Fertil Steril.* 2003; 80(5): 1190–4
131. Lucock M. Synergy of genes and nutrients: the case of homocysteine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006; 9(6): 748–56.
132. Yates Z, Lucock M. Interaction between common folate polymorphisms and B-vitamin nutritional status modulates homocysteine and risk for a thrombotic event. *Mol Genet Metab.* 2003;;79(3):201–13.
133. Luca F, Perry GH, Di Rienzo A. Evolutionary adaptations to dietary changes. *Annu Rev Nutr.* 2010; 30: 291-314.;
134. Neel JV. Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? 1962. *Bull World Health Organ.* 1999; 77(8): 694–703.
135. Teaford MF, Ungar PS. Diet and the evolution of the earliest human ancestors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(25): 13506–11.
136. Leonard WR. Food for Thought. Dietary change was a driving force in human evolution. *Sci Am.* 2002; 287(6): 106–15.
137. Luca F, Bubba G, Basile M, Brdicka R, Michalodimitrakis E, Rickards O, et al. Multiple advantageous amino acid variants in the NAT2 gene in human populations. *PLoS One.* 2008; 3(9): e3136.
138. Halton TL, Willett WC, Liu S, Manson JE, Stampfer MJ, Hu FB. Potato and french fry consumption and risk of type 2 diabetes in women. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83(2): 284–90.
139. UNICEF. Flour Fortification Initiative (FFI). 2008. Disponible en: [http://www.unicef.org/eapro/fact\\_sheet\\_06.pdf](http://www.unicef.org/eapro/fact_sheet_06.pdf).
140. Cappadoro M, Giribaldi G, O'Brien E, Turrini F, Mannu F, Ulliers D, et al. Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum* may explain malaria protection in G6PD deficiency. *Blood.* 1998; 92(7): 2527–34.

141. Pouniotis DS, Proudfoot O, Minigo G, Hanley JL, Plebanski M. Malaria parasite interactions with the human host. *J Postgrad Med.* 2004; 50(1): 30–4.
142. Friedman MJ. Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978; 75(4): 1994–7.
143. Bronowicki J-P, Abdelmouttaleb I, Peyrin-Biroulet L, Venard V, Khiri H, Chabi N, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase 677T allele protects against persistent HBV infection in West Africa. *J Hepatol.* 2008; 48(4): 532–9.
144. Fodil-Cornu N, Kozij N, Wu Q, Rozen R, Vidal SM. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) deficiency enhances resistance against cytomegalovirus infection. *Genes Immun.* 2009; 10(7): 662–6.
145. Meadows DN, Pyzik M, Wu Q, Torre S, Gros P, Vidal SM, et al. Increased resistance to malaria in mice with methylenetetrahydrofolate reductase (Mthfr) deficiency suggests a mechanism for selection of the MTHFR 677C>T (c.665C>T) variant. *Hum Mutat.* 2014; 35(5): 594–600. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24616178>

## 10 Anexos

### 10.1 Anexo 1. Concentraciones de Folatos naturales y ácido fólico sintético

**Tabla 1.** Contenido de folato en los alimentos

<b>Grupo</b>	<b>Alimento</b>	<b>Folato (<math>\mu\text{g}</math>) x 100g</b>
<b>Cereales y derivados</b>	Avena	60
	Trigo	57
<b>verduras y hortalizas</b>	Brotes de soja	160
	Espinaca	140
	Escarola	127
	Acelga	90
	Col	90
	Puerro	127
	Coliflor	90
	Repollo	80
	Brocolí	90
<b>Legumbres</b>	Garbanzos	180
	Habas secas	78
<b>Frutas</b>	Aguacate	66
	Tomate	28
<b>Frutos secos</b>	Maní	110
	Almendra	96

	Nueces	47
<b>Lácteos y derivados</b>	Leche entera	4
	Queso	60
<b>Carnes</b>	Hígado de pollo	590
	Hígado de ternera	240
	Hígado de cordero	220
	Hígado de cerdo	110
<b>Huevos</b>	Yema	25

**Tabla 2.** Presentaciones disponibles comercialmente de ácido fólico

<b>Presentación</b>	<b>Concentración</b>
<b>Tabletas/Comprimidos</b>	400 µg, 1mg, 4mg, 5mg
<b>Ampolla inyectable</b>	1mg/ml (ampolla x 1ml)

## 10.2 Anexo 2. Consentimientos informados.



Universidad del Rosario  
Facultad de Ciencias Naturales y  
Matemáticas  
Laboratorio de Biología Celular y  
Molecular

### Consentimiento informado para la toma de muestras biológicas con el objeto de realizar un trabajo de investigación

Estudio: Evaluación del polimorfismo C677T del gen de la metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en adultos y niños.

Usted está invitado (a) a participar en un estudio de investigación propuesto por la unidad de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad del Rosario, con la participación de los siguientes investigadores: *María Martínez Agüero, Magda Carolina Sánchez y Julián Camilo Riaño Moreno*

- a) Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes para la realización de este estudio:
- b) **LA PARTICIPACIÓN EN ESTE ESTUDIO ES TOTALMENTE VOLUNTARIA.**
- c) La naturaleza de esta investigación, su propósito, sus limitaciones, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información pertinente al resultado de este, le será explicada por el equipo de atención clínica.
- d) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestara sus preguntas.
- e) **CONFIDENCIALIDAD:** Los registros médicos de cada individuo permanecerán archivados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad del Rosario. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que solamente usted y el equipo de investigación tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento.

*Cualquier información adicional, usted puede obtenerla directamente con:  
María Martínez Agüero, Ph.D. Profesora Principal, teléfono 1-3474570 ext. 340*

1

- f) De acuerdo con lo establecido en la resolución 008430 de 1993, este estudio puede ser clasificado como una "investigación con riesgo mínimo". Se cumplirá con lo establecido por el Ministerio de Protección Social Colombiano, la Ley 84 de 1989 y la ley 2381 de 1993.

## **EXPLICACION DEL PROYECTO DE INVESTIGACION AL DONANTE**

**OBJETIVO:** El objetivo de este proyecto es evaluar el posible efecto de la suplementación con ácido fólico en la población colombiana a madres gestantes y a ciertos alimentos de consumo frecuente sobre las frecuencias de uno de los genes de la ruta del folato (Metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHFR)) mediante la técnica de reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) y la utilización de enzimas de Restricción. La frecuencia así obtenida será posteriormente comparada con la reportada para otras poblaciones.

**JUSTIFICACIÓN:** El ácido fólico es una vitamina del complejo B que se encuentra de manera natural en numerosos alimentos y puede suministrarse de manera complementaria en la dieta, especialmente al ser adicionada a los cereales o las harinas, o como suplemento nutricional. Esta vitamina ha mostrado ser de gran importancia durante la gestación ya que está involucrado en diferentes procesos como son el correcto desarrollo del tubo neural o la disminución de las pérdidas gestacionales recurrentes.

En Colombia se realiza la suplementación con ácido fólico a la harina de trigo desde hace más de 15 años (Decreto 1944 de 1996) y desde el año 2000 se realiza la suplementación a madres gestantes por parte del POS con hasta 4 mg/día de ácido fólico (Resolución 412 de 2000).

Diferentes estudios parecen indicar que esta suplementación genera cambios en las frecuencias de los alelos de los genes involucrados en la ruta de procesamiento del folato. En este estudio se compararán las frecuencias génicas y genéticas del polimorfismo de nucleótido simple (SNP) C667T del gen MTHFR en adultos y niños. Estos grupos serán: adultos mayores de 35 años y niños entre los 8 y los 10 años. La idea es evaluar los cambios en las frecuencias poblacionales de los alelos al comparar los dos grupos de edad.

**PROCEDIMIENTO:** Se realizará una entrevista clínica con usted y se tomará una muestra de aproximadamente 5 ml de sangre mediante punción en vena periférica. En caso que sea necesario repetir los exámenes, usted será notificado para tomar las muestras nuevamente. Estas muestras serán manejadas y analizadas únicamente por personas involucradas directamente en este proyecto y almacenada en nuestro laboratorio de biología celular y molecular.

**RIESGOS E INCOMODIDADES:** La participación en este estudio representa un riesgo mínimo para su salud e integridad y las molestias o efectos adversos estarán representadas exclusivamente por la toma de la muestra referida en el procedimiento, algunas molestias pueden ser: hematomas, enrojecimiento o sensibilidad al tacto en el lugar de donde se extrae la muestra, sin embargo, éstas serán transitorias.

*Cualquier información adicional, usted puede obtenerla directamente con:  
María Martínez Agüero, Ph.D. Profesora Principal, teléfono 1-3474570 ext. 340*

2

**BENEFICIOS ADICIONALES:** A partir de este estudio se generará una herramienta de utilidad para la identificación del polimorfismo ya mencionado. Adicionalmente, se evaluará el efecto que sobre las frecuencias genéticas en la población colombiana ha tenido la suplementación dietaria con ácido fólico.

**MANEJO DE RESULTADOS:** Los resultados que se obtengan de la investigación solo tendrán sentido si son tomados en forma conjunta y no tendrán validez en forma individual. Por lo tanto se entregarán en una charla informativa al final del estudio.

**AUTORIZACION:** La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podrá ayudar a entender el efecto de la suplementación ácido fólico en la dieta sobre las frecuencias de otros genes. Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto ellos como otros individuos portadores de este polimorfismo podrían beneficiarse. Por tanto, marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

- Autorizo el almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

Si  No

Sólo si su respuesta a la pregunta anterior es afirmativa, responda las siguientes preguntas

- En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales.

Si  No

- En estudios complementarios de diagnóstico para mí o para algún miembro de su familia.

Si  No

- En estudios de investigación específicos para las instituciones que participan en esta toma de muestra, siempre y cuando se conserven en anonimato mis datos de identificación:

Si  No

- En estudios de investigación para instituciones diferentes a las que participan en esta toma de muestra, siempre y cuando se conserven en anonimato mis datos de identificación:

Si  No

- En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserven en el anonimato mis datos de identificación.

Si  No

*Cualquier información adicional, usted puede obtenerla directamente con:  
María Martínez Agüero, Ph.D. Profesora Principal, teléfono 1-3474570 ext. 340*

3

**AUTORIZACION PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO:**

Habiendo sido enterado(a) del contenido del presente estudio, informado(a) que no tendré ningún beneficio directo en el mismo y que se han resuelto todas mis dudas acerca de la investigación **DOY MI CONSENTIMIENTO VOLUNTARIO PARA SER PARTE DE ESTE ESTUDIO**. Así mismo, declaro que se me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se le dará al material de muestra.

\_\_\_\_\_  
Firma Paciente

Nombre \_\_\_\_\_

Cédula \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Firma del testigo I

Nombre \_\_\_\_\_

Identificación \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Firma Testigo II

Nombre \_\_\_\_\_

Identificación \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Firma del Investigador

Nombre \_\_\_\_\_

Villavicencio, \_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ del año \_\_\_\_\_.

En caso de cualquier inquietud, sugerencia o deseo de salir del estudio usted se puede comunicar directamente con:

**María Martínez Agüero,**  
Cra. 24 No. 63C-69

Investigadora principal  
Teléfono 1-3474570 Ext: 340 Bogotá, D.C.

**Dr. Alberto Vélez,**  
Cra. 24 No. 63C-69

Presidente del Comité de Ética en Investigación  
Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud  
Teléfono 1-3474570 Ext: 380-249 Bogotá, D.C.

*Cualquier información adicional, usted puede obtenerla directamente con:  
María Martínez Agüero, Ph.D. Profesora Principal, teléfono 1-3474570 ext. 340*

4



Universidad del  
Rosario

Facultad de Ciencias Naturales y  
Matemáticas  
Laboratorio de Biología Celular y  
Molecular

**Consentimiento informado para la toma de muestras biológicas con el objeto de realizar  
un trabajo de investigación**

Estudio: Evaluación del polimorfismo C677T del gen de la metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en adultos y niños.

Su hijo(a) está invitado(a) a participar en un estudio de investigación propuesto por la unidad de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad del Rosario, con la participación de los siguientes investigadores: *María Martínez Agüero, Magda Carolina Sánchez y Julián Camilo Riaño Moreno*

- a) Es muy importante que ustedes lean y entiendan ciertos puntos importantes para la realización de este estudio:
- b) **LA PARTICIPACIÓN EN ESTE ESTUDIO ES TOTALMENTE VOLUNTARIA.**
- c) La naturaleza de esta investigación, su propósito, sus limitaciones, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información pertinente al resultado de éste, le será explicada por el equipo de atención clínica.
- d) Si tienen algún interrogante sobre el estudio por favor no duden en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, les contestará sus preguntas.
- e) **CONFIDENCIALIDAD:** Los registros médicos de cada individuo permanecerán archivados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad del Rosario. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que ustedes nos han dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que solamente ustedes y el equipo de investigación tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento.

*Cualquier información adicional, usted puede obtenerla directamente con:  
María Martínez Agüero, Ph.D. Profesora Principal, teléfono 1-3474570 ext. 340*

5

- f) De acuerdo con lo establecido en la resolución 008430 de 1993, este estudio puede ser clasificado como una “investigación con riesgo mínimo”. Se cumplirá con lo establecido por el Ministerio de Protección Social Colombiano, la Ley 84 de 1989 y la ley 2381 de 1993.

#### **EXPLICACION DEL PROYECTO DE INVESTIGACION AL DONANTE**

**OBJETIVO:** El objetivo de este proyecto es evaluar el posible efecto de la suplementación con ácido fólico en la población colombiana a madres gestantes y a ciertos alimentos de consumo frecuente sobre las frecuencias de uno de los genes de la ruta del folato (Metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR)) mediante la técnica de reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) y la utilización de enzimas de Restricción. La frecuencia así obtenida será posteriormente comparada con la reportada para otras poblaciones.

**JUSTIFICACIÓN:** El ácido fólico es una vitamina del complejo B que se encuentra de manera natural en numerosos alimentos y puede suministrarse de manera complementaria en la dieta, especialmente al ser adicionada a los cereales o las harinas, o como suplemento nutricional. Esta vitamina ha mostrado ser de gran importancia durante la gestación ya que está involucrado en diferentes procesos como son el correcto desarrollo del tubo neural o la disminución de las pérdidas gestacionales recurrentes.

En Colombia se realiza la suplementación con ácido fólico a la harina de trigo desde hace más de 15 años (Decreto 1944 de 1996) y desde el año 2000 se realiza la suplementación a madres gestantes por parte del POS con hasta 4 mg/día de ácido fólico (Resolución 412 de 2000).

Diferentes estudios parecen indicar que esta suplementación genera cambios en las frecuencias de los alelos de los genes involucrados en la ruta de procesamiento del folato. En este estudio se compararán las frecuencias génicas y genéticas del polimorfismo de nucleótido simple (SNP) C667T del gen MTHFR en adultos y niños. Estos grupos serán: adultos mayores de 35 años y niños entre los 8 y los 10 años. La idea es evaluar los cambios en las frecuencias poblacionales de los alelos al comparar los tres grupos de edad.

**PROCEDIMIENTO:** Se realizará una entrevista clínica con los padres o tutores del niño(a). El niño debe, a su vez, autorizar su participación en este estudio. La muestra se tomará de células epiteliales de la boca mediante el uso de un hisopo, el cual se introduce en la boca y se toma muestra de carrillos. En caso de que sea necesario repetir exámenes, los padres o tutores del niño(a) serán notificados para tomar las muestras nuevamente. Estas muestras serán manejadas y analizadas únicamente por personas involucradas directamente en este proyecto y almacenadas en nuestro laboratorio de biología celular y molecular.

**RIESGOS E INCOMODIDADES:** La participación en este estudio representa un riesgo mínimo para su salud e integridad y las molestias o efectos adversos estarán representadas exclusivamente por la toma

*Cualquier información adicional, usted puede obtenerla directamente con:  
María Martínez Agüero, Ph.D. Profesora Principal, teléfono 1-3474570 ext. 340*

6

de la muestra referida en el procedimiento, algunas molestias pueden ser: enrojecimiento de carrillos en el lugar de toma de muestra.

**BENEFICIOS ADICIONALES:** A partir de este estudio se generará una herramienta de utilidad para la identificación del polimorfismo ya mencionado. Adicionalmente, se evaluará el efecto que sobre las frecuencias genéticas en la población colombiana ha tenido la suplementación dietaria con ácido fólico.

**MANEJO DE RESULTADOS:** Los resultados que se obtengan de la investigación sólo tendrán sentido si son tomados en forma conjunta y no tendrán validez en forma individual. Por lo tanto se entregarán en una charla informativa al final del estudio a padres y estudiantes.

**AUTORIZACION:** La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podrá ayudar a entender el efecto de la suplementación ácido fólico en la dieta sobre las frecuencias de otros genes de la misma ruta. Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se benefician directamente de estos estudios, pero tanto ellos como otros individuos portadores de este polimorfismo podrían beneficiarse. Por tanto, marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

- Autorizo el almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

Si  No

Sólo si su respuesta a la pregunta anterior es afirmativa, responda las siguientes preguntas

- En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales.

Si  No

- En estudios complementarios de diagnóstico para mí o para algún miembro de su familia.

Si  No

- En estudios de investigación específicos para las instituciones que participan en esta toma de muestra, siempre y cuando se conserven en anonimato mis datos de identificación:

Si  No

- En estudios de investigación para instituciones diferentes a las que participan en esta toma de muestra, siempre y cuando se conserven en anonimato mis datos de identificación:

Si  No

- En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserven en el anonimato mis datos de identificación.

Si  No

#### **AUTORIZACION PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO:**

Habiendo sido enterados del contenido del presente estudio, informados que no tendremos ningún beneficio directo en el mismo y que se han resuelto todas nuestras dudas acerca de la investigación

**DAMOS CONSENTIMIENTO VOLUNTARIO PARA QUE EL MENOR DE EDAD QUE**

*Cualquier información adicional, usted puede obtenerla directamente con:  
María Martínez Agüero, Ph.D. Profesora Principal, teléfono 1-3474570 ext. 340*

7

**REPRESENTAMOS SEA PARTE DE ESTE ESTUDIO.** Así mismo, declaramos que se nos ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se le dará al material de muestra.

Nombre del niño(a): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Firma Padre o Tutor legal

Nombre \_\_\_\_\_

Identificación \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Firma Madre o Tutor legal

Nombre \_\_\_\_\_

Identificación \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Firma testigo I

Nombre \_\_\_\_\_

Identificación \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Firma testigo II

Nombre \_\_\_\_\_

Identificación \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Firma del Investigador

Nombre \_\_\_\_\_

Villavicencio, \_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ del año \_\_\_\_\_.

En caso de cualquier inquietud, sugerencia o deseo de salir del estudio usted se puede comunicar directamente con:

**María Martínez Agüero,**  
Cra. 24 No. 63C-69

Investigadora principal  
Teléfono 1-3474570 Ext: 340 Bogotá, D.C.

**Dr. Alberto Vélez,**  
Cra. 24 No. 63C-69

Presidente del Comité de Ética en Investigación  
Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud  
Teléfono 1-3474570 Ext: 380-249 Bogotá, D.C.

*Cualquier información adicional, usted puede obtenerla directamente con:  
María Martínez Agüero, Ph.D. Profesora Principal, teléfono 1-3474570 ext. 340*

## 10.3 Anexo 3. Asentimiento informado



Universidad del Rosario  
Facultad de Ciencias Naturales y  
Matemáticas  
Laboratorio de Biología Celular y  
Molecular

**Asentimiento informado para la toma de muestras biológicas con el objeto de realizar un trabajo de investigación**

Estudio:

Evaluación del polimorfismo C677T del gen de la metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en adultos y niños

### **EXPLICACION DEL PROYECTO DE INVESTIGACION AL DONANTE DE CÉLULAS**

Las vitaminas son compuestos muy importantes en el crecimiento de los niños y los jóvenes y en el mantenimiento de la buena salud de los adultos. Estos compuestos son especialmente importantes cuando las mamás están gestando un nuevo bebé. Todo lo que las mamás comen lo recibe directamente el bebé. Para permitir que los bebés crezcan sanos y se desarrollen bien antes de nacer, es necesario que las mamás consuman alimentos que tengan muchas vitaminas, como las frutas y las verduras, y también que consuman algunas vitaminas en pastillas que su médico les recomiende.

El gobierno colombiano, muy preocupado por la buena salud de los niños, los jóvenes y los adultos, ha reglamentado que algunos alimentos sean enriquecidos con vitaminas y minerales. Algunos de esos alimentos son: los cereales, las harinas para hacer pasta, pan y pasteles, la leche, la sal, y muchos otros más.

Hace 15 años se dio la orden de añadir a las harinas una vitamina que se llama ácido fólico. Esa vitamina es muy importante para que el bebé crezca bien durante el embarazo y nazca sano. También hace 11 años se dio la orden de que las mamás que están esperando bebé tomen ácido fólico en pastillas.

El objetivo de este trabajo es ver cómo ha cambiado a lo largo del tiempo el gen que ayuda a que las células utilicen el ácido fólico en el cuerpo. Este cambio está relacionado con la cantidad de esa vitamina que las mamás consumieron durante el embarazo. Para esto vamos a comparar personas que nacieron hace muchos años (más de 40), con personas que nacieron hace algunos años (entre 18 y 20) y con personas como ustedes, que nacieron en el año 2001 y tienen 10 años o van a cumplirlos pronto.

*Cualquier información adicional, usted puede obtenerla directamente con:  
María Martínez Agüero, Ph.D. Profesora Principal, teléfono 3474570 ext. 340*

1

Para poder comparar los genes, necesitamos tener una muestra de ADN. El ADN está dentro de todas nuestras células y contiene la información básica que indica cómo nos vemos. En el ADN dice de qué color es nuestro pelo, si tenemos pecas, si nos hace daño la leche, y también nos cuenta cosas relacionadas con qué acostumbraba comer la gente antes de que nació.

Las células que vamos a analizar en este estudio provienen del interior de la boca. Para recolectarlas usaremos copitos de algodón que frotaremos con fuerza contra los cachetes, para que las células se queden pegadas al algodón y después podamos sacarles el ADN. Este ADN lo analizaremos en un laboratorio especializado y lo compararemos con el ADN de los jóvenes de 20 años y los adultos de más de 40 años, para saber cómo ha cambiado el gen que ayuda a las células a absorber el ácido fólico a través del tiempo, dependiendo de la cantidad de ácido fólico que la gente consume en las comidas.

Cuando comparemos los resultados de los tres grupos, podremos saber cuánto han funcionado las políticas del gobierno para el fortalecimiento con ácido fólico de las harinas y la suplementación con vitaminas a las mamás que están gestando un bebé. Esperamos que ustedes nos muestren que los planes del gobierno colombiano para fortalecer a mamás y bebés han sido exitosos.

#### **ASENTIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO:**

Yo, \_\_\_\_\_ con tarjeta de identidad número \_\_\_\_\_ y \_\_\_\_ años de edad, entendí lo que leí y quiero participar en el estudio **“Evaluación del polimorfismo C677T del gen de la metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en adultos y niños”**. Entiendo que la muestra de células que se analizará será tomada de células de la parte interna de mi boca.

*Cualquier información adicional, usted puede obtenerla directamente con:  
María Martínez Agüero, Ph.D. Profesora Principal, teléfono 3474570 ext. 340*

2

## 10.4 Anexo 4. Cereales que contiene 100% del valor diario (DV) de ácido fólico

Múltiples marcas comerciales ofrecen en sus cereales para el desayuno opciones que contienen las concentraciones diarias requeridas para mujeres embarazadas de ácido fólico por porción, entre estos encontramos lo siguientes:

- General Mills
  - Multi-Bran Chex®
  - Wheat Chex®
  - Fiber One cereal (caramel delight and honey clusters flavors)
- General Mills Total®
  - Raisin Bran
  - Whole Grain
  - Honey Almond Flax Plus Omega-3
- Kashi® Heart to Heart
  - Honey Toasted Oat
  - Warm Cinnamon Oat
  - Oat Flakes & Blueberry Clusters
- Kellogg's®
  - All-Bran® Bran Buds®
  - All-Bran® Complete® Wheat Flakes
  - All-Bran® Original
  - Low-Fat Granola without Raisins
  - Low-Fat Granola with Raisins
  - Product 19®
  - Mueslix
  - Smart Start® Strong Heart Antioxidants
  - Special K® Original
- Malt-O-Meal® Crispy Rice
- Malt-O-Meal® Mini Spooners
  - Frosted Mini Spooners
  - Blueberry Mini Spooners
  - Strawberry Cream Mini Spooners
- Quaker® Oats
  - Cap'n Crunch Original ®
  - Cap'n Crunch's Crunch Berries®
  - Cap'n Crunch's Peanut Butter Crunch®
  - Cap'n Crunch's OOPS! All Berries®
  - Cap'n Crunch's Chocolatey Crunch®

- Quaker Corn Bran Crunch
- Honey Graham OH!s®
- King Vitamin®
- Cinnamon Life®
- Maple & Brown Sugar Life®
- Oatmeal Squares Brown Sugar
- Oatmeal Squares Cinnamon
- Oatmeal Squares Golden Maple
- Quisp®
- Toasted Multigrain Crisps®

---

**"El universo no fue hecho a medida del hombre; tampoco le es hostil: es indiferente."**

*Carl Sagan*