

**BÚSQUEDA DE SELECCIÓN EN LOS POLIMORFISMOS 1298A>C (c.1286A>C)
(rs1801131) (p.E429A) Y 677C>T (c.665C>T) (rs1801133) (p.A222V) DEL GEN DE
LA METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (*MTHFR*) EN UNA
POBLACIÓN COLOMBIANA**

JESSICA JANNETHE LYONS MOLANO

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para obtener el título de



MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C

2018

Búsqueda de selección en los polimorfismos 1298A>C (c.1286A>C) (rs1801131) (p.E429A) y 677C>T (c.665C>T) (rs1801133) (p.A222V) del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) en una población colombiana

**BÚSQUEDA DE SELECCIÓN EN LOS POLIMORFISMOS 1298A>C (c.1286A>C)
(rs1801131) (p.E429A) Y 677C>T (c.665C>T) (rs1801133) (p.A222V) DEL GEN DE
LA METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (*MTHFR*) EN UNA
POBLACIÓN COLOMBIANA**

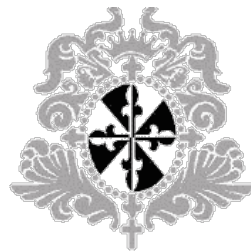
JESSICA JANNETHE LYONS MOLANO

DIRECTORA DE TESIS

MARIA MARTÍNEZ AGÜERO, Ph.D.

Facultad de Ciencias y Matemáticas

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO



UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C

2018

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución No 13 de julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velara porque no se publique nada contrario al dogma y la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo por buscar verdad y justicia”.

DEDICATORIA

A Dios,

Mi esposo, mis padres y mis maestros

Por su amor incondicional, apoyo y confianza

JJL

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ponerme en el camino, a mi padre⁺ que desde niña me inculcó el amor por la ciencia y la investigación, a mi esposo por ser mi todo y darme todos los instrumentos para que cumpliera mi sueño permaneciendo a mi lado durante todo el proceso. A mi mamá y mi abuela por su apoyo incondicional, por escucharme siempre e inculcarme la responsabilidad en todo lo que se hace en la vida, al grupo de Biología de la Universidad del Rosario por su maravillosa hospitalidad, por extender sus brazos para brindar conocimiento y sus enseñanzas implacables, especialmente a mi directora de tesis María Martínez Agüero, quien de manera paciente y estricta amplió mis conocimientos en biología molecular y contribuyó a la realización de este trabajo; a los docentes de la Maestría en Genética Humana, por la oportunidad de cumplir uno de mis sueños - el de ser científica-, a mis compañeros en general por estos años juntos, especialmente a mi amiga Rossi por estar en todos los momentos por más difíciles que fueran e impulsarme a seguir adelante siempre que se presentó algún obstáculo y a mi hermano por demostrarme que no existe obstáculo ni situación difícil para vencer un sueño!

A todos Gracias y no queda más que decir sino esto: ¡¡¡Lo logré!!!

Tabla de Contenido.

1	Introducción	3
2	Formulación del problema de investigación	5
2.1	Problema a investigar	5
2.2	Justificación	6
2.3	Hipótesis de Investigación	7
2.4	Pregunta de Investigación	7
3	Objetivos	8
3.1	Objetivo General	8
3.2	Objetivos Específicos	8
4	Marco teórico	9
4.1	MTHFR y Folato	9
4.1.1	Folato y Ácido Fólico	9
4.1.2	Absorción y metabolismo del folato	14
4.1.3	Aspectos Genéticos del gen MTHF	19
4.1.4	Proteína MTHFR	21
4.1.5	Síntesis de Ácidos Nucleicos y MTHFR	24
4.2	Genética de los polimorfismos del gen MTHFR	25
4.2.1	Genética del polimorfismo 677C>T del gen MTHFR	25
4.2.2	Genética del polimorfismo 1298A>C del gen MTHFR	26
4.2.3	MTHFR 677 C>T y 1298A>C y alteraciones en vías metabólicas	27
4.3	Gen MTHFR y salud humana	29
4.3.1	Aspectos de la salud humana relacionados con las variaciones en el gen MTHFR: generalidades respecto a susceptibilidad y protección ante patologías humanas.	29
4.3.2	Rasgo, enfermedad, o característica asociada a polimorfismos 677C>T y 1298A>C del gen MTHFR	31
4.4	Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)	39
4.4.1	Generalidades	39
4.4.2	Características del VIH	41
4.4.3	Genoma del VIH	44
4.4.4	Ciclo de vida del Virus de inmunodeficiencia humana, historia natural del VIH y resistencia natural a la infección	47
4.5	Detección de los polimorfismos MTHFR: kits usados en la investigación	53
5	Materiales y métodos	55
5.1	Diseño del estudio	55
5.2	Muestra	55
5.2.1	Tamaño de la muestra	55
5.2.2	Población del estudio	56
5.2.3	Criterios de inclusión	56
5.2.4	Criterios de Exclusión	56
5.3	Obtención y Recolección de Muestras	57
5.3.1	Extracción de ADN	57

5.3.2	Cuantificación de ADN	57
5.3.3	Amplificación por PCR en Tiempo Real (qPCR-RT).....	57
5.3.4	Genotipificación.....	58
5.4	Análisis Genético – poblacional	58
5.4.1	Descripción de los métodos /programas utilizados en el análisis de datos.....	59
6	Resultados	64
	A partir de la genotipificación de las muestras se analizaron los dos polimorfismos principales del gen <i>MTHFR</i> , 1298A>C y 677C>T, para las dos poblaciones de adultos colombianos con y sin infección por VIH, a continuación se presentan los resultados.	68
6.1	Resultados Genético Poblacionales: Equilibrio de Hardy Weinberg	69
6.1.1	Resultados de los análisis poblacionales por Locus	69
6.1.2	Resultados de los análisis por población	70
6.1.3	Resultados de análisis uniendo todos los locus, todas las poblaciones.....	72
6.2	Búsqueda de Equilibrio de ligamiento entre los dos polimorfismos del gen MTHFR analizados en población colombiana con y sin infección del VIH	73
7	Discusión	81
8	Conclusiones.....	90
9	Referencias	92
10	Anexos.....	110
11	Glosario	121

Índice de Tablas.

TABLA 1. CONTENIDO DE FOLATO EN LOS ALIMENTOS Y PRESENTACIÓN SINTÉTICA	10
TABLA 2. RECOMENDACIONES DE INGESTA DIARIA DEL FOLATO EN HUMANOS.	12
TABLA 3. ALGUNAS VARIACIONES EN LA SECUENCIA DEL GEN <i>MTHFR</i>	21
TABLA 4. FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DEL POLIMORFISMO 677C>T DEL GEN <i>MTHFR</i> (MAF 0.25) SEGÚN FASE 3 DEL PROYECTO 1000 GENOMAS.	26
TABLA 5. FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DEL POLIMORFISMO 1298A>C DEL GEN <i>MTHFR</i> SEGÚN FASE 3 DEL PROYECTO 1000 GENOMAS.	28
TABLA 6. GENOMA DEL VIH.	45
TABLA 7. GENES QUE CONFORMAN EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA VIH.	46
TABLA 8. ETAPAS DEL VIH PARA CAUSAR INFECCIÓN - CICLO VITAL DEL VIH.	49
TABLA 9. CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA INFECCIÓN POR VIH.	50
TABLA 10. POLIMORFISMOS 1298A>C Y 677C>T DEL GEN <i>MTHFR</i>	64
TABLA 11. POLIMORFISMOS 1298A>C Y 677C>T DEL GEN <i>MTHFR</i>	65
TABLA 12. POLIMORFISMOS 1298A>C Y 677C>T DEL GEN <i>MTHFR</i>	65
TABLA 13. FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS 677C>T Y 1298A>C DEL GEN <i>MTHFR</i> EN ADULTOS COLOMBIANOS SIN INFECCIÓN E INFECTADOS POR VIH.	66
TABLA 14. ANÁLISIS GENÉTICO-POBLACIONAL, FIS PARA EL 677C>T DEL GEN <i>MTHFR</i> EN POBLACIONES DE ADULTOS COLOMBIANOS CON Y SIN INFECCIÓN POR VIH.	69
TABLA 15. ANÁLISIS GENÉTICO-POBLACIONAL, FIS PARA EL 1298A>C DEL GEN <i>MTHFR</i> EN POBLACIONES DE ADULTOS COLOMBIANOS CON Y SIN INFECCIÓN POR VIH.	70
TABLA 16. ANÁLISIS GENÉTICO-POBLACIONAL, F_{IS} PARA ADULTOS INFECTADOS POR VIH.	70
TABLA 17. ANÁLISIS GENÉTICO POBLACIONAL, FIS PARA ADULTOS NO INFECTADOS POR VIH.	72
TABLA 18. ASOCIACIÓN DE LOS ALELOS DE LOS POLIMORFISMOS 677C>T Y 1298 A>T DEL GEN <i>MTHFR</i> EN UNA POBLACIÓN DE ADULTOS COLOMBIANOS SIN INFECCIÓN POR VIH.	74
TABLA 19. ASOCIACIÓN DE LOS ALELOS DE LOS POLIMORFISMOS 677C>T Y 1298 A>T DEL GEN <i>MTHFR</i> EN UNA POBLACIÓN DE ADULTOS COLOMBIANOS CON INFECCIÓN POR VIH.	74
TABLA 20. FRECUENCIAS DE LOS GAMETOS EN LA PRIMERA GENERACIÓN.	76
TABLA 21. FRECUENCIAS DE LOS DIFERENTES GAMETOS AL ALCANZAR EL EQUILIBRIO.	77
TABLA 22. GAMETOS POSTERIORES A APAREAMIENTO ALEATORIO ENTRE LAS PRIMERAS GENERACIONES CON SUS RESPECTIVAS FRECUENCIAS.	78

Índice de figuras.

FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS MOLÉCULAS. A. FOLATO B. ÁCIDO FÓLICO.	9
FIGURA 2. ACCIONES DEL FOLATO: MOLÉCULA PRINCIPAL EN LA BIOQUÍMICA DE LA VIDA.	11
FIGURA 3. FORTIFICACIÓN DE LAS HARINAS A NIVEL MUNDIAL.	13
FIGURA 4. METABOLISMO DEL FOLATO EN EL SER HUMANO.	16
FIGURA 5. A. METABOLISMO DE UN CARBONO. B. METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA.	17
FIGURA 6. VÍA FOLATO/METIONINA. ENZIMAS Y PROCESOS EN LOS QUE PARTICIPA EL FOLATO. (*)	18
FIGURA 7. GEN <i>MTHFR</i> - LOCALIZACIÓN CITOGÉNICA 1p36.3.	19
FIGURA 8. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA <i>MTHFR</i>	23
FIGURA 9. UBICACIÓN SNP 1298 A>C DEL GEN <i>MTHFR</i>	27
FIGURA 10. PREVALENCIA DE VIH A NIVEL MUNDIAL.	41
FIGURA 11. ESTRUCTURA DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH).	44
FIGURA 12. GENOMA DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH).	45
FIGURA 13. HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VIH.	49
FIGURA 14. RECEPTORES Y CO-RECEPTORES DEL VIH.	52
FIGURA 15. FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS 677C>T Y 1298A>C EN POBLACIONES COLOMBIANAS SIN Y CON INFECCIÓN POR VIH.	67
FIGURA 16. POLIMORFISMO DEL GEN <i>MTHFR</i> 1298A>C Y 677C>T.	68
FIGURA 17. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN <i>MTHFR</i>	68

Resumen

El folato no es sintetizado por el humano, por lo que debe consumirse de fuentes naturales, como folato, o sintéticas, como ácido fólico; su importancia radica en la participación en el mantenimiento de la homeostasis celular, procesos de regulación génica, síntesis de nucleótidos, replicación de ADN, producción de aminoácidos y regulación de los niveles de homocisteína. Para cumplir sus funciones, el folato es metabolizado en el ciclo del ácido fólico, en donde la participación de la enzima *MTHFR* es fundamental. Alteraciones en dicha enzima, como las causadas por los polimorfismos del gen *MTHFR*, se relacionan con susceptibilidades o resistencias para enfermedades relacionadas con procesos de replicación, como es el caso del VIH.

Los polimorfismos *c.677 C>T* y *c.1298 A>C MTHFR*, han sido estudiados en poblaciones con diferentes patologías asociadas al reciclaje de la metionina o a desórdenes en el ciclo celular, sin embargo, son pocos los datos genético-poblacionales para la población Colombiana, y están totalmente ausentes al analizar la relación entre los polimorfismos y la susceptibilidad a enfermedades como SIDA.

El estudio genético poblacional realizado de estos polimorfismos *MTHFR*, evaluó los genotipos de los participantes voluntarios, analizó frecuencias alélicas, selección a favor de heterocigotos, estructura poblacional y el posible ligamiento de los dos polimorfismos, a partir de la extracción de ADN y posterior genotipificación mediante PCR en tiempo real.

El estudio permitió establecer una tendencia de posible proceso de selección natural que favorece a heterocigotos con respecto al polimorfismo 677C>T; este resultado no es muy claro respecto al polimorfismo 1298A>C del gen *MTHFR*. Existe diferencia significativa entre las frecuencias alélicas en pacientes con VIH al compararlos con población sana, lo que se constituye en el punto de partida hacia estudios que podría demostrar que la presencia de los SNP, al evitar la replicación viral del VIH, retrasa la progresión de la enfermedad.

Palabras Clave: *metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), ciclo del folato, síntesis de ácidos nucleicos y folato, polimorfismo, asociación genética, virus de la inmunodeficiencia humana, replicación de VIH.*

Summary

Folate is not synthesized by humans, but can be found in natural and synthetic sources such as folic acid; its importance lies in the participation in the maintenance of cellular homeostasis, gene regulation processes, nucleotide synthesis, DNA replication, amino acid production and homocysteine regulation. In order to fulfill its functions, folate is metabolized in the folic acid cycle, where the participation of the MTHFR enzyme is fundamental. Alterations in this enzyme, such as those caused by the polymorphisms of the MTHFR gene, are related to susceptibility for important diseases and some weaken the process of viral replication avoiding the progression to diseases, this is the case of HIV.

The c.677 C> T and c.1298 A> C MTHFR polymorphisms, have been studied associated with different pathologies related with methionine recycling or cell cycle disorders, however, there are few population genetic data from the Colombian population, and are totally absent the analysis between polymorphism and susceptibility to diseases such as AIDS.

The population genetic study of these MTHFR polymorphisms, evaluated the genotypes of the volunteer participants, analyzed allelic frequencies, selection in favor of heterozygotes, population structure, and possible linkage of the two polymorphisms, using DNA extraction and real time PCR genotyping.

The study allowed to establish a possible process of natural selection that favors heterozygotes with respect to the 677C> T polymorphism; it is not very clear the result of the 1298A> C polymorphism of the MTHFR gene. There is a significant difference between allelic frequencies in patients with HIV compared with healthy ones, which is the start point towards studies that could demonstrate that the presence of some SNPs, by preventing viral replication of HIV, delays the progression of the disease.

Key words: *methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), folate cycle, synthesis of nucleic acids and folate, polymorphisms, genetic association, human immunodeficiency viruses (HIV), HIV replication.*

1 Introducción

El folato, también conocido como vitamina B9 hidrosoluble, no es sintetizado por el humano, sin embargo, se encuentra en algunos alimentos - fuente natural- y de manera sintética, en forma de ácido fólico, bien sea como suplementos vitamínicos o en la fortificación de las harinas. Su importancia radica, de manera esencial, en su participación durante el mantenimiento de la homeostasis celular, además de estar presente de forma activa en procesos de regulación génica, síntesis de purinas y pirimidinas, replicación de ADN, producción de aminoácidos y regulación de la homocisteína hacia metionina o cisteína.

Para cumplir sus funciones, estas moléculas, tanto ácido fólico como folato, son metabolizadas en el ciclo de su mismo nombre, en donde la proteína codificada por el gen metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*), cataliza la conversión de 5,10-metilenetetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, enzima principal del ciclo encargada de la remetilación de homocisteína a metionina, clave para llevar a cabo todos los procesos nombrados involucrados en el mantenimiento del equilibrio celular.

Variaciones en este gen, principalmente polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), causan alteraciones en la enzima *MTHFR* que modifican su actividad catalítica, influyendo en la susceptibilidad o resistencia a ciertas enfermedades importantes en el ser humano. Aunque se han identificado cerca de 24 SNP del gen *MTHFR*, los dos más importantes, 677 C>T y 1298 A>C, han demostrado debilitar la función enzimática y se ha comprobado la correlación clínico patológica con injurias en el desarrollo del sistema nervioso como lo son los defectos del tubo neural, en afecciones cardiovasculares como tromboembolismo y sus consecuencias clínicas representadas en accidentes cerebrovasculares, enfermedad coronaria y oclusión de arterias, enfermedades psiquiátricas, como esquizofrenia, trastornos obsesivo-compulsivos y depresión, alteraciones de la gestación principalmente perdidas recurrentes de embarazo, aneuploidías como trisomía 21 y síndrome de Turner, y procesos de carcinogénesis; en relación con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), estas variantes en el gen *MTHFR* son consideradas protectoras, puesto que al alterar la síntesis de nucleótidos, se disminuye la replicación del virus bloqueando de esta manera la progresión hacia enfermedad.

El alto impacto causado por campañas de fortificación de harinas y la suplementación con ácido fólico a mujeres durante periodos pre-concepcional y gestacional, con leyes de obligatoriedad a nivel mundial (en Colombia desde 1996) exceptuando pocos países, ha motivado a los investigadores a estudiar la persistencia de los polimorfismos *677C>T* y *1298A>C* del gen *MTHFR*, sobre todo en lo relacionado con protección o susceptibilidad de enfermedades en el humano. La presencia de dichos SNP en diferentes estudios y poblaciones, obliga a pensar en un posible proceso de selección que sea el causal de dichas variaciones en las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MTHFR* involucradas en las patologías humanas.

Este estudio, constituye, una de las primeras aproximaciones a las frecuencias de los polimorfismos *677C>T* y *1298A>C* del gen *MTHFR*, en población colombiana, corroborando diferencias alélicas y genotípicas de dichos polimorfismos entre población sana y una población que convive con el virus de la inmunodeficiencia humana; como es conocido, estudios de estos dos polimorfismos en conjunto, han logrado demostrar asociaciones con el riesgo a muchas de las enfermedades descritas anteriormente, sin embargo, el estudio con relación a virus que afectan el sistema inmune, como lo es VIH, solo se ha tenido en cuenta en los últimos años y no hay datos de estudios a nivel de Latinoamérica al respecto y en nuestro país no existe un estudio caso control que compare genotipos de los polimorfismos del gen *MTHFR* que lleve a relacionar la influencia protectora de estas variaciones con respecto a la enfermedad SIDA o la susceptibilidad para adquirir coinfecciones en pacientes con VIH positivo, razón por la cual el grupo de investigación decide realizar el estudio esperando encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos poblacionales que a futuro permita considerar la realización de pruebas genéticas para *MTHFR* que indiquen susceptibilidad o protección de esta infección crónica y de alta morbilidad causada por el virus de la inmunodeficiencia humana, para de esta manera brindar los tratamientos adecuados bajo la medicina personalizada.

2 Formulación del problema de investigación

2.1 Problema a investigar

Estudios a nivel poblacional de los polimorfismos *MTHFR* han venido realizándose con el fin de explicar su presencia relacionada con múltiples enfermedades, sin embargo en población colombiana no se encuentran estudios al respecto, y conociendo que la presencia de estos polimorfismos afectan las vías del folato alterando la función enzimática o disminuyendo procesos de síntesis de nucleótidos, conduciendo a fenotipos asociados con susceptibilidad para múltiples patologías, llevo a que a nivel mundial se planteara la fortificación y suplementación con folato, en nuestro país de manera obligatoria a partir de 1996⁽¹⁾⁽²⁾, y aun así continúan los SNP en un porcentaje alto de la población general.

La persistencia de estos polimorfismos a pesar de causar daño en la enzima principal del ciclo metabólico del folato, el cual es fundamental para la homeostasis celular, nos lleva a preguntarnos si puede deberse a procesos de selección natural que permitan que sigan presentándose como polimorfismos en alto porcentaje de personas, aún con alelo mutante de manera homocigota y a comprender aspectos de la biología y la evolución humana⁽³⁾, en donde la selección natural intenta proteger la célula, pudiendo ser esta la razón por la cual persisten los SNP sin disminuir las frecuencias de los alelos mutantes, e incluso pudiendo aumentar como una manera efectiva de evitar infecciones virales, lo que relacionaría a estos polimorfismos con un efecto protector y no solo con susceptibilidad a patologías.

Comparar población colombiana infectada por VIH, con población colombiana libre de la infección, nos permitió determinar las diferencias entre los genotipos y frecuencias alélicas, que por medio de selección natural persisten protegiendo de complicaciones o progresión del VIH, al bloquear la replicación viral, lo que no solo demuestra procesos de selección a favor de la continuidad de estas variantes, sino que justifica la realización de una prueba genética a futuro, en donde la metilentetrahidrofolato reductasa permita determinar el riesgo bien sea de susceptibilidad a enfermedades y al mismo tiempo la protección para el desarrollo, progresión o complicación de infecciones virales incluyendo la infección por VIH.

2.2 Justificación

El folato es de suma importancia para la homeostasis celular⁽⁴⁾, se encuentra en concentraciones diferentes, en los alimentos como folato y en suplementos como ácido fólico (ácido pteroilmonoglutámico) y es utilizado mediante procesos metabólicos en el ciclo de su mismo nombre - ciclo del ácido fólico-, en el cual una de las enzimas claves es la MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa), enzima que regula la incorporación del folato en el ciclo para su funcionamiento adecuado y participación en procesos de regulación de genes por metilación, síntesis de purinas y pirimidinas, y producción de aminoácidos, entre otras funciones que contribuyen al equilibrio celular, además de representar un papel importante en la regulación de la homocisteína transformándola en metionina o cisteína⁽⁵⁾.

Cualquier alteración a nivel de esta enzima, involucra varias vías metabólicas importantes, relacionadas unas con otras, produciendo susceptibilidad al humano ante diferentes injurias, incluso asociadas a procesos de carcinogénesis, o protegiendo contra infecciones virales, incluidas las causadas por virus altamente morbilidad, como el virus de la inmunodeficiencia humana, al alterar la síntesis de ácidos nucleicos que conduce a inhibición de la replicación viral⁽⁶⁾.

En la literatura, se encuentran gran cantidad de datos acerca de variaciones de un solo nucleótido (SNP) en el gen que codifica para la enzima MTHFR y su relación a patologías humanas en diferentes poblaciones. De todos los polimorfismos del gen *MTHFR*, los dos más estudiados son los que se tienen en cuenta en esta investigación, el 677 C>T, y 1298 A>C y aunque se ha logrado corroborar la asociación principalmente con defectos del tubo neural, entre otras injurias, la mayor parte de los estudios se concentran en la susceptibilidad de enfermedades, y no existen datos acerca de las razones de la persistencia de estos polimorfismos a pesar de su relación negativa con la salud humana, y los datos en diferentes bases de datos a nivel de Latinoamérica no contemplan procesos de selección, ni razones que puedan justificar el alto porcentaje de estos polimorfismos en las poblaciones y su comportamiento como SNP a pesar de los daños que causan a nivel celular. Para nosotros es de suma importancia tener en cuenta las frecuencias de estos polimorfismos y relacionar su persistencia con procesos de selección quizá debido a la protección que pueden causar con

respecto a infecciones virales de alto impacto en la calidad de vida humana, como la causada por el virus de inmunodeficiencia humana -VIH-, ya que al debilitar la enzima MTHFR se afecta la síntesis adecuada de nucleótidos conllevando a inhibición de la replicación viral, que a su vez conduce a limitar el progreso de VIH a Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), o incluso restringir las comorbilidades asociadas en personas con VIH positivo.

2.3 Hipótesis de Investigación

Procesos de selección natural son causales de persistencia de los polimorfismos 677C>T y 1298A>C del gen *MTHFR*; dichos polimorfismos se han encontrado en diferentes poblaciones a pesar de su correlación clínico-patológica, aun sabiendo que contribuyen a susceptibilidad de enfermedades prevalentes. Puede ser que la protección contra la progresión de infecciones virales sea la razón principal de la persistencia de estos SNP. Es por esto que tomamos casos con infección de VIH y controles de adultos sanos, y realizamos genotipificación de estas poblaciones, para encontrar diferencias significativas que son el primer paso para corroborar esta hipótesis.

2.4 Pregunta de Investigación

¿Existe una diferencia significativa en las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos 677C>T y 1298A>C del gen *MTHFR* entre casos de adultos infectados con VIH y controles sin infección por este virus en la población colombiana? ¿Pueden los polimorfismos *MTHFR* 677C>T y 1298A>C persistir en la población por procesos de selección y estar asociados a protección ante infección por VIH en una población colombiana?

3 Objetivos

3.1 Objetivo General

Comparar una población colombiana de adultos infectados por VIH con personas adultas sanas, buscando diferencias genético-poblacionales de los polimorfismos 677C>T y 1298 A>C, que permitan entender procesos de selección sobre este polimorfismo, evaluando si existe diferencia significativa entre los genotipos de los dos grupos de pacientes (con VIH y sin VIH).

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar genotipificación de los polimorfismos *MTHFR* 677C>T y 1298 A>C en una población colombiana.
- Comparar los resultados de frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos *MTHFR* 677C>T y 1298 A>C con estudios a nivel mundial y otros estudios en Colombia.
- Analizar la variabilidad genética de los polimorfismos *MTHFR* 677C>T y 1298 A>C en adultos infectados por el VIH y adultos sanos.
- Identificar los cambios generados en los polimorfismos más comunes del gen *MTHFR* con respecto a población sana e infectada por VIH y establecer diferencias genético-poblacionales.
- Evaluar la presencia de estos polimorfismos y sus frecuencias en diferentes tipos de poblaciones colombianas.
- Identificar una posible fuerza de selección sobre los polimorfismo *MTHFR* 677C>T y 1298 A>C en población colombiana.

4 Marco teórico

4.1 MTHFR y Folato

4.1.1 Folato y Ácido Fólico

El folato (vitamina B9), se considera una vitamina hidrosoluble, indispensable para procesos tan importantes como la homeostasis celular^{(2),(7)}. Al no ser sintetizada naturalmente por el humano, debemos adquirirla desde los alimentos^{(1),(8)}, los cuales tienen concentraciones variables, o consumir la forma sintética conocida como ácido fólico (ácido pteroilmonoglutámico), administrada principalmente a mujeres gestantes o con deseo de un pronto embarazo para garantizar los niveles adecuados de folato en el feto^{(3),(9)}, bien sea en suplementos orales o inyectables (Tabla 1).

Bioquímicamente, la molécula de ácido fólico está compuesta por pteridina, un compuesto químico basado en anillos de pirimidina y pirazina, unidos en el medio por un puente de metileno a un ácido para-aminobenzoico y a una unidad de glutamato, siendo esta la diferencia principal con la molécula de folato, la cual en lugar de monoglutamato, posee una cadena de poliglutamatos^{(3),(10)} (Figura 1).

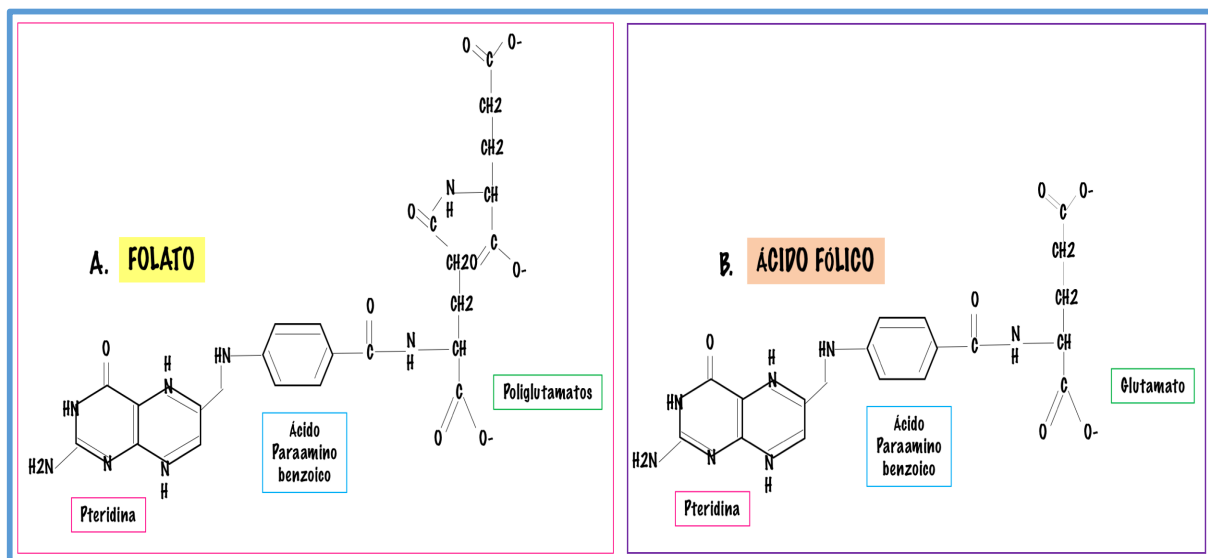


Figura 1. Estructura química de las moléculas. A. Folato B. Ácido Fólico

Basada en Brito, 2012⁽³⁾ Modificada por Lyons-Molano Jessica.

Concentración de Folato en alimentos					
Grupo	Alimento	Folato (µg) X 100g	Grupo	Alimento	Folato (µg) X 100g
Cereales y derivados	<i>Avena</i>	60	Frutos Secos	<i>Maní</i>	110
	<i>Trigo</i>	57		<i>Almendras</i>	96
Verduras y Hortalizas	<i>Brotes de Soja</i>	160		<i>Nueces</i>	47
	<i>Espinaca</i>	140	Leche y derivados	<i>Leche entera</i>	4
	<i>Achicoria</i>	127		<i>Queso</i>	60
	<i>Acelga</i>	90	Carnes	<i>Hígado de Cerdo</i>	590
	<i>Col</i>	90		<i>Hígado de pollo</i>	240
	<i>Puerro</i>	127		<i>Hígado de Ternera</i>	220
	<i>Coliflor</i>	90		<i>Hígado de Cerdo</i>	110
	<i>Repollo</i>	80	Huevos	<i>Yema</i>	25
	<i>Brócoli</i>	90			
Legumbres	<i>Garbanzos</i>	180			
	<i>Habas secas</i>	76			
Frutas	<i>Aguacate</i>	66			
	<i>Tomate</i>	28			
Presentaciones Sintéticas					
Presentación			Concentración		
<i>Tabletas / Comprimidos</i>			400µg 1mg, 4mg 5mg		
<i>Ampolla Inyectable</i>			1mg/ml (ampolla x 1ml)		

Tabla 1. Contenido de Folato en los alimentos y presentación sintética

Basada en http://www.dfarmacia.com/farma/ctl_servlet?_f=13&idContenido=13071463&idCategoria=4

Modificada por Lyons-Molano Jessica.

La molécula, fue identificada por primera vez en 1930, en la levadura de cerveza, y posteriormente, en 1931, Lucy Wills demostró su utilidad para revertir anemias inducidas en el embarazo^{(11),(12)}. Para 1941, se descubre que también se encuentra en vegetales, principalmente de hoja verde⁽¹⁴⁾, como la espinaca; este hallazgo permite asignarle el nombre de “folato” palabra proveniente de *folium* (hoja) y aumenta el interés de la comunidad científica por la molécula dando la pauta para que en 1946, Yella Prigada, logre su síntesis química en un laboratorio⁽¹⁰⁾, con su posterior uso en el tratamiento de anemias macrocíticas con resultados satisfactorios, considerándose desde entonces una molécula primordial para el ser humano⁽¹³⁾.

El ácido fólico no tiene actividad co-enzimática, pero su forma reducida, el ácido tetrahidrofólico, tiene participación activa en procesos importantes, que hacen parte de la bioquímica fundamental de la vida (ver Figura 2), es indispensable para procesos de división celular, participa en síntesis de purinas y pirimidinas, ayuda a convertir a la vitamina B12 en su forma activa y participa en la regulación de la concentración de homocisteína y en el paso de esta enzima a metionina o cisteína, actuando a su vez en la regulación de la expresión de genes constitutivos y específicos del ser humano^{(2),(14),(15)}.

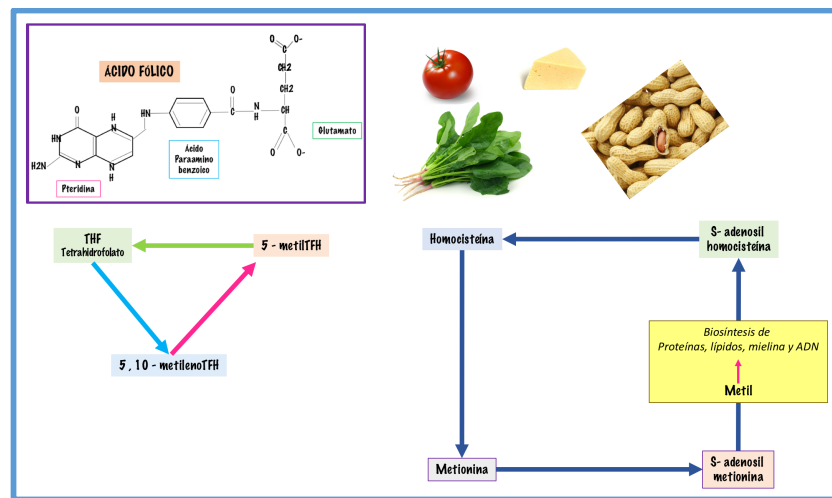


Figura 2. Acciones del Folato: molécula principal en la bioquímica de la vida.

Basada en <http://www.dfarmacia.com/ficheros/images/4/4v24n01/grande/4v24n01-13071463fig02.jpg>

Modificada por Lyons-Molano Jessica.

Posterior al ingreso al organismo, el folato se ubica principalmente en el hígado y en el cerebro, encontrando concentraciones de folato en LCR (líquido céfalo raquídeo) tres o

cuatro veces más altas que las halladas a nivel plasmático^{(14),(16)}. Se recomienda una ingesta de folato de 400µg/día^{(20), (21)}; aunque el consumo para tener niveles óptimos que permitan que en forma de poliglutamatos cumpla adecuadamente las funciones metabólicas durante su paso por el ciclo de un carbono⁽¹⁸⁾, relacionado estrechamente con el ciclo del ácido fólico, varía de acuerdo a la edad y el género; teniendo en cuenta que durante el embarazo y la lactancia se requiere una concentración mayor (ver Tabla 2).

Ingesta diaria de folato en el humano			
Etapas de la vida	Edad	Hombres µg/día	Mujeres µg/día
Lactantes	0-6 meses	65	65
	6-12 meses	80	80
Niños	1-3 años	150	150
	4-8 años	200	200
	9-13 años	300	300
Adolescentes	14-18 años	400	400
Adultos	> 19 años	400	400
Etapas de embarazo	Todas	No aplica	600
Etapas de lactancia	Todas	No aplica	500

Tabla 2. Recomendaciones de ingesta diaria del folato en humanos.

Basada en Rodríguez G⁽⁸⁾ Modificada por Lyons-Molano Jessica.

El déficit de folato, sólo puede ser detectado cuando los niveles son tan bajos que ya se ha instaurado alguna enfermedad^{(3),(6)}, encontrándose más frecuentemente asociado a personas de mayor edad o a personas con dieta vegana/vegetariana. Sin embargo, por el alto impacto, investigaciones acerca del déficit del folato, se han enfocado en recién nacidos con defectos del tubo neural^{(17),(18)}, logrando demostrar la importancia de la ingesta de folato por parte de la madre durante el periodo de gestación y su influencia en la alteración de los niveles y biodisponibilidad del folato^{(8),(9),(19),(20)}.

Debido al alto porcentaje de asociación con enfermedades, y para evitar riesgos de susceptibilidad a todas las enfermedades relacionadas con el folato; en 1996 la FDA (*Food and Drug Administration*) hace públicas las recomendaciones para la fortificación de harinas

a nivel mundial; haciéndose efectivas a partir de 1998. Esto consigue una amplia reducción en la incidencia de defectos del tubo neural y de enfermedades cardiovasculares congénitas asociadas con el déficit de esta vitamina^{(21),(22),(23)}. En el 2006, desde perspectivas nutricionales y de salud pública, la OMS (Organización Mundial de la Salud) y la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), publican las directrices generales de la fortificación de las harinas, que se resumen en la “Guía sobre fortificación en comidas con micronutrientes” (*Guidelines on Food Fortification with Micronutrients*)^{(22),(24)}, sin embargo, no todos los países deciden acogerse a la legislación de fortificación. En la Figura 3, se observan en colores los países con reglamentación de folato obligatorio para el año 2013, condición que para el 2017 no ha tenido variación⁽²⁵⁾.

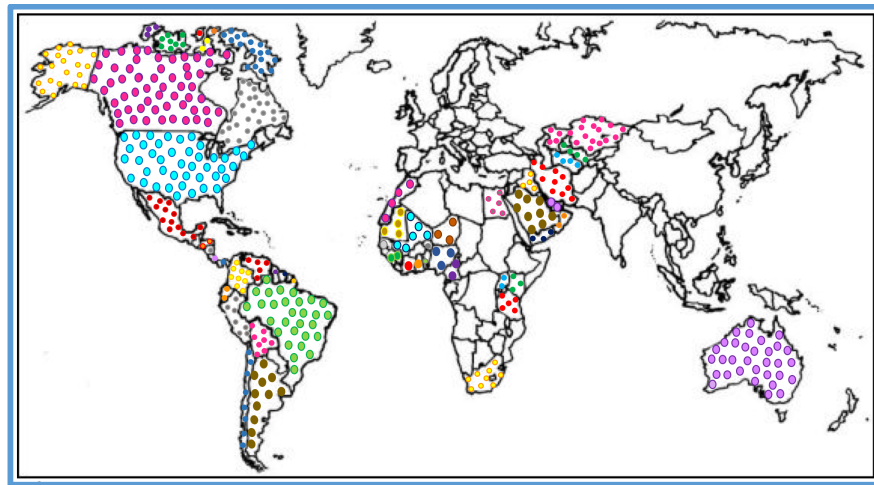


Figura 3. Fortificación de las harinas a nivel mundial.

Países con legislaciones que obligan a la fortificación se encuentran con puntos de colores, mientras que países en blanco no tienen fortificación de manera obligatoria.

Basada en: Imbard⁽²⁵⁾ Modificada por Lyons-Molano Jessica.

Cabe aclarar que, aunque los grupos de investigación que involucran en sus estudios al folato y su principal enzima para su metabolismo, la MTHFR, se centran primordialmente en su relación con defectos del tubo neural por su alta comorbilidad, se han obtenido resultados que demuestran asociación frente a la susceptibilidad a defectos vasculares, enfermedad cardíaca^{(26),(27)}, eventos tromboembólicos⁽²⁸⁾, enfermedades psiquiátricas como depresión^{(29),(30)} y esquizofrenia⁽³¹⁾, pérdidas recurrentes y tempranas del embarazo^{(9),(32)}, alteraciones cromosómicas (aneuploidías)^{(33),(34),(35)}, e incluso se han asociado a procesos de carcinogénesis^{(36),(37)}. Además, se ha sugerido que variantes que afectan la MTHFR poseen

efectos protectores ante infecciones virales, esto primordialmente debido a que un virus necesita el funcionamiento óptimo de las enzimas que garanticen la adecuada síntesis de nucleótidos para asegurar su replicación y SNP como 677C>T y 1298A>C del gen *MTHFR* debilitan la función enzimática, afectando la producción de nucleótidos y por ende será menos probable que un virus pueda replicarse^{(38),(39)}.

4.1.2 Absorción y metabolismo del folato

Mantener el contenido de tetrahidrofolato adecuadamente en los tejidos, depende de los requerimientos y del consumo de folato⁽⁴⁰⁾. La importancia de su equilibrio, se debe principalmente a que, el tetrahidrofolato, actúa como sustrato en la regulación del metabolismo de ácidos nucleicos y aminoácidos^{(41),(42)}.

Para empezar la ruta metabólica y el proceso de absorción, el ácido fólico ingresa al organismo a través de la dieta, mediante el consumo de suplementos, o puede ser sintetizado por la microflora intestinal⁽⁴³⁾, especialmente por *Bacteroides spp.*, en cuyo caso es posible que se absorba por el colon sin afectar los niveles circulantes de esta vitamina⁽⁴⁴⁾.

Luego de estar en el organismo, la vitamina B9 pasa a su propio ciclo, “el ciclo del folato”⁽⁴⁵⁾, que a su vez, está relacionado con otros ciclos indispensables para la homeostasis celular, tales como el ciclo de la metionina y el ciclo de un carbono, en donde unidades de un carbono se convierten en grupos metilo para ser usados en la remetilación de la homocisteína y la formación de metionina^{(46),(47)}; simultáneamente, pero mediante otro proceso, el folato participa de manera activa en la síntesis de purinas y timidilato, donando sus carbonos y de esta manera contribuyendo a la síntesis de nucleótidos^{(14),(16),(41)}. Todos estos procesos en los que se encuentra involucrada la molécula de folato, llevan a pensar de manera inequívoca, que una alteración en los niveles de esta vitamina, afecta varios ciclos metabólicos, terminando en desequilibrios importantes para el organismo, que sin ninguna duda conducen a susceptibilidad para muchas enfermedades, razón suficiente para dar importancia al adecuado consumo de folato mediante una dieta equilibrada^{(3),(6),(8)}.

En el ser humano, la absorción del folato ingerido en la dieta, puede variar entre un 10-90%, (promedio del 50%) y aunque aún no es completamente claro el mecanismo, se considera

que involucra varios pasos dentro de los cuales se encuentran: 1. Desconjugación de poliglutamil-folatos 2. Ingesta activa por parte del enterocito 3. Difusión pasiva por parte del enterocito 4. Reconjugación y 5. Exportación^{(48),(49),(50)}.

Durante periodos de ayuno, el ácido fólico en forma desconjugada, es decir, 5-metiltetrahidrofolato y 5-formil-tetrahidrofolato, se absorben completamente; mientras que los poliglutamil-folatos, principalmente los reducidos, que provienen de los alimentos y se convierten en mono o diglutamatos por medio de carboxipeptidasas (folilconjugasas), son absorbidos entre un 60-80%, dicho proceso se realiza a nivel intestinal, más exactamente en el yeyuno⁽⁴⁴⁾. Los porcentajes de absorción del folato puede verse afectado por déficit de zinc, por inhibidores naturales encontrados en alimentos tales como repollo, naranja, levadura, frijoles rojo, lima, soja, lentejas; medicamentos especialmente la colestiramina, los salicilatos, la difenilhidantoína, y los AINES⁽⁴¹⁾; del mismo modo, el consumo persistente de etanol, afecta enormemente el metabolismo, transporte, liberación y la absorción del folato debido a que disminuye el mecanismo de hidrólisis de los poliglutamatos^{(51),(52),(53)}.

Las formas desconjugadas, realizan un transporte activo dependiente de sodio, facilitado por proteínas transportadoras cuya función depende del gradiente transmembrana. Las proteínas transportadoras involucradas en esta actividad son tres: RFC (portadora de folato reducido), PCFT (transportador de folato acoplado a protones) y FRs (receptores de folato), estas últimas son llamadas FBPs (proteínas de unión al folato)⁽⁵⁴⁾. Todas estas proteínas son necesarias en una localización opuesta a las células polarizadas y funcionando adecuadamente, no solo para facilitar el movimiento del folato, sino también para que el enterocito logre internalizar esta vitamina que posteriormente y gracias a vesículas asociadas a la membrana es liberada al citosol^{(16),(55),(49)}.

Del folato consumido, aproximadamente un 20-30% se absorbe de manera pasiva evadiendo el mecanismo activo del enterocito, para que esto suceda el folato debe mantener un pH <6, es decir entre más ácido sea el folato, más fácil difunde al enterocito incluso llegando al punto de difundir por transporte pasivo, mecanismo que se ha logrado evidenciar en algunos estudios, por ejemplo, en casos de insuficiencia pancreática exocrina, las personas reducen la excreción de bicarbonato, afectan el espacio luminal y facilitan la difusión del folato a través del borde en cepillo intestinal⁽⁴¹⁾.

Luego de absorberse, los folatos por medio de la folilpoliglutamato sintetasa se convierten en glutamil, limitando su salida de la célula; la exportación como tal depende de una familia de transportadores de aniones orgánicos multiespecíficos (OAT)^{(7),(56)}.

Cuando existen concentraciones elevadas de folato, la circulación enterohepática juega un papel importante, almacenándolo en los hepatocitos, en forma de poli-gama-glutamil y secretando una parte a la bilis, para que pueda ser nuevamente reabsorbido. Las formas que ingresan como 5-metiltetrahidrofolato⁽⁵⁷⁾, son más adecuadas para el almacenamiento celular; y el derivado que se produce en el hígado luego de la absorción intestinal, justo después de atravesar la circulación enterohepática, se encuentra en mayor cantidad en el plasma.^{(2),(5),(10)} (ver Figura 4).

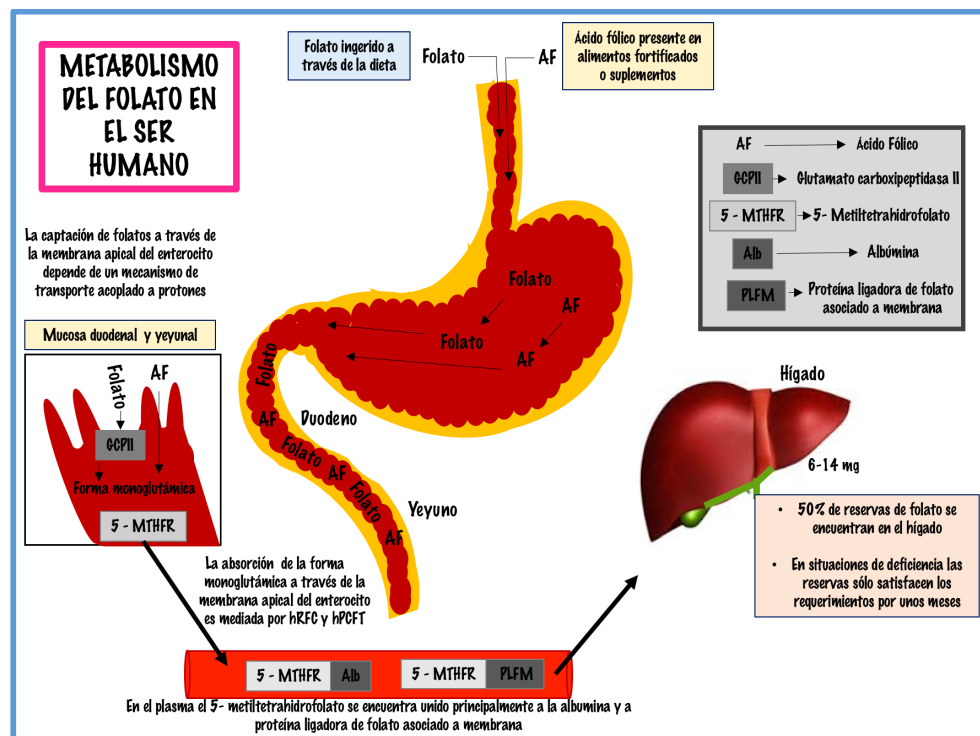


Figura 4. Metabolismo del folato en el ser humano.

Basada en: Brito⁽³⁾ Modificada por Lyons-Molano Jessica.

La eliminación de la vitamina, puede darse bien sea por vía urinaria o fecal; teniendo un porcentaje mayor la eliminación fecal, debido a la contribución de los intestinos con la síntesis bacteriana de folato, además del folato proveniente de la dieta que no es absorbido, el relacionado a la secreción biliar y parte del que es secretado a nivel gastrointestinal. Por

vía urinaria, en cambio el porcentaje es mucho menor y depende solo de la ingesta de folato^{(10),(16),(41)}.

Para determinar el camino hacia la homeostasis celular, durante la participación en el ciclo del folato, las enzimas metilentetrahidrofolato reductasa y metionina sintasa reductasa, principales en el proceso, regulan la concentración de homocisteína para su paso bien sea a metionina o cisteína, participan en la síntesis de purinas y pirimidinas y contribuyen a la expresión génica al tener participación directa con la metilación de islas CpG⁽⁵⁸⁾.

Todo el ciclo reducido del folato y sus interacciones se encuentran resumidos en las Figuras 5 y 6⁽²⁵⁾. Allí se observan las relaciones entre todos los procesos que llevan al folato a su participación esencial en la homeostasis celular.

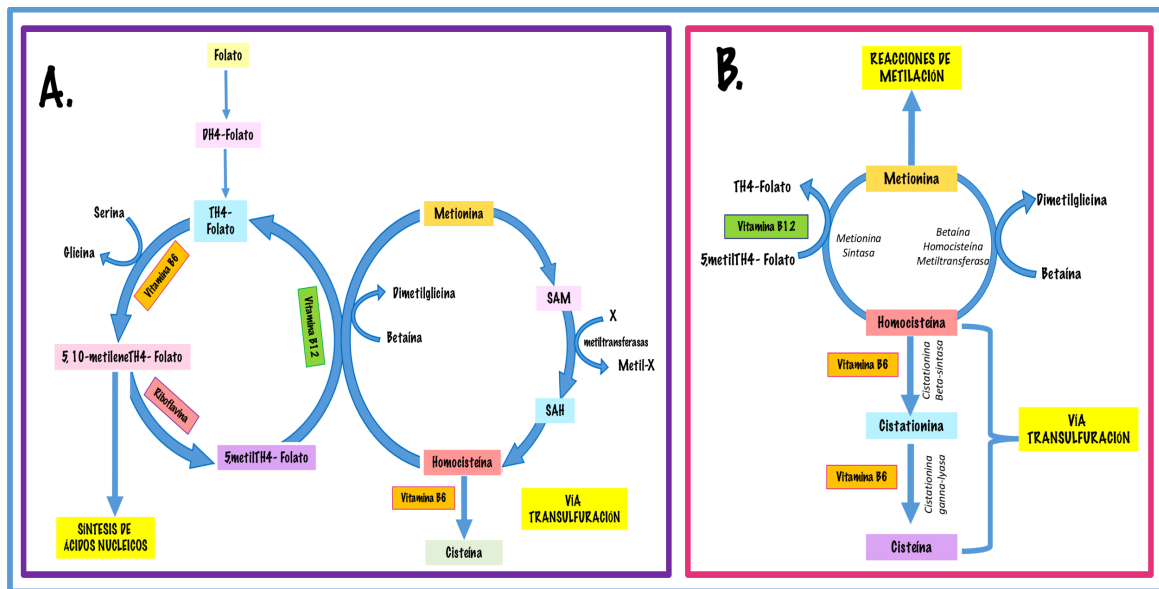


Figura 5. A. Metabolismo de un carbono. B. Metabolismo de la homocisteína.

Basada en <http://pi.oregonstate.edu/es/mic/vitaminas/folato#definiciones> Modificada por Lyons-Molano Jessica.

En la Figura 5 A, observamos que para la formación de metionina a partir de homocisteína durante el metabolismo de un carbono, es necesaria la 5-metiltetrahidrofolato, así como se requiere la 5,10-metilentetrahidrofolato para la síntesis de ácidos nucleicos. La S-adenosilmetionina SAM, que no es más que metionina en forma donante de metilo, se necesita para la metilación de ADN, así como otros procesos biológicos; la MTHFR

Por último, podemos ver la transulfuración de la homocisteína, es decir la vía catabólica, que se encarga de la conversión de homocisteína en cisteína a través de dos enzimas dependientes de vitamina B6; cistatoína β sintasa, que condensando homocisteína con serina la transforma en cistationina, y por medio de la cistationina gamma liasa que la convierte en cisteína, α -cetobutirato y amoniaco⁽¹⁶⁾.

4.1.3 Aspectos Genéticos del gen *MTHF*

El gen metilentetrahidrofolato reductasa – *MTHFR* - fue aislado por primera vez de ADNc de tejido hepático de cerdo; se encuentra ubicado en la hebra reversa del cromosoma 1 humano, con su ubicación exacta a nivel de 1:11,785,723-11,806,920, descrita en la versión actualizada de Ensembl GRCh38:CM000663.2^{(60),(61)} (Ver Figura 7). Tiene una longitud de 1980 pares de bases (pb), distribuidas en un total de 11 exones, con longitudes que oscilan entre 102 y 432 pb, e intrones que varían entre 250 y 1.5kb, excepto un intrón de 4,2 kb.

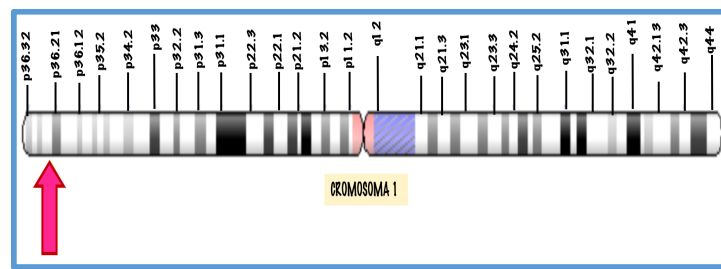


Figura 7. Gen *MTHFR* - Localización citogenética 1p36.3

Localización molecular: 11,785,730-11,806,103 pb sobre el cromosoma 1.

Basada en NIH Genetics Home Reference <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFR> (*Homo sapiens* Annotation Release 108, GRCh38.p7) Modificada por Lyons-Molano Jessica.

Este gen realiza un proceso de *splicing* alternativo⁽⁶²⁾, que no es más que un mecanismo de edición posterior a la transcripción luego de obtener el ARN mensajero primario, además cuenta con múltiples sitios de poliadenilación, que actúan como promotores alternativos. Estas dos condiciones permiten que el gen *MTHFR* cuente con 9 transcritos de diferente tamaño; aparte de esto, se conoce que posee 66 secuencias homólogas que se han separado las unas de las otras posiblemente por procesos de especiación, en otras palabras cuenta con un total de 66 ortólogos, y pertenece a una familia de proteínas identificada como PTHR21091 SF31 descrita en Ensembl^{(61),(63)}.

El gen se encuentra asociado con 616 variaciones⁽⁶⁴⁾ y, aunque se encuentra en todos los tejidos⁽⁶¹⁾, sus mayores niveles de expresión se encuentran en los testículos y el riñón de los humanos⁽⁶¹⁾. Las patologías y rasgos relacionados con el gen *MTHFR*⁽³⁾, diferentes a los descritos debido a la susceptibilidad o protección de enfermedades en relación con el folato y los ciclos asociados a su metabolismo, se han recopilado y han sido estudiados ampliamente, llegando a un total de 22 fenotipos, cada uno de ellos con ubicaciones cromosómicas distintas, demostradas científicamente y descritos en el Anexo 1.

No obstante, múltiples variaciones encontradas sobre este gen⁽⁶⁵⁾, aumentan los rasgos fenotípicos que se han asociado y que conllevan a diferentes consecuencias de gran importancia en el ser humano⁽⁵⁹⁾, bien sea patogénicas, benignas o de respuesta a algunos fármacos⁽⁶⁶⁾.

En la Tabla 3 se describen algunas de estas variaciones con su respectiva identificación, tipo de mutación, ubicación cromosómica, significancia clínica, y consecuencia funcional. Aunque las variaciones descritas en esta tabla no son las únicas mutaciones que se pueden presentar en asociación al gen *MTHFR*, son las más significativas y las de mayor respaldo en bases de datos científicas⁽⁶⁴⁾; las dos primeras, objeto de nuestro estudio, han sido las mutaciones más relevantes debido a que en los últimos años, se han encontrado casos en los que estas variaciones tipo *missense*, se asocian no solo con susceptibilidad a enfermedades, sino también con protección contra la replicación de algunos virus, y es curioso que a pesar de todas las asociaciones patogénicas y los procesos evolutivos, dichos polimorfismos persistan, lo que hace pensar que la persistencia se deba a procesos de selección⁽⁶⁷⁾, tal como fue planteado en nuestra hipótesis.

Mutación codón afectado	Identificación	Significancia clínica	Consecuencia funcional	Localización Cromosoma
1298A>C c.1286 A>C p.E429A	rs1801131	Respuesta - drogas	Missense	1:11794417
677C>T c.665C>T p.A222V	rs1801133	Respuesta- drogas	Missense	1:11796321
1793G>A c.1781G>A p.R594Q	rs2274976	Sin testear	Missense, intrónica	1:11790870
A/C /G/T c.417G>T p.W139W	rs2066466	Benigna	Sinónima	1:11801219
A/G/T c.1556G>T p.R519L	rs45449298	Incierta	Missense	1:11792354
A/G c.1743G>A p.M581I	rs45590836	Patogénica	Missense	1:11791216
C/T c.1428C>T p.F435F	rs4846051	Benigna	Sinónima	1:11794400
C/T c.276C>T p.D92D	rs45546035	Benigna	Sinónima	1:11801370
C/T c.1515C>T p.T464T	rs79157191	Incierta	Sinónima	1:11794045
C/T c.1670C>T p.R183Stop	rs121434294	Patogénica	Nonsense	1:11800251
A/G c.470G>A p.R157Q	rs121434295	Patogénica	Missense	1:11801166

Tabla 3. Algunas variaciones en la secuencia del gen *MTHFR*.

Basada en: Búsqueda de bases de datos SNPedia, HapMap, dbSNP, openSNP, Ensembl

Realizada por Lyons-Molano Jessica

4.1.4 Proteína MTHFR

La proteína metilentetrahidrofolato reductasa humana, identificada como MTHFR y en bases de datos científicas como P42898 y OMIM 607093, se trata de una flavoproteína citosólica, homodimérica, con una longitud de 656 residuos de aminoácidos y un peso de 650 kD;

respecto a la localización, se encuentra en la hebra reversa del cromosoma uno a nivel de 1:11850736 – 11863173 y dentro de sus funciones, se encarga de catalizar la conversión de 5,10-metilenetetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, un co-sustrato que participa de manera activa, en la remetilación de homocisteína en metionina^{(61),(64)}; debido a que inhibiciones de este paso en el ciclo del folato, conducen a alteraciones asociadas a patologías en el humano⁽⁴⁵⁾, se considera que esta reacción es completamente indispensable y, de lejos, la más importante para la homeostasis generada mediante el ciclo del folato.

La proteína MTHFR, cuenta con dos isoformas, una de 70kDa, y otra de 77kDa, las cuales se generan gracias a que cuenta con dos promotores alternativos⁽⁶²⁾. Se encuentra regulada alostéricamente por S-adenosilmetionina y se relaciona con el metabolismo de un carbono al involucrarse en la vía de interconversión de tetrahidrofolato⁽⁴⁶⁾.

La proteína cuenta además con dos dominios: un dominio catalítico, que interactúa con sustratos provocando reacciones enzimáticas, y un dominio regulador, que, como su nombre lo indica, se encarga de regular actividades enzimáticas^{(16),(62),(68)}.

La estructura de la proteína MTHFR⁽⁵⁴⁾ se ha propuesto en diferentes bases de datos y, de manera simplificada compilando los hallazgos científicos de esta molécula, podemos observarla en la Figura 8. En la parte vertical de esta gráfica se encuentra relacionada la base de datos en donde se describió esa parte de la estructura⁽⁶⁹⁾, así mismo, en la parte inferior se observa la relación de los 11 exones del gen *MTHFR* en relación con la proteína.

La verdadera motivación de los investigadores para interesarse en esta molécula durante las últimas décadas, se ha basado en que se trata de una de las enzimas reguladoras más importantes en el metabolismo de la homocisteína (Hcy)⁽⁷⁰⁾. La Hcy, es el aminoácido encargado de transferir los grupos metilo en el proceso de metabolismo celular participando de esta manera, en el desenlace de enfermedades vasculares⁽²⁸⁾, cardíacas⁽²³⁾ y cerebrales^{(71),(72),(73)}, además de interferir en los procesos infecciosos causados por virus y bacterias, bien sea generando susceptibilidad o dando resistencia^{(74),(75),(76)}; es por esto que una alteración en MTHFR provocará una enzima debilitada que afectará la concentración plasmática de Hcy con sus consecuencias en la salud humana⁽⁷⁷⁾.

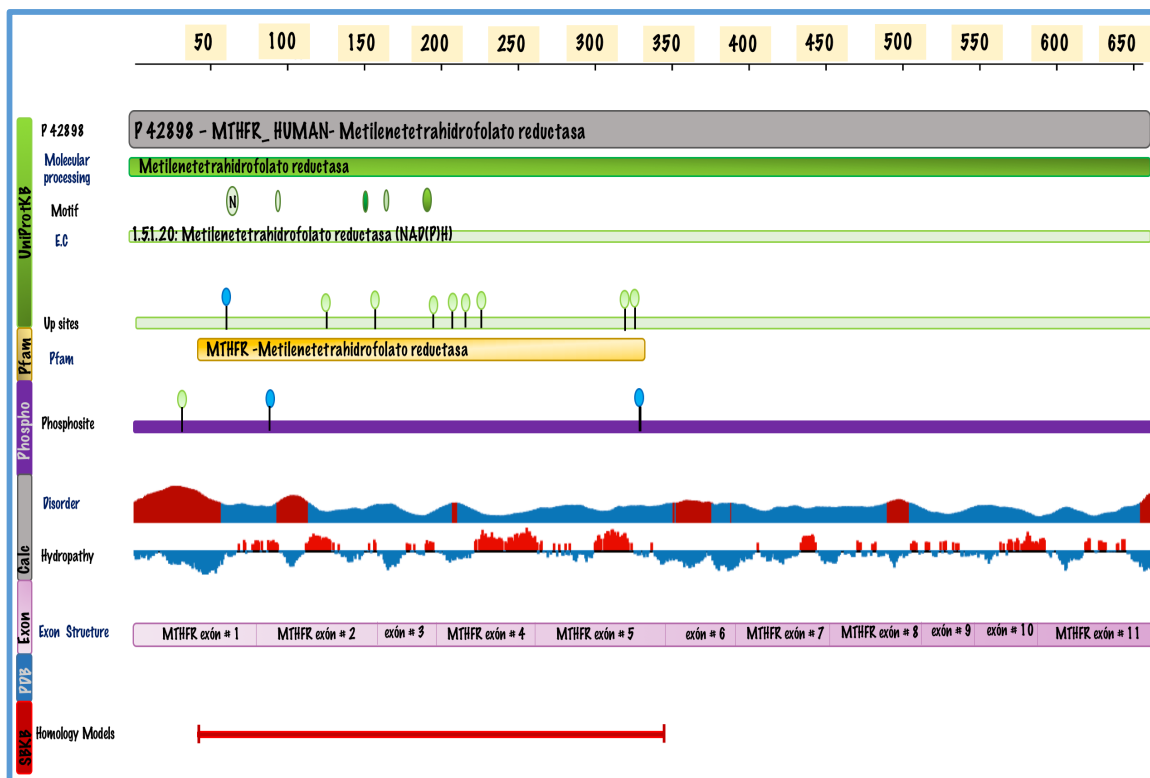


Figura 8. Estructura de la proteína MTHFR.

La barra vertical de colores en el lado izquierdo indica la proveniencia de los datos; en verde se encuentran datos obtenidos de UniProtKB. Datos de variación (procedentes de UniProt) muestran variación no genética de sitios web ExPASy y dbSNP; en amarillo datos provenientes de Pfam por interacción con el sitio web HMMER3; en púrpura datos originados de Phosphosite; Datos en gris fueron calculados usando BioJav- predicciones de desórdenes proteicos son basados en RONN (Troshin, P. and Barton, G. J. No publicados) y allí se muestra en rojo la región potencialmente desordenada y en azul la región probablemente ordenada. Hidropatía se calculó utilizando una ventana de 15 residuos y sumando las puntuaciones de las tablas de hidrofobicidad estándar- así en rojo se verá lo hidrófobo y en azul lo hidrófilo. En lila encontramos la estructura de los exones proyectado sobre la secuencia de Uniprot. Los datos en rojo finales indican los rangos combinados de modelos de homología de SBKB y la proteína modelo de portal. Para más información ingrese a la página de Protein Data Bank. **Gráfica tomada de Protein Data Bank- Human P.42898 http://www.rcsb.org/pdb/protein/P42898?evtc=Suggest&evta=ProteinFeature%20View&evtl=autosearch_Se archBar_querySuggest ** Modificada por Lyons-Molano Jessica.

A nivel molecular, al unirse a FAD (flavín adenín dinucleótido), puede modificar la unión de aminoácidos y formar de esta manera complejos proteicos de unión, con actividad (NAD(P)H), metilentetrahidrofolato reductasa, liberando energía necesaria para los procesos metabólicos en los que está involucrada^{(2),(16),(78)}.

En procesos biológicos⁽⁵⁾ tales como la circulación sanguínea, procesamiento metabólico de aminoácidos, mantenimiento de heterocromatina, metabolismo de homocisteína, regulación de histonas, respuesta a la hipoxia, comportamientos y respuestas metabólicas dependientes de niveles de ácido fólico, respuestas inmunes asociadas a la interleucina 1 y en algunos otros procesos metabólicos relacionados con vitaminas del complejo B, la proteína MTHFR, actúa como un importante regulador, gracias a su participación esencial dentro de ciclos como el de un carbono⁽⁴⁶⁾ y del ácido fólico^{(14),(41),(55)}, que como se mencionó en el apartado anterior influyen de gran manera en la homeostasis celular⁽⁶²⁾.

4.1.5 Síntesis de Ácidos Nucleicos y MTHFR

Como se ha mencionado, MTHFR se encuentra directamente relacionado con la síntesis de nucleótidos^{(49),(61),(79)}, punto fundamental para la progresión de infecciones virales ya que la mayoría de los virus, incluyendo el de nuestro objeto de investigación, el VIH⁽⁸⁰⁾, requieren una síntesis adecuada de ácidos nucleicos por parte de la célula infectada, para lograr replicarse⁽⁸¹⁾, infestar e invadir nuevas células, convirtiéndose en una infección activa.

Las enzimas que participan en el ciclo del folato, principalmente MTHFR^{(14),(78),(59)}, a través de las vías con las que interactúan son claves para el metabolismo del ADN. Se puede incluso decir, que los precursores de la síntesis de ADN (purinas y pirimidinas) dependen de estas enzimas del ciclo del folato⁽⁴⁷⁾.

De igual manera, la metilación de ADN⁽⁸²⁾, importante para regular la expresión génica y los procesos de diferenciación celular, está ligada a la función de síntesis de ácidos nucleicos y reciclaje de grupos metilo, que tienen lugar en el ciclo del folato⁽⁷⁰⁾.

Por otro lado, una MTHFR debilitada, que no pueda cumplir con las funciones celulares de manera efectiva, es decir una síntesis inadecuada de aminoácidos y ácidos nucleicos, se investiga como efecto protector ante infecciones virales altamente morbi-mortales como el VHB (virus Hepatitis B) o VIH, al disminuir la oportunidad de replicación de las partículas virales, frenando el progreso de una infección hacia síndromes de mal pronóstico⁽⁸³⁾.

4.2 Genética de los polimorfismos del gen MTHFR

4.2.1 Genética del polimorfismo 677C>T del gen MTHFR

Descrito por Kang y colaboradores en 1988 como una variante termolábil de la metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*)⁽⁸⁴⁾, asociada con aumento de niveles de homocisteína que conduce a alteraciones en el funcionamiento enzimático^{(77),(85)}, disminuyendo su actividad en general, fue solo hasta 1995, cuando estudiando un grupo de pacientes con enfermedad cardiovascular, Frosst y colaboradores⁽⁸⁶⁾, describen esta variante tipo *missense*, como un polimorfismo, debido a su frecuencia genotípica a nivel poblacional^{(87),(88)}.

Este polimorfismo se caracteriza principalmente, por reducir la actividad catalítica de la proteína y aumentar la termolabilidad, lo que hace que a temperaturas mayores de 37°C disminuya la acción enzimática^{(77),(89)}.

Se encuentra ubicado en la posición 677 del ADNc del *MTHFR*, en donde produce el cambio de una citosina por una timina (677C>T), alterando el dominio catalítico de la proteína, generando el cambio de una alanina por un residuo de valina en la posición 222 (p.A222V); para su búsqueda en bases de datos, se ha identificado con el rs1801133, con el fin de diferenciarlo de otras variantes del gen y hacer una búsqueda eficiente que se limite a la descripción y estudios específicos de este tipo de variación⁽⁹⁰⁾. A partir de 1995, con el estudio mencionado de Frosst⁽⁸⁶⁾, se determinó que el genotipo homocigoto TT, (677TT), disminuye la actividad enzimática entre 50-60% a una temperatura de 37°C y si la temperatura se aumentaba a 46°C, la actividad se reducía en un 65% además de aumentar concentraciones de homocisteína, al comparar su eficiencia enzimática con genotipos *wild type* (silvestres) 677CC a las mismas temperaturas^{(77),(91)}. Sin embargo, estudios de asociación posteriores han demostrado que el aumento de homocisteína en relación al genotipo TT, también se encuentra influenciado por la ingesta deficiente de folato^{(92),(93),(21)}.

En la fase 3 del proyecto de 1000 genomas, se determinaron las diferentes frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo 677C>T del gen *MTHFR* en diferentes poblaciones^{(87),(94),(95)}, con una frecuencia alélica menor de 0.25, (MAF 0.25), estos datos pueden encontrarse en la Tabla 4, datos verificados y publicados en Ensembl Human en la versión GRCh38.p7.

Población	Frecuencia alélica	Frecuencia genotípica	Esquema
Todas	G: 0.755 (3779) A: 0.245 (1229)	G G: 0.591 (1480) A A: 0.082(205) A G: 0.327 (819)	
AFR	G: 0.910 (1203) A: 0.090(119)	G G: 0.831(549) A A: 0.011(7) A G: 0.159 (105)	
AMR	G: 0.526 (365) A: 0.474 (329)	G G: 0.262 (91) A A: 0.210(73) A G: 0.527 (183)	
EAS	G: 0.704 (710) A: 0.296 (298)	G G: 0.514 (259) A A: 0.105(53) A G: 0.381 (192)	
EUR	G: 0.635(639) A: 0.365 (367)	G G: 0.406 (204) A A: 0.135(68) A G: 0.459 (231)	
SAS	G: 0.881 (862) A: 0.119 (116)	G G: 0.771 (377) A A: 0.008(4) A G: 0.221(108)	

Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo 677C>T del gen *MTHFR* (MAF 0.25) Según fase 3 del proyecto 1000 genomas.

AFR: Africana, AMR: Americana, EAS: Asiática del este, EUR: Europea, SAS: Asiática del sur.

G= Ancestral A= Variación. Basada Ensembl Human GRCh38.p7 variación rs1801133 gen MTHFR

[http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=1:11795821-](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=1:11795821-11796821;v=rs1801133;vdb=variation;vf=1229077)

[11796821;v=rs1801133;vdb=variation;vf=1229077](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=1:11795821-11796821;v=rs1801133;vdb=variation;vf=1229077) Modificada por Lyons-Molano Jessica.

4.2.2 Genética del polimorfismo 1298A>C del gen *MTHFR*

El polimorfismo, de la secuencia del gen que codifica para la enzima, 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*), conocido como polimorfismo 1298A>C *MTHFR*, identificado con el número único rs1801131, al igual que sucede con el polimorfismo 677 C>T *MTHFR*, resulta en una enzima termolábil, una enzima debilitada, que no cumple adecuadamente su función⁽⁹⁶⁾, conduciendo al incremento en la concentración de homocisteína^{(85),(89)}, lo cual produce alteraciones en la salud humana⁽⁹⁷⁾, bien sea generando susceptibilidad para algunas enfermedades, alterando reacciones producidas por algunos fármacos⁽⁶⁶⁾, o bloqueando procesos importantes en ciclos metabólicos, como por ejemplo, la síntesis de ácidos nucleicos que normalmente se produce en el ciclo del ácido fólico^{(10),(45)}, de forma tal que limitará la replicación de algunos virus⁽⁸¹⁾ altamente infectantes como los retrovirus; los cambios producidos por este polimorfismo en vías metabólicas, con las diferentes consecuencias para el ser humano⁽⁹⁷⁾, pueden producirse por el polimorfismo

en sí, de manera individual, aunque son escasos los estudios y falta recopilar datos que demuestren la asociación con alteraciones en la salud humana; o de manera conjunta asociándose con otras variaciones polimórficas^{(98),(99)}, generando fenotipos diferentes que afectan de una u otra manera la salud⁽¹⁰⁰⁾.

La asociación más comúnmente estudiada respecto a las variaciones del gen *MTHFR*, es la producida por los polimorfismos más comunes de este gen, objeto de nuestro estudio, de esta forma el polimorfismo 1298A>C junto con el 677C>T del gen *MTHFR*, han demostrado tener importantes implicaciones en la salud durante diversos estudios⁽¹⁰⁰⁾, que se han podido replicar por varios grupos científicos comprobando su veracidad⁽¹⁹⁾.

Cuando en el gen *MTHFR*, se produce la sustitución de una adenina (A) por una citosina (C) en el nucleótido 1298, una variación tipo *missense* (ver [Figura 9](#)), que resulta en la sustitución de ácido glutámico por alanina en la posición 429 de la proteína (E429A)⁽⁷⁷⁾.

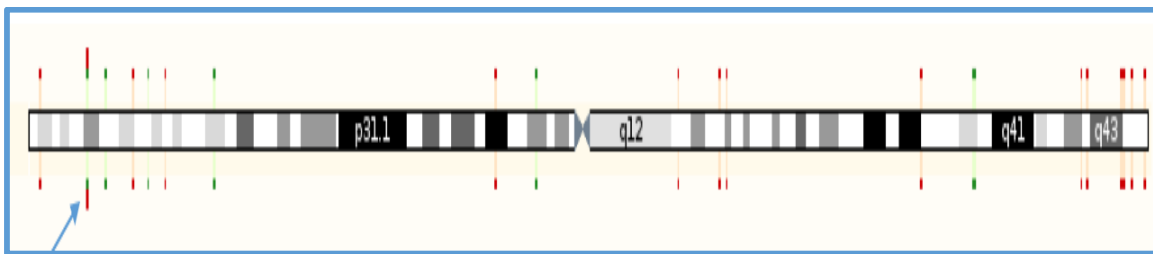


Figura 9. Ubicación SNP 1298 A>C del gen *MTHFR*.

Basada Ensembl ENSG00000177000; rs1801131. Modificada por Lyons-Molano Jessica.

Variaciones en las frecuencias genotípicas y alélicas entre poblaciones⁽¹⁰¹⁾, además de su propia variación dentro de una misma población en referencia a polimorfismos del gen *MTHFR*^{(20),(82)}, observadas en las [Tablas 4](#) y [5](#), pueden explicar a groso modo el comportamiento de las enfermedades comunes atribuidas a dichas frecuencias de los SNP de *MTHFR*.

4.2.3 *MTHFR* 677 C>T y 1298A>C y alteraciones en vías metabólicas

En el ciclo metabólico del ácido fólico y en sus interacciones con los ciclos del metabolismo de un carbono y de la homocisteína^{(6),(46)}, se ha atribuido responsabilidad de los SNP 677C>T y 1298A>C de *MTHFR*, en la catalización de la reducción de 5,10 metilentetrahidrofolato

(5,10-metilen THF) en 5-metil tetrahidrofolato (5- MeTHF), coenzima del folato requerida para formar metionina de la homocisteína (ver Figuras 5 y 6) que de alterarse aumentará los niveles de la misma homocisteína generando consecuencias patogénicas en el humano^{(70),(85),(96),(82)}.

Población	Frecuencia alélica	Frecuencia genotípica	Esquema
Todas	T: 0.751 (3759) G: 0.249 (1249)	T T: 0.573 (1435) G G: 0.072(180) G T: 0.355 (889)	
AFR	T: 0.849 (1122) G: 0.151 (200)	T T: 0.723 (478) G G: 0.026 (17) G T: 0.251 (166)	
AMR	T: 0.849 (589) G: 0.151 (105)	T T: 0.720 (250) G G: 0.023 (8) G T: 0.256 (89)	
EAS	T: 0.781 (787) G: 0.219 (221)	T T: 0.599 (302) G G: 0.038 (19) G T: 0.363 (183)	
EUR	T: 0.687 (691) G: 0.313 (315)	T T: 0.475 (239) G G: 0.101 (51) G T: 0.423 (213)	
SAS	T: 0.583 (570) G: 0.417 (408)	T T: 0.339 (166) G G: 0.174 (85) G T: 0.487 (238)	

Tabla 5. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo 1298A>C del gen *MTHFR* según fase 3 del proyecto 1000 genomas.

AFR: Africana, AMR: Americana, EAS: Asiática del este, EUR: Europea, SAS: Asiática del sur.

T= Ancestral G= Variación

Basada en Ensembl Human GRCh38.p7 variación rs1801131 gen MTHFR

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;g=ENSG00000177000;r=1:11785723-11806920;t=ENST00000376592;v=rs1801131;vdb=variation;vf=1229075# Modificada por Lyons-

Molano Jessica.

Diferentes estudios, han logrado demostrar que ambos polimorfismos (1298A>C y 677C>T del gen *MTHFR*), cuando se presentan de manera heterocigota, hacen que la actividad de *MTHFR* se disminuya ampliamente, condición que se exagera cuando se trata de personas que son homocigotas para el alelo mutante. Estos hallazgos se han comparado con personas con el genotipo *wild type*, corroborando de esta manera que los polimorfismo mencionados afectan significativamente la salud humana^{(91),(97),(100)}.

Del mismo modo, se considera que la condición de homocigocidad de la mutación se encuentra estrechamente relacionada con altas concentraciones de homocisteína secundarias a bajos niveles de folato en los eritrocitos⁽⁹⁹⁾. Inclusive, existen estudios que han demostrado que mejorando el estado nutricional del folato, bien sea con suplementos o con la incorporación de alimentos que contengan adecuada cantidad de ácido fólico en la dieta, mujeres mayores con el alelo mutante presente, disminuyen la concentración de homocisteína en el plasma, soportando positivamente la hipótesis que afirma que la homocigocidad se relaciona con niveles bajos de folato y que al regular dichos niveles puede cambiar la condición de susceptibilidad para algunas enfermedades que posee el homocigoto^{(93),(102),(103)}.

Sin embargo, estos hallazgos no se han evaluado en las diferentes poblaciones y aún está sin resolver, de manera definitiva, la pregunta de si la ingesta diaria recomendada (IDR) de folato, podría compensar de manera idónea la actividad reducida de la enzima *MTHFR* en individuos con al menos un alelo mutante, o si es necesario un aumento en los requerimientos diarios en los individuos con esta condición^{(93),(44),(49),(104),(105)}.

4.3 Gen *MTHFR* y salud humana

4.3.1 Aspectos de la salud humana relacionados con las variaciones en el gen

***MTHFR*: generalidades respecto a susceptibilidad y protección ante patologías humanas.**

Cada vez son más las asociaciones de los polimorfismos del gen *MTHFR* con las consecuencias patológicas o benignas en la salud humana. Desde que Lucy Wills y colaboradores en 1930 descubren en la levadura de cerveza una molécula hidrosoluble que le ayudaba a combatir las anemias^{(11),(12)}, la investigación sobre el folato con relación a la salud humana ha interesado a varios grupos científicos, quienes han logrado demostrar que alteraciones en los niveles de esta vitamina B9, bien sea por polimorfismos genéticos o por nutrición deficiente de folato, se relacionan con inestabilidad enzimática, principalmente de la metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*), enzima indispensable en el ciclo del folato, que a su vez se relaciona con ciclos metabólicos, como el ciclo de un carbono y de la homocisteína, y la cual al alterarse se torna inestable – débil -, afectando las reacciones

dependientes de ella, conduciendo a alteraciones en la concentración de homocisteína y de esta manera afectando la salud humana.

Enfermedades y rasgos fenotípicos asociados a variaciones en el gen *MTHFR*, algunos descritos en los Anexos 1 y 2, permiten corroborar los múltiples fenotipos característicos, algunos de estos asociados con patologías ampliamente estudiadas como los defectos del tubo neural^{(25),(72)}, las enfermedades cardiovasculares^{(27),(106),(89)}, y las enfermedades psiquiátricas^{(107),(108),(109)}, otros en cambio, se asocian a la respuesta farmacológica⁽⁹⁶⁾ al interferir con la eficacia de medicamentos haciéndolos más óptimos o aumentando su toxicidad causando susceptibilidad a reacciones adversas; el fluaracil, la leucovorina, y la oxiloplatina, hacen parte de los medicamentos afectados cinética y metabólicamente con las variaciones del gen *MTHFR*. Además de esto, también existe evidencia de asociación de las variaciones de este gen con varios tipos de cáncer⁽³⁷⁾ como el colorrectal^{(110),(111)}, cerebral⁽⁷¹⁾ y de seno^{(36),(105)}.

Referente a las asociaciones benignas, desde hace un par de años, investigadores han demostrado que la presencia de algunos polimorfismos en el gen *MTHFR*, se asocian con mejor rendimiento físico, aumento de velocidad y de masa muscular en atletas de alto rendimiento⁽¹¹²⁾, otros han descrito de forma lógica, basándose en cómo estos polimorfismos alteran las vías metabólicas del folato y del ciclo de un carbono, que dichas variaciones conducen a una producción de ácidos nucleicos inadecuada o anormal, protegiendo de este modo de enfermedades infecciosas⁽¹¹³⁾, por ejemplo, al reducir la capacidad de infestación de algunos virus que se valen de las purinas y pirimidinas para replicarse de manera efectiva^{(81),(83),(114)}.

La serie de estudios científicos realizados han llevado a describir múltiples variaciones en el gen *MTHFR*, principalmente variaciones de un solo nucleótido -SNP= *Single Nucleotide Polymorphism*- relacionados con afección directa en la salud humana⁽⁵⁰⁾. De estos SNP, algunos descritos en el Anexo 2, los más estudiados debido a sus diversas asociaciones con susceptibilidad a enfermedades, protección de infecciones, y alteración de fármacos, son los dos objeto de este estudio, el 677C>T y el 1298A>C⁽⁹⁹⁾.

La persistencia de estos polimorfismos en diferentes poblaciones a nivel mundial, ha sido

tratada de explicar por investigadores que afirman que la selección natural de los mismos puede deberse a su relación con eventos benéficos en la salud humana; de este modo estos dos polimorfismos, han sido protagonistas en estudios donde dependiendo de la enzima afectada o del paso alterado en alguno de los ciclos metabólicos en los que participa el folato, se tendrán consecuencias diferentes. La alteración de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa, fundamental en el ciclo del folato y en los ciclos metabólicos relacionados, es la más prevalente en las investigaciones, debilitada por variaciones del gen *MTHFR*, conduce a alteraciones de la homeostasis celular, creando susceptibilidad ante algunas patologías⁽⁶⁾, sin embargo, sigue siendo motivo de investigación, debido a la posición de algunos científicos que afirman que la ingesta de folato en niveles adecuados puede evitar la instauración de estas enfermedades⁽¹⁰²⁾; por otro lado, los cambios en la enzima *MTHFR* producen reducción de síntesis o síntesis anormal de ácidos nucleicos, alteración que juega un papel importante en el tema de la selección de estos polimorfismos, ya que se ha documentado que la adecuada síntesis de ácidos nucleicos facilita el ingreso de los virus y algunos parásitos al sistema inmune logrando evadir la respuesta ante macrófagos y linfocitos T, replicándose eficazmente y conduciendo a infestaciones generalizadas rápida y efectivamente, este es el caso de la malaria causada por el parásito *Plasmodium falciparum*, virus como la hepatitis B, citomegalovirus y algunos retrovirus dentro de los que se encuentra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), al conocer esto, se espera que de la misma manera los polimorfismos que logran alterar la enzima *MTHFR*, protejan al organismo disminuyendo la velocidad de replicación y evitando una infección mayor, que como es el caso del VIH se verá reflejado en un conteo estable de células CD4 - linfocitos T ayudadores -, que al aumentarse de manera descontrolada permiten que la infección por VIH progrese hasta la enfermedad altamente morbi-mortal conocida como Síndrome de Inmunodeficiencia humana (SIDA)⁽¹¹⁴⁾.

4.3.2 Rasgo, enfermedad, o característica asociada a polimorfismos 677C>T y 1298A>C del gen *MTHFR*

Desde que se descubre la molécula folato y con la posterior ley de fortificación de las harinas en la mayoría de los países, los científicos evidencian una importante disminución en la incidencia de algunas patologías humanas, hecho que atribuyen al aumento de consumo de

esta vitamina de manera preventiva^{(5),(23),(49)}. Centrándose en el folato, realizan descubrimientos genéticos de variantes en genes, como el *MTHFR*, que afectan enzimas principales de los ciclos metabólicos que lo involucran y se inician estudios de las variaciones en relación con la salud humana^{(97),(99)}.

4.3.2.1 Enfermedades que involucran el sistema nervioso

Los defectos del Sistema nervioso central (SNC) han sido el foco principal de los estudios en relación a con los polimorfismos del gen *MTHFR* por su alta comorbilidad. Estas enfermedades, dentro de las cuales se encuentran los defectos del tubo neural^{(115),(116)} y la espina bífida⁽¹¹⁷⁾ entre otras, se asocian a alteraciones del folato, el cual participa de manera indispensable en la síntesis de colina y adrenalina, y en la regulación de la homeostasis de la barrera hematoencefálica. Se conoce además, que concentraciones bajas de folato, se asocian a déficit cognitivo, debido a la transulfuración de la homocisteína, la cual es prácticamente inhibida a nivel cerebral, elevando de manera exponencial concentraciones de homocisteína a este nivel, predisponiendo a eventos vasculares, que su vez, por la relación existente entre las concentraciones elevadas de homocisteína y los niveles de glutamato, pueden desencadenar neurotoxicidad^{(41),(79),(98)}, por otro lado, estudios han logrado demostrar, que la fortificación de las harinas junto con el consumo de folato de manera adecuada ha tenido gran impacto en la homeostasis celular y con ello en la reducción de defectos del tubo neural⁽¹⁸⁾.

Durante el periodo de gestación, el déficit de folato, conlleva a afecciones graves en el feto, defectos que en su mayoría concluyen con pérdidas tempranas del embarazo, pero si es el caso y el embarazo llega al término adecuado, por encima de la semana 37, las patologías a nivel del SNC, siguen siendo los defectos predominantes, principalmente defectos del tubo neural, con calidad de vida deficiente y pronósticos pobres⁽¹⁷⁾; la susceptibilidad para estos defectos, se ha relacionado y confirmado en múltiples investigaciones a nivel mundial, algunos estudios asocian la presencia de los polimorfismos 677 C>T y 1298A>C del gen *MTHFR* bien sea de manera individual o combinados^{(118),(119)}, de cualquier manera, la base de la alteración en el tubo neural causada por las variantes del gen metilentetrahidrofolato reductasa, se puede resumir en alteraciones a nivel de la metilación del ácido fólico⁽²⁵⁾, y es claro que la prevención definitivamente se encuentra en relación con el consumo y

funcionamiento metabólico adecuado del folato⁽¹²⁰⁾.

Entre otras afecciones que estos polimorfismos pueden generar en el SNC, eventos trombóticos e infartos cerebrales, han sido estudiados por grupos de investigación, con el común denominador de que las alteración se deben a la debilidad causada por los SNP en la enzima MTHFR y la consecuente concentración elevada de homocisteína^{(58),(73)}.

4.3.2.2 *Enfermedades en relación con el sistema cardiovascular*

El aumento anormal de la homocisteína en el plasma, generado por polimorfismos del gen *MTHFR*, altera el metabolismo del folato, y consecuentemente desencadena una serie de alteraciones en el equilibrio metabólico conduciendo a un desbalance que se ha asociado con riesgos cardiovasculares específicos, principalmente debido a la esclerosis producida en los vasos sanguíneos que genera susceptibilidad a daños vasculares importantes, generando riesgo de hipertensión arterial^{(121),(122)}, eventos trombóticos⁽⁵⁸⁾, insuficiencias y fallas renales por causas netamente vasculares⁽²⁷⁾, vasculopatías^{(28),(106)}, trombosis venosas⁽¹²³⁾, e incluso enfermedad coronaria⁽⁸⁹⁾ que puede culminar en infarto agudo de miocardio⁽⁷¹⁾. Resumiendo, las evidencias encontradas acerca de los daños cardiovasculares asociados con las variaciones del gen *MTHFR* objeto de nuestro estudio, no se contradicen y todas llevan a la alteración en la homocisteína debido a una enzima MTHFR debilitada que conduce sin lugar a duda a engrosamiento de las paredes de los vasos sanguíneos con sus consecuencias inevitables ya nombradas.

En el 2015, se realizó un estudio para crear una prueba genética, que permitiera detectar estos polimorfismos en pacientes con homocisteína elevada, y asociarla con enfermedades cardiovasculares tempranas y formación de trombos, para que en la práctica clínica se tomaran las medidas preventivas para este tipo de enfermedades.

El estudio de la prueba genética para SNP del *MTHFR*, al ser positiva, indicaba presencia de los polimorfismos más comunes para este gen; no obstante aunque resultó ser eficaz para detectar predisposición a enfermedades cardiovasculares tempranas y enfermedades trombóticas, al poco tiempo del estudio, la *American Heart Association*, el *College of American Pathologists* y el *American College of Medical Genetics*, decidieron no

recomendar el uso de esta prueba, argumentando que antes de realizarla se debía contar con los niveles de homocisteína y que estos estuvieran elevados, y debido a que la medida de estos niveles no se hace de manera rutinaria, sumado a que aún está en estudio la asociación de enfermedades cardiovasculares con la elevación de la homocisteína, no tendría razón practicar esta prueba de manera habitual.

4.3.2.3 *Enfermedades psiquiátricas*

Hace algunos años, Gilbody⁽¹⁰⁷⁾, científico conocido por sus estudios en relación al comportamiento humano y enfermedades mentales, decide experimentar sobre él mismo, exponiéndose a una dieta con bajo consumo de folato^{(29),(107)}, logrando demostrar que concentraciones bajas de esta vitamina, afectan las vías metabólicas indispensables, debilitando la enzima principal del ciclo del folato, 5- metilentetrahidrofolato reductasa, con la subsecuente alteración en la síntesis de neurotransmisores secundario a un aumento en la concentración de homocisteína, desencadenando síntomas predominantes de depresión; los hallazgos del científico, fueron replicados exitosamente, y a parte de los síntomas depresivos, se demostró que el déficit de ácido fólico conduce a anemia megaloblástica⁽¹²⁴⁾, la cual en un 56% de los casos genera comportamientos maníaco depresivos. Los estudios en relación con las patologías psiquiátricas y los polimorfismos del gen *MTHFR* realizados por Gilbody y sus colaboradores, fueron más allá de lo que podría imaginarse asociando estas variantes a múltiples desordenes a nivel de la mente humana⁽¹⁰⁷⁾. En otros estudios, demuestran que el neurotransmisor serotonina, presente en las neuronas, y encargado de la expresión de sentimientos de alegría y depresión, se encuentra estrechamente relacionado, de manera directamente proporcional, a la concentración del folato, en otras palabras, a más bajas concentraciones del folato, mayor el riesgo de entrar en estados depresivos⁽³⁰⁾.

La cantidad de patologías psiquiátricas que se han investigado en relación con estos polimorfismos son variadas, grupos de investigación han logrado demostrar asociación de los polimorfismos con alteraciones en sustancias cerebrales importantes como lo son los neurotransmisores que desencadenan signos y síntomas mentales, que afectan el comportamiento humano, de este modo se han detectado asociaciones con enfermedades del espectro autista^{(125),(126)}, con síntomas negativos de la esquizofrenia^{(31),(108),(109)}, pero estas dos enfermedades aún siguen en investigación para determinar la causa clara de la asociación con

los polimorfismos que afecten la enzima MTHFR.

Así como se ha podido comprobar el efecto sobre los neurotransmisores, se conoce que alteraciones en el ciclo del folato por parte de las variantes del gen *MTHFR*, también afectan el metabolismo lipídico en asociación con la homocisteína elevada y concentraciones plasmáticas bajas de folato y vitamina B12, con estas alteraciones se predispone no solo a la esclerosis de los vasos sanguíneos y las consecuencias cardiovasculares, sino que logra afectar la capacidad de la memoria humana, llevando de esta manera a demencias que afectan la tercera edad del humano, dentro de las cuales se destacan las tipo Alzheimer^{(127),(128)}.

4.3.2.4 Anomalías cromosómicas

Aunque se han descrito defectos congénitos asociados a polimorfismos del gen *MTHFR* a nivel del SNC, a nivel cardíaco, vascular, óseo, renal, sexual e incluso a nivel de la psiquis; los defectos congénitos por alteraciones cromosómicas tipo aneuploidías, poliploidías, inserciones, deleciones o translocaciones, secundarias a variaciones en el gen *MTHFR* tienen poca evidencia científica registrada en las diferentes bases de datos^{(20),(129),(130),(131)}.

El folato, durante el paso por el ciclo de su mismo nombre y junto al metabolismo de un carbono, contribuye a la homeostasis celular; sin embargo, ante la presencia de los polimorfismos 677C>T y 1298A>C del gen *MTHFR*, la enzima MTHFR, principal del ciclo del folato, se debilita causando fallas en el proceso de metilación, generando hipometilación de islas CpG, conduciendo a inestabilidad cromosómica con la subsecuente segregación inadecuada de los cromosomas, llevando no solo a la que ha sido por excelencia la anomalía cromosómica más estudiada en todo nivel, la trisomía 21, más conocida como síndrome Down^{(33),(34)}, sino pudiendo conducir a otras afecciones cromosómicas como lo demostró un grupo investigativo en relación con la monosomía X, conocida como síndrome Turner⁽³⁵⁾, e incluso pudiendo ser la causa de microdeleciones en cromosomas sexuales que lleven a infertilidad⁽¹³²⁾, y quizá de muchas más poliploidías, aneuploidías y demás cromosomopatías aún sin estudios al respecto.

4.3.2.5 Infertilidad y pérdidas recurrentes de embarazos

Los temas en relación con la concepción y la fertilidad humana, siempre han sido de interés no solo a nivel científico sino de la población general quizá por las implicaciones evolutivas que se le asocian y últimamente por los avances en terapia génica y medicina personalizada. En el ser humano, la imposibilidad de concebir un hijo o de llevar un embarazo a un término adecuado, se asocian a múltiples patologías y un sin número de causas posibles. En lo que respecta a las variaciones en el gen *MTHFR*, estudios de los polimorfismos 677C>T Y 1298A>C, han mostrado relación tanto con casos de infertilidad como con casos de pérdidas recurrentes de embarazo^{(32),(133),(134),(135)}. Los SNP, al debilitar enzimas del ciclo del folato, afectan el proceso normal de metilación generando concentraciones plasmáticas de homocisteína anormales que de manera directa causan maduración anormal de los oocitos⁽¹³¹⁾, microdeleciones en el cromosoma Y que conducen a azoospermia⁽¹³²⁾, e incluso conteo espermático menor de lo normal⁽¹³⁶⁾; estos cambios son los que pueden conducir a infertilidad bien sea masculina o femenina, o en dado caso llevar a errores en el proceso de maduración embrionaria generando abortos espontáneos recurrentes.

En los últimos años, el porcentaje de abortos antes de la semana 8 de gestación ha aumentado a nivel mundial, muchas de estas pérdidas se quedan sin estudios que puedan indicar la causa, sin embargo, algunos de estos casos pueden ser secundarios a patologías que causen defectos congénitos o cromosomopatías que culminen en falla en el progreso del embarazo y dichas alteraciones pueden deberse a todos los cambios que generan los polimorfismos del gen *MTHFR* en el organismo humano^{(118),(135)}.

4.3.2.6 Procesos de carcinogénesis

En los últimos años, han cobrado importancia científica, los estudios acerca de las variantes en la secuencia de *MTHFR*, que afectan el ciclo del folato, debido a las evidencias encontradas de su relación directa con carcinogénesis^{(36),(105),(137)}, considerando principalmente que defectos de vitamina B9, alteran procesos relacionados con la metilación y con la reparación de ADN, aumentando la sensibilidad a mutaciones, que en realidad es el común denominador en los procesos de cáncer^{(79),(138)}. Dentro de las múltiples hipótesis al respecto, toma fuerza la subsecuente hipometilación de islas CpG, que produce desregulación

de la expresión génica normal, generado aumento en algunos ARNm, en algunos protooncogenes o en genes supresores de tumor como el p53⁽⁸²⁾; sin embargo, las hipótesis planteadas en asociación con tumorigénesis y alteración de la vía de folato, aún no están claramente definidas ni aprobadas y se deben reforzar estudios para llegar a una conclusión final de dicha asociación.

En el tema del cáncer y *MTHFR*, los grupos de investigación, han podido demostrar que, principalmente los polimorfismos 677C>T y 1298A>C, se asocian con riesgo para desarrollar leucemia linfoblástica aguda⁽¹³⁹⁾, que el metabolismo de fármacos antineoplásicos como el capecitabine utilizado en pacientes con cáncer colorrectal, se ve afectado por estas variaciones polimórficas en el gen *MTHFR* conduciendo a toxicidad en los pacientes, y centrándose en el cáncer de seno, los estudios además de demostrar que se tiene una susceptibilidad para desarrollarlo cuando se cuenta con estos polimorfismos, también han podido corroborar que la ingesta de folato en niveles mucho más altos del requerimiento diario pueden reducir el riesgo de desarrollar neoplasias a este nivel^{(36),(105)}. Las revisiones de la literatura acerca de estos dos polimorfismos asociados con el riesgo de cáncer es amplia y aún está en estudio⁽³⁷⁾, sin embargo, todos los estudios, se centran en el metabolismo del folato y sus implicaciones, y aunque existen estudios al respecto desde los años 90, en los últimos años se investigan los puntos exactos que se alteran en los ciclos metabólicos y que pueden afectar los procesos de metilación o alterar genéticamente una persona conduciendo a heterogeneidades y pleiotropía en su descendencia, considerando que de esa forma, variaciones en este solo gen *MTHFR* puede llevar a cambios tumorales a diferentes niveles; el cáncer de seno, colorrectal y las leucemias, han sido los principales temas de interés al respecto^{(41),(105),(110),(111),(140),(141),(142)}.

4.3.2.7 Enfermedades infecciosas

El comportamiento del organismo humano con polimorfismos en el gen *MTHFR* respecto a algunas enfermedades infecciosas, es una de las razones principales para que exista selección natural de estas variaciones, para que persistan estos SNP a través del tiempo y la evolución, ya que a pesar de su relación con susceptibilidad para diferentes patologías, también se considera que puede generar efectos benéficos, por ejemplo, la alteración que producen estos SNP en el ciclo del folato inhibiendo la síntesis adecuada de ácidos nucleicos, disminuye la

capacidad de replicación de algunos virus y parásitos^{(74),(113),(142)}, evitando el daño total al sistema de defensa del ser humano, limitando el proceso de infección permitiendo ser atacados con medicamentos óptimos que puedan detener su progreso; esto es lo que se cree que sucede con el virus VIH, que ante estos polimorfismos llega a un control en el conteo de células de defensa TCD4+ de manera estable, deteniendo el progreso a la enfermedad SIDA altamente morbimortal.

El hecho de que variaciones del gen *MTHFR* no permitan que se realice de manera adecuada la síntesis de ácidos nucleicos al debilitar la acción de la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa, retrasando la replicación de microorganismos infecciosos, o en algunos casos, conduciendo a resistencia total a la infección por microorganismos que atacan el sistema inmune de manera progresiva y evaden la acción de muchos de los tratamientos que se han propuesto bloqueando una o algunas de las etapas de la historia natural de la infección, ha permitido que las diferentes empresas farmacéuticas, diseñen medicamentos que mejoren la calidad de vida⁽¹⁴³⁾, aunque tratamientos ideales y definitivos, siguen siendo un enigma y un reto para los investigadores, enfocados desde los últimos años en el manejo personalizado, teniendo en cuenta que en todas las patologías que aquejan al ser humano, sin importar que tan eficaz sea un medicamento, no funcionará de la misma forma para todos los sujetos, así mismo, las infecciones no atacan con la misma agresividad a todas las personas expuestas; esto se debe básicamente a que la composición genética de cada población de seres humanos es totalmente diferente⁽¹⁴⁴⁾ e incluso los humanos dentro de la misma población también difieren entre sí, así que los tratamientos adecuados deben estar asociados al estudio genético de cada afectado trazando perfiles de riesgo no solo poblacionales sino personales, razón por la cual la prevención de algunas infecciones como las causadas por el VIH tengan en su punto más fuerte la prevención en los jóvenes como tratamiento eficaz^{(145),(146)}.

Dentro de los parásitos que se han asociado con las acciones que pueden ejercer los polimorfismos del gen *MTHFR*, grupos de investigación se han encargado de estudiar a la malaria, una serie de estudios con ratones de laboratorios ha demostrado como la reducción de *MTHFR* junto con la subsecuente hiperhomocistinemia, hace que la infección se limite más pronto de lo que se esperaría sin avanzar a estadios que comprometan la vida, estos

estudios aún no han sido llevados a cabo en el humano pero se espera que el comportamiento sea similar⁽¹¹³⁾.

Respecto a los virus, se encuentra importante información sobre el citomegalovirus (CMV)⁽¹⁴²⁾, el virus de la hepatitis B y C⁽⁷⁴⁾, en relación con variantes en el gen *MTHFR* y la resistencia que los cambios en el ciclo del folato pueden causar, sin embargo y aunque cada vez se amplía la investigación en relación con los polimorfismos *MTHFR* y el VIH, la información es escasa pero los diferentes grupos de investigación han tenido hallazgos similares, todos ellos afirman que el ingreso del virus al sistema inmune humano y su posterior replicación se ve afectada por la síntesis no adecuada de ácidos nucleicos necesarios y esto a su vez es consecuencia de las alteraciones que producen los SNP *MTHFR* al alterar el ciclo del folato^{(80),(114),(147),(148),(149),(150)}.

4.4 Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

4.4.1 Generalidades

En los años 80 del siglo XX, el Centro de Control de Enfermedades –CDC– advierte del aumento en la incidencia de infecciones poco comunes como las neumonías por *Pneumocystis carinii*, y la presencia de sarcomas de Kaposi en jóvenes previamente sanos con conductas homosexuales, infecciones que normalmente se presentaban solo en personas con algún grado de inmunosupresión o tumores^{(151),(152)}.

Posterior a la comunicación de la CDC, se reportan casos en la población europea y en un corto tiempo se fueron multiplicando de manera exponencial a nivel mundial, sin lograr determinar la causa exacta, pero reconociendo que se trataba de una infección resistente, difícil de tratar^{(153),(154)}. La infección rápidamente se identificó como una epidemia, y se determina que se limita a personas con ciertas condiciones, dentro de las cuales se encuentran jóvenes con conducta homosexual, personas adictas a drogas psicoactivas intravenosas, y aquellos con viajes recientes a lugares considerados como exóticos^{(152),(155)}.

Para 1981, luego de identificar como común denominador la afección del sistema inmune en los afectados, se reconoce la infección a nivel mundial como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), y sólo hasta 1983 se identifica el primer caso de un paciente con esta

infección no perteneciente a la comunidad homosexual y no consumidor de drogas, por lo que buscar la causa se convierte en un reto para los científicos; hacia 1984, en Francia en el Instituto Pasteur y en Estados Unidos en el Instituto Nacional del Cáncer (NIH) en Bethesda, los representantes científicos Luc Montagnier y Robert Gallo, son considerados como co-descubridores de la partícula VIH y logran que sea detectada en sangre para mayo de ese mismo año^{(152),(155),(156),(157)}.

Respecto a la Epidemiología de esta infección, desde los primeros casos, se logró identificar grupos de riesgo, y se determinó que la vía de transmisión no era de manera incidental persona a persona, sino que se transmitía por fluidos corporales principalmente mediante vía sanguínea y sexual; y aunque al inicio se limitara a drogadictos y homosexuales, poco a poco los casos en heterosexuales especialmente en mujeres, fueron igualándose, casi duplicando los casos de aquellos orientados por conducta homosexual^{(157),(158)}.

Durante los 80 del siglo XX, el contagio de VIH posterior a transfusiones sanguíneas fue elevado, pero gracias a estrictos controles y análisis minucioso de las muestras de los donantes, esta forma de contagio disminuyó ampliamente, llegando a un porcentaje casi nulo⁽¹⁵⁹⁾.

Lamentablemente para los años 90 del mismo siglo, los casos de infección por VIH y de la enfermedad SIDA aumentan en la población infantil, llegando en algún momento a considerarse la tercera causa de infección mortal en niños; la falta de controles prenatales y desconocer que no solo podía ser transmitida en el momento del parto, sino que también la lactancia era un factor de riesgo, llevo al aumento de casos, pero en la actualidad, los departamentos de infectología, pediatría y ginecología a nivel mundial se esfuerzan para evitar transmisión en menores^{(160),(161)}.

En la Figura10, puede observarse la prevalencia de la infección por VIH a nivel mundial en población adulta; respecto a la incidencia, desde los años 80 hasta la actualidad, por la alta capacidad del virus para evadir lo que podría erradicarlo, ha tenido oscilaciones representadas en altas y bajas a nivel mundial.

El afán por encontrar el tratamiento adecuado, ha llevado a las empresas farmacéuticas a

generar múltiples medicamentos que actúan reduciendo o limitando la infección por este retrovirus y aunque al inicio, los tratamientos no eran tan efectivos y condujo a una tasa de mortalidad alta con respecto a los contagiados, en la actualidad, los tratamientos han llegado a producir una calidad de vida adecuada aumentando la supervivencia y reduciendo algunas complicaciones asociadas a esta infección⁽¹⁴³⁾. Sin embargo la cura definitiva, aún es el objetivo de la comunidad científica a nivel mundial y los intentos por crear una vacuna^{(162),(163)} segura y eficaz han prevalecido por más de una década sin resultados contundentes debido a la capacidad que tiene el virus para adaptarse, evadir lo que para este virus sea una amenaza y replicarse cada vez más rápido afectando las células T que son el principal componente de defensa del sistema inmune humano^{(153),(154),(158)}.

El resumen cronológico de la historia del VIH se puede encontrar en el Anexo 3.

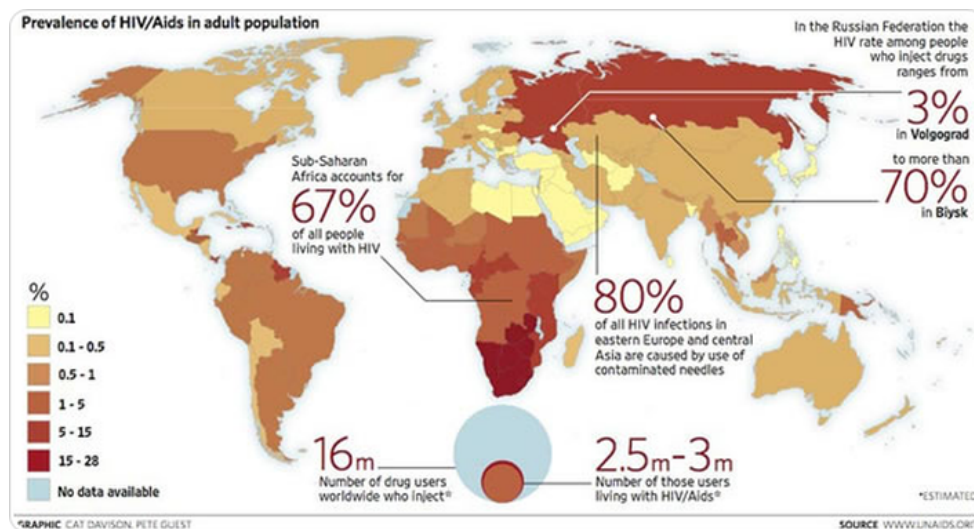


Figura 10. Prevalencia de VIH a nivel mundial.

Basada en <http://andreeruzz.wixsite.com/masvidamenossida/single-post/2016/08/25/Historia-del-VIH>

Modificada por Lyons-Molano Jessica

4.4.2 Características del VIH

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), según la OMS (Organización Mundial de la Salud), se trata de un virus que al ingresar al huésped transforma el sistema de defensa, deteriorándolo progresivamente a medida que invade célula a célula. La inmunodeficiencia causada, puede avanzar rápidamente a estadios en donde se generan una serie de signos y síntomas en los afectados que se reúnen en la enfermedad conocida como SIDA (Síndrome

de Inmunodeficiencia Adquirida); enfermedad que abre la puerta a más de 20 comorbilidades e infecciones oportunistas concomitantes, altamente mórbidas, e incluso se han investigado procesos tumorales en relación con VIH^{(153),(154)}.

La transmisión, como se comentó en las generalidades del VIH, se realiza por contacto directo con mucosas y secreciones de una persona afectada; se describen entonces las relaciones sexuales, por vía vaginal, oral o anal; las transfusiones de sangre contaminada, el uso de agujas o jeringas compartidas sin asepsia ni antisepsia por parte de consumidores de sustancias psicoactivas intravenosas; y la transmisión vertical que incluye contagio al recién nacido durante el parto y la lactancia materna^{(160),(164),(165),(166)}.

Para evitar el contagio y disminuir la incidencia de esta infección, la OMS generó un proyecto de Estrategia Mundial del Sector de la Salud contra el VIH, propuesto para los años 2016–2020, desarrollado completamente entre marzo y diciembre del 2015, con una versión abreviada disponible en diferentes idiomas en la página de la Organización Mundial de la Salud y al alcance de cualquier interesado (http://www.who.int/hiv/draft-hiv-strategy-2016-2021_es.pdf?ua=1).

Debido a su virulencia, se han descrito dos tipos de VIH ambos genéticamente similares, constituidos por dos genomas idénticos con ARN de cadena sencilla cada uno con 9749 nucleótidos y capaces de llevar hasta el desenlace de la enfermedad SIDA: el VIH tipo 1 (VIH-1), responsable de la mayoría de los casos, se considera más virulento, y el VIH tipo 2 (VIH-2) posee una virulencia reducida. Como todos los virus, no tienen autonomía para replicarse por sí mismos, para hacerlo requieren infectar otras células, es decir solo se replican cuando logran insertar su información genética en la célula huésped, con lo que logran manipular todas las actividades de la célula afectada creando de esta manera nuevas copias virales. Las células huésped predilectas para este virus, deben contar con receptores CD4, preferiblemente linfocitos T, para posteriormente unirse a este tipo de célula (linfocito TCD4) e infectarlas; estas células pertenecientes al sistema inmunitario, siendo unas de las más importantes dentro de las células de defensa del ser humano, cuando son invadidas por este tipo de virus, no son capaces de defendernos y el sistema inmune se hace deficiente permitiendo que el VIH se replique una y otra vez. Otras de las células que prefieren estos retrovirus VIH, son las células dendríticas y los macrófagos, ambas pertenecientes al sistema

inmune humano y aunque no se afectan tanto como los linfocitos T CD4, en los estudios de tratamiento de esta infección, se consideran motivo importante de persistencia de infección debido a que la mayoría de medicamentos antirretrovirales no actúan en ellas como tal, sino que son dirigidos a los LTCD4, permitiendo de esta manera que permanezca infectado el huésped^{(153),(167),(170)}.

Los virus de inmunodeficiencia humana – VIH-, pertenecen a la familia de los *Retrovirus*, más exactamente al subgrupo *Lentivirus*, y son nombrados de este modo ya que el intervalo que transcurre entre la infección inicial y el comienzo de los síntomas principales es prolongado^{(168),(169),(170)}.

La estructura del virión es de forma icosaédrica, con un diámetro entre 80-120nm, con tres capas protectoras de su material genético. La más externa se trata de una envoltura formada por lípidos derivados de la propia célula huésped y entre 70-75 espículas de glicoproteínas virales gp120 y gp41 que son las que se ponen en contacto uniendo el virus a la célula huésped; la segunda capa conocida como intermedia, cuenta con proteínas estructurales y con cuatro enzimas encargadas de darle soporte y de permitir la inserción de su información genética a la célula huésped, estas son: transcriptasa inversa (ADN polimerasa y ribonucleasa), proteasa e integrasa. El genoma viral, es decir toda la información genética de este virus, se ubica en la capa interna, en la región central del virión y está conformado por dos copias de ARN con genes que codifican para las proteínas que necesita el VIH para realizar su replicación^{(168),(171),(172)}.

De manera general, la infección por este virus se produce porque la glicoproteína gp120 se adhiere a los receptores CD4 de los linfocitos T, a los macrófagos y a las células dendríticas, y a algunos correceptores de la membrana celular (CCR5 o CXCR4); ya fusionado con la célula huésped, el virión VIH entra en la célula y se replica mediante la transcriptasa inversa que convierte el ARN en ADN; la copia completa de ADN se fragmenta en pequeñas partes funcionales, que se integran en el ADN del huésped y se denomina “provirus” en ese momento. Al activarse en esa célula la información del ADN se transfiere a una molécula de ARNm que contiene la información genética viral y la del huésped, se transporta del núcleo al citoplasma, la información contenida en el ARNm se traduce y origina proteínas de la envoltura y del núcleo del VIH; éstas se procesan y se unen con moléculas de ARN viral y

forman nuevas partículas virales infecciosas que salen de la célula y de esta manera ya se ha replicado el VIH^{(168),(171),(172)}.

En la Figura 11, se puede observar en forma detallada la estructura y la distribución de todos los componentes del virión que le permiten ser el virus altamente infectante que es.

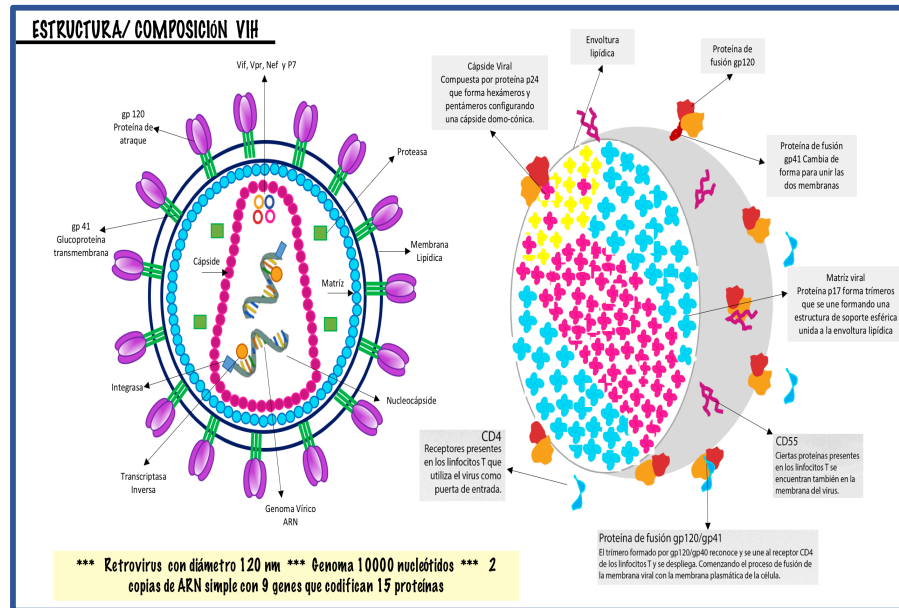


Figura 11. Estructura del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

Basada en: https://lh5.googleusercontent.com/-syeEUa6yJEQ/TX0dmjR5iQI/AAAAAAAAAR8/3E7f9p61UMk/s1600/800px-HIV_Viron_es.png y

<https://flagellum.wordpress.com/2013/12/17/arquitectura-de-un-virus-del-sida/> Modificada por Lyons-

Molano Jessica

4.4.3 Genoma del VIH

Los dos diferentes tipos diferentes del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), poseen un genoma complejo, y con patogenicidad diferente. En realidad, los genomas de ambos tipos de VIH, cuentan con los tres tipos de genes estructurales de los *Retrovirus*, estos genes: *gag*, *pol* y *env*, permiten codificar proteínas para que la replicación de estos tipos de virus se realice de manera eficaz; sin embargo, la diferencia entre el VIH y los otros *Retrovirus*, es que el VIH cuenta con seis genes adicionales, los cuales hacen que pueda evadir algunas reacciones del sistema de defensa y permiten que se siga replicando sin parar, estos genes son *tat*, *vpr*, *rev*, *vif*, *nef* y en VIH-1 *vpu* mientras que en VIH-2 *vpx*. En la Figura 12 se puede observar la distribución de los diferentes genes, en la estructura del genoma del VIH^{(169),(171)}.

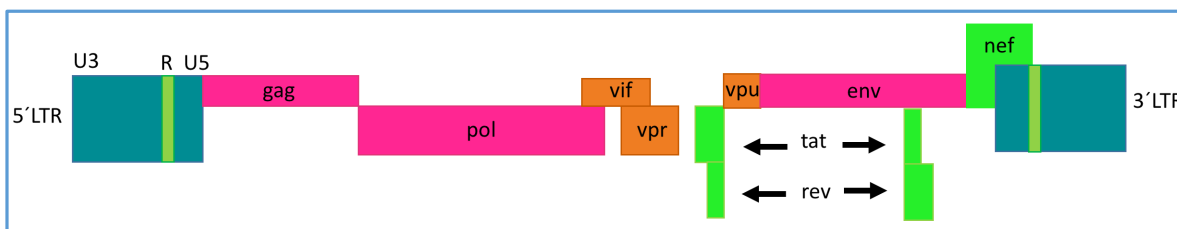


Figura 12. Genoma del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

Basada en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/sida-vih.html> Modificada por Lyons-Molano Jessica

A continuación en la Tabla 6 encontrará la función de los genes que conforman el VIH y en la Tabla 7, podrá ver la descripción por categoría de los genes que conforman el VIH.

Gen	Función
Env	Codifica para las glicoproteínas de envoltura (gp 160, gp 120 y gp 41)
Gag	Codifica para las proteínas estructurales (p55, p24 y p17)
Pol	Codifica para la transcriptasa reversa, proteasa (p66, p51 y p31), integrasa y ribonucleasa
Nef	Se cree que disminuye la expresión viral pero en realidad su función es desconocida
Vif	Promueve la infectividad de virus libre
Tat	Promueve la infectividad de virus libre
Rev	Regulador de la expresión de los genes estructurales, aumenta la replicación viral, regula de forma negativa a Nef
Vpr	Activa débilmente la transcripción
Vpu	Necesario para liberar de manera eficiente el virión

Tabla 6. Genoma del VIH.

Gráfica Basada en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/sida-vih.html> Modificada por Lyons-Molano Jessica

Los genes del VIH, pueden dividirse en tres categorías: 1. Genes estructurales (gag), 2. Genes de transactivación los cuales son genes esenciales para la replicación in vitro y 3. Genes accesorios que no son esenciales para la replicación in vitro. El genoma del VIH en sí tiene 9 kb, los genes estructurales y los de transactivación son iguales para ambos tipos de VIH,

sin embargo algunas variaciones en los genes accesorios, son los responsables de que el VIH tipo a tenga mayor patogenicidad con respecto al tipo 2^{(169),(171)}.

Tipo de Gen	Descripción
Genes estructurales (Gag)	*Codifica componentes proteicos de la parte central-interior (p17; p24; p9 y p7) núcleo viral. (cápside (CA), matrix (MA),nucleocápside(NC)) CA: se une a las ciclofilinas; NC: se une al ARN; MA: posee una señal de localización nuclear (NLS). Pol: enzimas: transcriptasa inversa (RT); ARNsa H; proteasa (PR); integrasa (IN). RT y PR son los objetivos principales de los fármacos antivirales. IN contiene NLS; RT es responsable de la mutación viral. Env: envoltura viral (glicoproteínas de superficie (gp120/SU), transmembrana (gp41/TM)). El gp120/SU se une al receptor CD4 y el TM se funde con la membrana celular.
Genes de transactivación	Genes esenciales para la replicación in vitro: Tat: transactivador de la transcripción viral, se une a la región afín Tar del ARN, acelera la transcripción viral. Rev: regula la expresión viral, se une a una región afín RRE del ARN, regula el transporte y unión de las secuencias del ARN viral.
Genes Accesorios	genes no esenciales para la replicación viral in vitro. Nef: factor negativo (nombre erróneo), disminuye la actividad de los CD4; MHC-I; se une a las quinasas celulares, esencial para la inducción de la enfermedad <i>in vivo</i> . Vpu: proteína viral desconocida: regula a la baja el CD4, MHC-I; promueve la liberación viral, excepto en el VIH-2. Vif: factor de infectividad viral: facilita la maduración del virión. Vpr: proteína viral regulatoria: detiene la proliferación celular, contiene un NLS. Vpx: proteína viral X (solo en los VIH-2): permite la infección de los macrófagos y la diseminación viral.

Tabla 7. Genes que conforman el virus de la inmunodeficiencia humana VIH.

Basada en: <http://www.biologia.edu.ar/viruslocal/virus%20de%20la%20inmunodeficiencia.htm>

Realizada por Lyons-Molano Jessica

El 8% del genoma completo del VIH, contiene ocho áreas diferentes de superposición de codificación; una fuerte presión selectiva de manera simultánea en los genes *tat* y *rev* del

VIH hace que estos dos sean primordiales para la replicación del virus, *tat* por medio de interacciones con factores de transcripción del huésped (principalmente con uno llamado P-TEFb) y un elemento de respuesta de transactivación (TAR) que no es más que ARN en el extremo 5' de los transcritos víricos, activa la elongación transcripcional en el promotor del VIH-1; mientras que *rev* facilita la exportación nuclear de ARNs virales que codifican proteínas esenciales de fase tardía y ARN genómico para envasado. Estas interacciones requieren de una síntesis adecuada de ácidos nucleicos y una homeostasis celular adecuada para que al realizarse dichas interacciones el virus logre replicarse de manera adecuada hasta debilitar de manera progresiva el sistema inmune humano^{(169),(171)}.

4.4.4 Ciclo de vida del Virus de inmunodeficiencia humana, historia natural del VIH y resistencia natural a la infección

La instauración de la infección por el retrovirus de la inmunodeficiencia humana, se realiza gradualmente debido a que el VIH durante su ciclo de vida, debe recorrer siete pasos para destruir el sistema inmunitario, los pasos (etapas) han sido estudiados ampliamente y son denominados: 1. Adsorción, 2. Penetración, 3. Transcripción inversa, 4. Integración, 5. Transcripción, 6. Ensamblaje y 7. Gemación⁽¹⁷³⁾. Las características de cada uno de estos pasos se encuentran descritas en la Tabla 8.

El principal objetivo de este virus, la destrucción del sistema inmunitario, es logrado paulatinamente al atacar las células que defienden al humano durante cualquier agresión, los linfocitos T CD4+, también llamados linfocitos T ayudadores por la función que cumplen y su importancia en la inmunidad; la alta virulencia de este virus es generada ya que se replica usando el mismo mecanismo que tienen las células CD4+ para defendernos, es decir, las invaden y al mismo tiempo se van replicando en lugar de dejar que cumplan su función de defensa ante la agresión^{(170),(173)}.

Resumiendo el proceso de infección, una vez el virus ingresa al organismo, localiza a las células linfocitos T CD4+ (también conocidos como linfocitos ayudadores o *helper*), e inicia su reproducción de manera progresiva, propagándose lentamente hasta alcanzar el objetivo de evadir acciones del sistema de defensa humano y lograr destruirlo creando una inmunodeficiencia con repercusiones altamente mórbidas en el humano⁽¹⁷³⁾.

Etapa	Descripción
Adsorción	El VIH infecta células que tengan en su superficie la proteína CD4 (Linfocitos T colaboradores y macrófagos principalmente). Glicoproteína de superficie del virus, gp120, permite que el virus se una al CD4 de la superficie de la célula. Posterior a esto, gp120 interacciona con el receptor de quimioquinas CCR5 (proteína del macrófago) que actúa como correceptor para el VIH CCR5 + CD4 forman el sitio de anclaje para que la envoltura del virus se fusione con la membrana celular. Si la célula infectada es un linfocito T coadyuvante el correceptor expresado en la superficie es el CXCR4. El correceptor CCR5 es requerido para la unión del VIH a los macrófagos. Existen individuos que expresan una variante de la proteína CCR5 que no une al VIH y por lo tanto no adquieren la infección.
Penetración	El virus penetra en la célula mediante fusión de su envoltura con la membrana celular. Proteína del virus, gp41, actúa a modo de gancho anclándose a la membrana y facilitando el proceso de fusión esto sucede luego de la adsorción de la gp120 con receptor y correceptor
Transcripción Inversa	Luego de la liberación del material genético y de las enzimas, la transcriptasa inversa usando como molde el ARN del virus sintetiza una hebra de ADN (transcripción inversa) que posteriormente se convierte en un ADN lineal bicatenario. Este proceso es muy importante para que el genoma del virus pueda ser integrado al núcleo celular. Luego la ribonucleasa (de la transcriptasa inversa) destruye el ARN original.
Integración	el ADN recién formado se incorpora al genoma del huésped mediante la acción de la enzima integrasa
Transcripción	La información contenida en el ADN viral se transcribe a ARNm, para la construcción de nuevos virus. La transcripción ocurre en el núcleo. El ARNm pasa al citoplasma y se dirige hacia los ribosomas, que "leen" las secuencias nucleotídicas y las traducen a estructuras proteicas, mediante el ARNt. También se forma la progenie del ARN vírico utilizando la polimerasa celular. La síntesis de las proteínas estructurales y de superficie del virus se lleva a cabo en el retículo endoplásmico, las cuales luego son transportadas mediante vesículas formadas en el Golgi hacia la membrana celular.

Ensamblaje viral	Se forman las nucleocápsides inmaduras en el citoplasma. Comienza a actuar la proteasa permitiendo la maduración del virión.
Gemación	El segmento proteico p17 permanece unido a la membrana celular del huésped y a la cápside del nuevo virión, cuando el virión se separa del huésped, el p17 "rasga" parte de la membrana celular y el virión sale de la célula.

Tabla 8. Etapas del VIH para causar infección - Ciclo vital del VIH.

Basada en

<http://www.biologia.edu.ar/viruslocal/virus%20de%20la%20inmunodeficiencia.htm#CICLO%20VITAL>

Respecto a la historia natural del VIH, debe tenerse en cuenta durante el seguimiento de las personas infectadas, (ver [Figura 13](#)), ya que guiándose por la carga viral y el nivel de los anticuerpos de VIH, que varían de forma cíclica, debido al proceso de infección de manera gradual, se producen diferentes signos y síntomas que permiten identificar la categoría clínica en la que se encuentra el paciente^{(174),(175)} (Ver [Tabla 9](#) y [Anexo 4](#)).

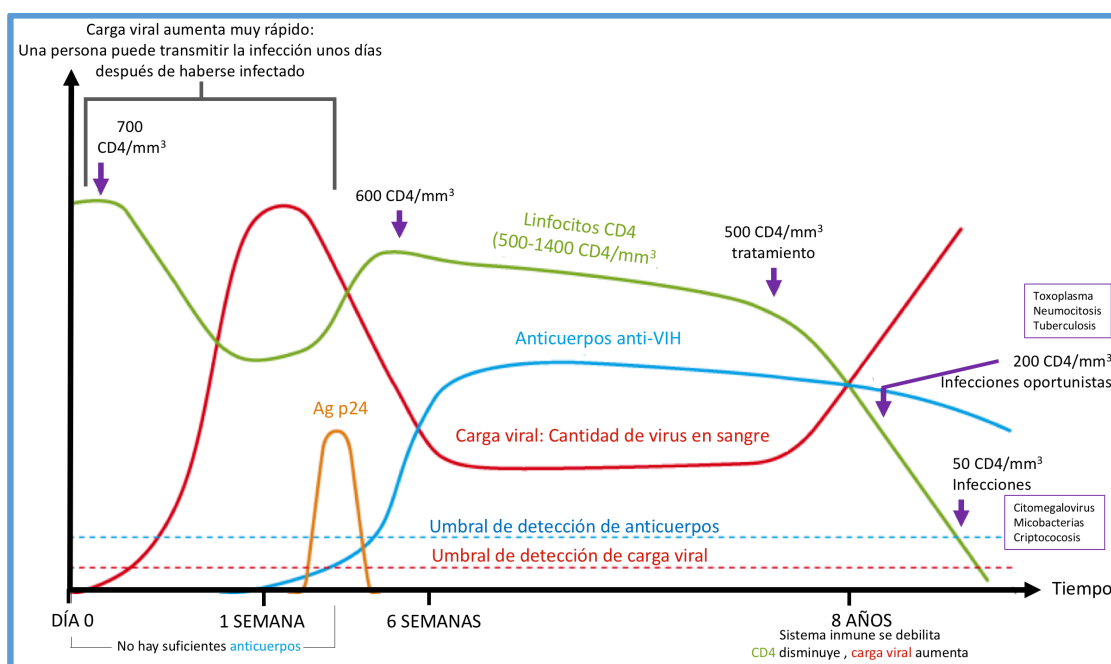


Figura 13. Historia natural de la infección por VIH.

Basada en: <http://www.infosida.es/que-es-el-vih/historia-natural-del-vih> Modificada por Lyons-Molano Jessica

El primer contacto, se trata de una etapa en donde el VIH es demasiado activo infectando y destruyendo linfocitos de diferentes tipos que no se recuperarán y generando una batalla entre

el virus y el sistema inmune. Esta fase aguda de infección, aparece aproximadamente entre las 2-4 semanas del contacto y puede durar hasta 20 días con una remisión posterior que conduce a una estado “normal” de salud; generalmente los síntomas en esta fase inicial son: fiebre, malestar general, cansancio, sudoración, inflamación de algunos ganglios, dolores de cabeza y de las articulaciones, inapetencia, vómito y diarrea; por esta razón los médicos pueden confundir los síntomas con procesos como resfriados, gastroenteritis, o mononucleosis, sobre todo si no interrogan adecuadamente al sujeto, o la persona no informa de conductas de riesgo para el VIH^{(152),(174),(175)}.

Cifra de Linfocitos T CD4+	Categoría Clínica
>500/mm ³ (>29 %)	A1 B1 C1
200-499/mm ³ (14-28 %)	A2 B2 C2
<199/mm ³ (<14 %)	A3 B3 C3

Tabla 9. Clasificación clínica de la infección por VIH.

Basada en <http://www.todosida.org/etapas-infeccion-vih> Modificada por Lyons-Molano Jessica

Luego de alcanzar el estado de salud “normal”, pueden permanecer por meses o años de esa manera, o repetir frecuentemente los síntomas generales una y otra vez. En esta fase, conocida como ventana del virus, no son fiables los niveles de anticuerpos, una persona que tenga ya el virus atacando su sistema inmune puede presentar resultados negativos para VIH; en realidad, los niveles de anticuerpos son confiables solo hasta después de la sexta semana; pero se puede hacer seguimiento con la carga viral, la cual en esta fase aguda, es demasiado elevada, alcanzando incluso niveles de más de 1'000000/mm³ de virus, además los niveles de linfocitos CD4 empiezan a disminuir encontrándose por debajo del rango de 1200-700/mm³ que es el rango normal de estas células^{(152),(174),(175)}.

Luego de la sexta semana, la respuesta del sistema inmune se potencia, los niveles de CD4+ se recuperan sin alcanzar de nuevo el valor normal, la carga viral tiende a disminuir y logra estabilizarse con valores diferentes para cada persona, generando un valor conocido como nadir o valor basal de carga viral (por debajo de 50.000 o 70.000 virus por mm³), el valor dependerá de los tratamientos realizados, la genética del sujeto (presencia o no de polimorfismos o de receptores del VIH genéticamente alterados) y los cuidados que tenga la

persona infectada, entre otras y entre más baja sea esta cifra, mejor será el pronóstico de la persona^{(152),(174),(175)}.

Con los anticuerpos ya detectables, se sabe que el sistema inmune ha intentado controlar la infección, pero al mismo tiempo indica que el virus ya se estableció en el organismo, mientras pasan los meses y años el virus debilita el sistema inmune y hace que las células CD4 sigan disminuyendo, con la consecuencia de un aumento en la carga viral, con niveles que oscilan entre personas, se conoce que a los 8 años después de la infección, el virus produce un pico ascendente de la carga viral, permitiendo co-infecciones por microorganismos oportunistas, tales como el toxoplasma y el bacilo de Koch entre otros, disminuyendo aún más la calidad de vida del infectado^{(152),(172),(174),(175)}.

El ciclo de vida de este virus, y las etapas que tiene que pasar para lograr el ataque al sistema inmune humano (ver Tabla 8), han sido el foco principal de investigadores con respecto al tratamiento; cada vez existen más estudios de antiretrovirales que han logrado mejoras en la calidad de vida de los infectados, puesto que al inhibir alguna de estas etapas, se logra frenar la replicación del VIH, pero en realidad, el virus, cuenta con mecanismos que le permiten evadir la acción de algunos de estos fármacos y continúa siendo un dilema mundial el tratamiento definitivo^{(143),(172),(176)}; por otro lado, los científicos en las últimas décadas, han demostrado, que existe un pequeño porcentaje de personas con un control natural de la infección por este virus⁽¹⁷⁷⁾, sin embargo los estudios realizados en pacientes con esta característica de control natural, se han realizado, en su mayor parte, durante la fase aguda y temprana de la infección por VIH, razón suficiente para no poder llegar a conclusiones definitivas al respecto⁽¹⁷⁸⁾.

En bases de datos, varios estudios acerca del progreso de la infección por el VIH, han descrito factores del huésped que revelan alelos protectores KIR (Receptores de células *Natural Killer*), además de cambios en los marcadores inflamatorios y en la activación de células T CD4+ que son asociados con el progreso o no de la viremia⁽¹⁷⁷⁾; del mismo modo, se ha demostrado que cambios en las Células NK (*Natural Killer*), que no alteran la capacidad inhibitoria de las células T CD8+ (linfocitos T citotóxicos), se asocian al avance de la viremia^{(172),(179),(180)}.

Otras variaciones genéticas se han estado estudiando con respecto a las personas con resistencia a la infección por VIH conocidos como seronegativos expuestos; por ejemplo, se ha encontrado que cuando existen polimorfismos en el gen *MTHFR*, tales como el 677C>T y el 1298A>T, se inhibe la progresión de la viremia no solo en infecciones causadas por VIH sino también en las causadas por CMV (Citomegalovirus) e incluso en aquellas causadas por microorganismos como el *Plasmodium falciparum*, causal de la Malaria; del mismo modo, en aquellos que ya se encuentran contagiados por el virus y poseen estos SNP, el progreso de viremia hacia enfermedad, es más lento, logrando mantener concentraciones de sus células de defensa en un nivel más controlado y adecuado^{(113),(147),(181)}.

La investigación más evaluada respecto a personas con retraso en el desarrollo del SIDA o resistencia a la infección inicia en 1996, año en el que se describe un importante co-receptor que debe estar presente para que el virus pueda ingresar a una célula T y logre infectarla, hallazgo que permitió que se detectaran personas con una variación en este gen co-receptor, una delección en el gen *CCR5*, polimorfismo identificado con el rs333, conocido como *CCR5-del32*, que cuando está presente en una sola copia del genoma de la persona expuesta al VIH, permite un retraso en el desarrollo de la enfermedad -SIDA-, y en un porcentaje aún menor, quienes cuentan con los dos alelos *CCR5-del32*, no desarrollan infección por VIH^{(178),(182)}. En la Figura 14, podemos observar la ubicación normal de receptores y co-receptores para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), indispensables para el estudio de resistencia al VIH.

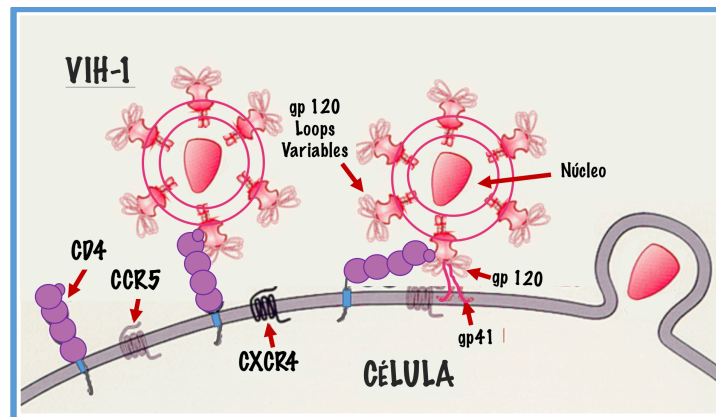


Figura 14. Receptores y Co-receptores del VIH.

Basada en: <http://www.gbhealthwatch.com/Trait-HIV-AIDS-Resistance.php>

Los hallazgos respecto a la resistencia al VIH o a la limitación de la infección para evitar su avance a SIDA, hacen que nos preguntemos una y otra vez, si ha logrado identificarse en los diferentes estudios el progreso de la infección por VIH, y los cambios que produce en nuestro sistema inmunitario cuando lleva o no a una viremia, ¿qué pasaría, si se lograra bloquear la replicación a partir de estos hallazgos? Aunque sería el tratamiento ideal, esto se lo han preguntado por años los científicos expertos en el tema del VIH, sin embargo no se ha logrado identificar aquello que permitiría detener de forma definitiva la progresión hacia la enfermedad SIDA, incluso los intentos para crear una vacuna protectora han fracasado y se sigue investigando al respecto^{(163),(183),(184),(185)}.

4.5 Detección de los polimorfismos MTHFR: kits usados en la investigación

LightMix[®] Research Use Only Kit *MTHFR* 1298 A>C TIB MOLBIOL, permite la detección en ADN genómico humano, del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), rs1801131, A1298C del *Metilentetrahidrofolato reductasa* (*MTHFR*), cuya nomenclatura en HGVS (*Human Genome Variation Society*) es c.1286A>C (posición en el ADN codificante), y p.Q429A (posición en la proteína). Este kit fue diseñado por Roche[®], debido al interés científico que existe acerca de las mutaciones *MTHFR*, las cuales contribuyen a incrementar los niveles de homocisteína en el plasma, representando un factor de riesgo para algunas enfermedades humanas y para pérdidas de embarazo recurrentes que no tienen explicación en otras causas. El polimorfismo 1298A>C del gen *MTHFR*, codifica una variante enzimática de actividad disminuida, y se conoce que la constitución heterocigota con la combinación de alelos A1298C y C677T son consideradas como factores de riesgo, y es aconsejable que aquellas muestras con homocigoto 1298C/C o heterocigoto A/C sean analizadas también para el polimorfismo C677T del gen *MTHFR*, sin embargo en la fase 1, en un estudio previo, las mismas muestras fueron analizadas para el polimorfismo 677C>T, por lo que muestras bajo condiciones sugeridas son revisadas y analizadas en conjunto para ambos polimorfismos.

Siguiendo con las características de este kit, se trata de un test de investigación in vitro, específico para ese polimorfismo que requiere muestras de 2µL de ADN genómico purificado en solución acuosa, extraído de muestras que contengan 5-100ng/µL de ADN genómico (10ng-200ng de cantidad total). Contiene reactivos para 64 reacciones realizadas en un

volumen de 10µL y cada corrida debe incluir un control negativo y una muestra standard. Los reactivos deberán almacenarse según las indicaciones del fabricante.

Respecto a cómo funciona el kit, este utiliza metodología PCR-RT; amplifica fragmentos de 269pb del gen *MTHFR* con *primers* específicos, el fragmento es detectado con una sonda mutación específica internamente marcada con SimpleProbe[®] reactivo 519. Esta sonda solo es fluorescente cuando se une al ADN complementario. La sonda se une a la parte del fragmento amplificado que abarca el sitio de mutación, cualquier desajuste de la sonda desestabiliza el híbrido. La clave para analizar los resultados es la curva de la temperatura *melting* la cual es lentamente aumentada, la sonda se disuelve a temperaturas *melting*, la sonda coincide con la secuencia del genotipo *wild type* y cuando se da la presencia de una variante- mutación, resulta un pico con una reducida temperatura *melting*. Los resultados se leen basándose en las temperaturas *melting* comparándolas con el estándar suministrado y se usa un software especial para este análisis. La sensibilidad y especificidad del kit han sido corroboradas por el fabricante en estudios realizados en Berlín con concordancia del 100% en los métodos analíticos.

La visualización de productos amplificados se realiza directamente en equipo de PCR en tiempo real.

5 Materiales y métodos

5.1 Diseño del estudio

Se trata de un estudio de tipo analítico explicativo.

La base del diseño es la presencia de los polimorfismos *MTHFR* 677C>T y 1298 A>C, con factores fijos de diseño teniendo en cuenta las frecuencias alélicas y genóticas de este polimorfismo en concordancia con la población dividida en grupos de adultos sanos e infectados por el virus de VIH.

Como variable de la respuesta, se considera la presentación de cada alelo y genotipo en las poblaciones.

Como unidad de muestreo se tomaron 380 individuos adultos voluntarios colombianos; teniendo en cuenta criterios de inclusión y exclusión para cada población; de estas muestras aquellas en las que no se pudiera corroborar el resultado por duplicado fueron eliminadas del estudio, teniendo en total 365 muestras de adultos sin infección por VIH y 201 muestras de pacientes infectados por VIH en manejo pertenecientes al grupo B24 del Hospital Universitario Mayor Mederi de Bogotá.

5.2 Muestra

5.2.1 Tamaño de la muestra

Debido a la ausencia de estudios de este polimorfismo en población colombiana, a los datos escasos en la literatura acerca de la prevalencia, e incidencia de la presencia de los alelos *MTHFR* 677C>T y 1298 A>C, y a que se había analizado en la misma población, durante un experimento anterior el polimorfismo *MTHFR* 677C>T en la fase I de este estudio en donde se estudió el efecto de la fortificación de las harinas en población colombiana, se consideró que el tamaño muestral que se usará será el mismo con el fin de poder correlacionar los resultados con los del polimorfismo *MTHFR* 1298 A>C.

5.2.2 Población del estudio

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad del Rosario; los individuos voluntarios involucrados en el estudio firmaron el consentimiento (realizados en fase uno del experimento autorizando uso de la muestra para experimentos relacionados posteriores). Sólo se incluyeron en este estudio los individuos que habían aceptado que su muestra fuera usada en fases posteriores del trabajo u otros estudios.

Las muestras de los sujetos sanos fueron tomadas de voluntarios pertenecientes al personal académico del Colegio HH Corazonistas en Bogotá, junto con algunos voluntarios externos; la población de adultos infectados, corresponde a voluntarios con VIH controlados y en manejo óptimo, pertenecientes al grupo B24 del Hospital Universitario Mayor Méderi en Bogotá.

Respecto a los sujetos sin infección por VIH, durante la fase I, se recolectaron 743 muestras en total de individuos no relacionados entre niños y adultos, para esta fase de investigación solo se usaron muestras de adultos en total 365 de los 380 adultos de la fase I; los pertenecientes al grupo de infectados por VIH para este proyecto fueron en total 201 adultos.

Las muestras fueron tomadas de células de epitelio bucal utilizando escobillones (Whatman®wb10003) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y para lo cual se explicaron riesgos mínimos y firmaron los consentimientos respectivos.

5.2.3 Criterios de inclusión

Adultos: Ser mayor de 18 años para el momento de la toma de muestra; ser colombiano de nacimiento; tener padres colombianos; pertenecer a estrato socioeconómico 3* o superior; leer, aceptar y firmar el consentimiento informado.

El hecho de pertenecer a este estrato, se debe a que el folato en su gran mayoría es obtenido de la dieta o de suplementos nutricionales, así que con tener una población en estrato 3 garantizamos una población con consumo de folato equilibrado y similar .

5.2.4 Criterios de Exclusión

Adultos: Padecer enfermedad de origen genético o embrionario conocidas, que se sospeche

que sean consecuencia de algún defecto de la vía del folato, tales como: defectos del tubo neural, homocistinuria, homocistinemia, o no cumplir criterios de inclusión.

5.3 Obtención y Recolección de Muestras

5.3.1 Extracción de ADN

Se realizó el protocolo de extracción de ADN para muestras tomadas con escobillón, usando el Kit DNAIQTMSystem (Promega[®]) de acuerdo a recomendaciones del fabricante. Se cuantificó el ADN por prueba espectrofotométrica utilizando NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific[®]) y solo se incluyeron muestras que tuvieran una concentración de ADN superior a 10pmol/μL.

5.3.2 Cuantificación de ADN

El análisis de cuantificación se realizó para medir la concentración de ADN de las muestras cumpliendo los principios de la espectrofotometría, los cuales se basan en la Ley de Beer Lambert, la cual refiere que la cantidad de luz absorbida dependerá de la concentración de la muestra.

5.3.3 Amplificación por PCR en Tiempo Real (qPCR-RT)

Teniendo en cuenta el alto riesgo de contaminación que se tiene con la realización de PCR en tiempo real, nuestro equipo de trabajo tomó las precauciones usando protección adecuada (bata blanca y bata estéril desechable, guantes estériles, monogafas, gorro, tapabocas N95, puntas de pipetas siempre estériles y con filtro, además de incluir muestra de la persona que realiza la PCR para evitar falsos positivos por contaminación de ADN o transferencia de este a la muestra examinada).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite generar cantidades ilimitadas de una secuencia de interés. Técnicas cuantitativas, como la PCR en tiempo real, ubican un umbral arbitrario que existe en el inicio de la PCR. Este método se utiliza con mayor frecuencia para cuantificar pequeñas cantidades de ADN específicos en una muestra en relación con ADN control existente en otra muestra y debe ser comparable la eficiencia de la amplificación de ambas muestras (la muestra y el control). De esta manera la PCR en tiempo real tiene una

probabilidad alta de identificación del ADN de interés y permite cuantificar el ADN en la muestra original. Puede realizarse con base en técnicas de fluorocromos no específicos, o con base en técnicas de sondas específicas⁽⁴⁵⁾.

Los protocolos basados en fluorocromos permiten que el ADN que se multiplica se una a fluorocromos (como SYBR green) produciendo fluorescencia que es medida por el equipo (termociclador para tiempo real) y permite cuantificar una sola secuencia por reacción. Su principal ventaja es usar *primers* universales para su realización y por esto es más económica que la basada en sondas específicas. Sin embargo, la basada en sondas específicas, utiliza una sonda unida a dos fluorocromos que hibridan en la zona intermedia entre el *primer forward* y el *primer reverse* en donde se realiza una transferencia energética de fluorescencia por resonancia⁽⁴⁵⁾, y es por estas reacciones que esta técnica se considera mucho más específica que la de fluorocromos.

En nuestro estudio, se realizó PCR en tiempo real basado en sondas específicas de todas las muestras, usando los kit específicos LightMix[®] Research Use Only Kit *MTHFR* 1298 A>C TIB MOLBIOL y LightMix[®] Research Use Only Kit *MTHFR* 677 C>T TIB MOLBIOL de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

5.3.4 Genotipificación

Las muestras, fueron tomadas con duplicados, así mismo, la genotipificación se verificó por duplicado, muestras con dudas en el genotipo fueron eliminadas. Todas las muestras se verificaron con el mismo método de genotipificación en el duplicado, aquellas con discordancia fueron eliminadas del estudio.

5.4 Análisis Genético – poblacional

Partiendo de la genotipificación de las muestras, se elaboró una matriz para el total de las muestras, teniendo en cuenta si cada uno de los adultos pertenecía al grupo de adultos sanos o de infectados por VIH.

Los datos obtenidos en cada grupo, fueron analizados con diferentes estadísticos de genética de poblaciones usando Genepop versión 4.7.0, a partir de las frecuencias génicas y

genotípicas se realizó el cálculo de Equilibrio de Hardy Weinberg (EHW de manera global. En toda la población – y luego en cada uno de los grupos poblacionales de manera independiente, tomando como hipótesis alternativas: primera (H1): la población no se encuentra en EHW debido a déficit de heterocigotos y segunda (H2): la población no se encuentra en EHW debido a un exceso de heterocigotos, que se compararon con la hipótesis nula (H0), que indica unión de gametos al azar.

Se analizó la significancia estadística obteniendo valores de p y se estimó la heterogeneidad genética entre la muestra como un todo y para los grupos de sanos e infectados, además de realizar pruebas de diferenciación poblacional asumiendo falta de EHW entre las muestras, analizando datos de errores tipo alfa.

Dentro de la evaluación genético-poblacional, se buscó calcular el grado de diferencias genéticas en relación con las frecuencias de heterocigotos, dentro de la población total y los grupos descritos.

Determinamos la estructura de las poblaciones, midiendo exceso o deficiencia de heterocigotos en cada subpoblación y en la población como un todo, medimos coeficientes de exogamia o endogamia que puedan generar sesgos en las frecuencias alélicas de las poblaciones y el efecto de selección a favor del heterocigoto (sobredominancia).

Finalmente, se compararon los datos obtenidos en este trabajo con las frecuencias alélicas reportadas para otras poblaciones, y se analizó el posible ligamiento del polimorfismo 1298 A>C con el polimorfismo 677C>T evaluado en los mismos individuos en estudios previos.

5.4.1 Descripción de los métodos /programas utilizados en el análisis de datos.

- ***Genepop versión 4.7.0:*** Este programa genético-poblacional, disponible on line para su descarga, no es más que un paquete de software de genética de poblaciones con opciones para analizar el equilibrio de Hardy Weinberg, desequilibrio de ligamiento, hallar la diferenciación de la población, y las correlaciones que pueden tener las poblaciones a estudio analizando frecuencias alélicas y genotípicas, para ser usado de manera ideal los datos deben ser registrados de manera codificada y ordenada en tablas de datos creadas por los interesados en los análisis, nuestro estudio creo las

tablas codificadas de acuerdo a los hallazgos experimentales para poder correr el software y encontrar los resultados obtenidos. La versión usada comparada con versiones anteriores, excluye datos emparejados lo que permitió una confiabilidad mayor en los resultados^{(186),(187)}.

- **Chi cuadrado (X^2):** Este estadístico, es una prueba para corroborar o rechazar hipótesis planteadas y debe tenerse en cuenta en todo experimento genético; permite determinar si los datos de nuestro estudio están de acuerdo con las proporciones Mendelianas expuestas; entre otras cosas, esta prueba permite diferenciar entre la frecuencia del genotipo esperado y el observado dando la verdadera significancia estadística. Para realizar esta prueba se debe tener en cuenta su fórmula :

$$X^2 = \sum (\text{valor observado} - \text{valor esperado})^2 / \text{valor esperado}$$

Para analizar el resultado obtenido a partir de la fórmula de X^2 , nos debemos basar en la tabla de probabilidades del chi-cuadrado que tiene en cuenta además los grados de libertad (gl) que hacen referencia al número total de clases (casos), o en nuestro caso al número de grupos poblacionales a analizar, y se le resta el número de parámetros independientes calculados a partir de los datos, generalmente 1.

$$gl = n - 1$$

Y por último se debe conocer que por convención estadística se utiliza el valor de 0.05 de probabilidad como el valor límite o crítico. Si el valor de Chi-cuadrado calculado para un experimento es mayor que el correspondiente al de la probabilidad del 5% se rechaza la hipótesis⁽¹⁸⁸⁾.

- **Valor de p:** este valor hallado mediante los análisis estadísticos chi-cuadrado, permite determinar si en realidad el resultado obtenido rechaza o no una hipótesis nula, y es estadísticamente significativo cuando el valor es menor a 0,05 ($P < 0,005$).
- **Equilibrio de Hardy-Weinberg:** Se trata de un modelo teórico usado en genética de poblaciones descrito a principios del siglo XX por el matemático Hardy y el físico Weinberg; su principio radica en que mientras no exista selección natural, no se

produzcan mutaciones o no actúe ningún otro factor, la composición genética de una población permanecerá en equilibrio. Además, afirma que luego de aparear una generación al azar las frecuencias genotípicas adquieren un valor de equilibrio en el cual se fijarán, su fórmula es un principio básico de la genética de poblaciones, interpretando su fórmula podemos predecir la frecuencia de los homocigotos dominantes, los homocigotos recesivos y los heterocigotos.

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

- **Prueba *U score*:** Permite analizar la fracción de recombinación entre dos loci con dos alelos co-dominantes en cada uno de ellos, en realidad compara las situaciones que puedan presentarse asumiendo los diferentes entrecruzamientos que puedan darse; en otras palabras, esta prueba, no es más que una prueba de ligamiento entre poblaciones, similar a *lod score*, sin embargo y aunque se conoce más del *lod score*, las fórmulas para hallarlo son dispendiosas, y los software genético-poblacionales tienen la manera de simplificarlo al analizar el *U score* dando un resultado para que solo sea interpretado por el interesado^{(189),(190)}.
- **Método de cadenas de Markov:** Este método estadístico, cuenta con aplicaciones en múltiples áreas; enfocándonos en genética, su uso para análisis genético-poblacional, describe el cambio de frecuencias génicas en poblaciones sometidas a fuerzas evolutivas que junto con selección natural permiten el cambio de frecuencias alélicas a través del tiempo de manera estocástica; de manera más sencilla, podemos decir que las poblaciones que han tenido procesos de deriva genética, pueden ser analizadas mediante este método, describiendo el cambio que se presente en las frecuencias génicas de dicha población. Con este estadístico se puede calcular el valor de *p*, analizar las permutaciones que se presenten y estimar errores tipo alfa⁽¹⁸⁹⁾.
- **FSTAT:** Este paquete estadístico que se encuentra dentro de los diferentes programas para análisis genético poblacional, en resumen permite la estimación de heterogeneidad genética, asociado con los análisis de diversidad, *F_{IS}* y *F_{IT}*, permite calcular diferencias en frecuencias de heterocigotos dentro de una población y entre poblaciones⁽¹⁹⁰⁾.

- **F_{IS} , F_{ST} y F_{IT} :** Para determinar el flujo génico, diferenciación, y la estructura genética de las poblaciones, estos estadísticos conocidos como estadísticos F, descritos por Sewall Wright, son los indicados; estos permiten medir el exceso o deficiencia de heterocigotos en cada subpoblación y en la población como un todo.
- **f de Wright:** Coeficiente de endogamia. En realidad evalúa la diferenciación genética entre poblaciones. Cuando existe un efecto mayor de la deriva génica en una población habrá una diferenciación genética mayor entre las poblaciones analizadas y esto se refleja en un valor de F_{ST} mayor. Se conoce que cuando no hay diferencias genéticas entre las poblaciones, el valor de F_{ST} será de cero ($F_{ST}=0$), y cuando los loci estudiados hacen que exista un aislamiento genético entre las poblaciones analizadas el valor de F_{ST} será igual a uno ($F_{ST}=1$)⁽¹⁹⁰⁾.
- **Análisis de diversidad de Nei:** Calcula grado de diferencias genéticas en relación a las frecuencias de heterocigotos, dentro de la población total y las subpoblaciones. Este estadístico, analiza la distancia estándar proporcional al tiempo en el que dos poblaciones han evolucionado de manera independiente y se comparan; en este análisis se tienen en cuenta los cambios que las mutaciones la deriva génica hallan causado en las frecuencias alélicas. Para su adecuada interpretación a parte de conocer muy bien sus fórmulas complejas se debe obtener una matriz de similitud entre los individuos que permita deducir relaciones. En los programas como Genepop o Arlequin, este análisis genera datos simples para ser interpretados y analizados de acuerdo al estudio que se esté realizando, simplemente creando una base de datos codificada.
- **Efecto Wahlund:** Descrito desde 1928 por un genetista sueco, Sten Wahlund, el efecto hace referencia a la reducción en la heterocigosidad de las poblaciones comparadas, reducción que puede ser causada por la estructura de subpoblaciones debido a flujo genético o deriva génica, y que se produce aún si las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy Weinberg. En resumen este estadístico permite el análisis de subpoblaciones agrupadas y evalúa las diferencias alélicas en submuestras.

- ***Fitness relativo (w)***: Estadístico que refleja la probabilidad de reproducción o la supervivencia de organismos con ciertas características dentro de una población. Es un método excelente para evaluar cuando existe selección a favor de heterocigotos, en otras palabras ayuda a determinar si existe sobredominancia. En algunos textos de genética de poblaciones, este *fitness*, se define como el éxito reproductivo relativo de un sujeto con determinada característica dentro de una población.
- ***Errores tipo alfa y beta***: También conocidos como errores tipo I y II, se deben tener en cuenta en todo tipo de investigación. El tipo alfa hace referencia a los falsos positivos, es decir, cuando no se acepta una hipótesis nula aun siendo esta verdadera. El tipo beta, se trata de los falsos negativos, en otras palabras cuando no se rechaza una hipótesis nula siendo falsa.

6 Resultados

El total de individuos participantes en el estudio, junto con los porcentajes de frecuencias genotípicas de cada uno de los polimorfismos del gen *MTHFR* analizados en ambos grupos poblacionales de adultos colombianos voluntarios, con y sin infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, se encuentran representados en las [Tabla 10](#) y [Tabla 11](#).

En la [Tabla 10](#), con respecto a adultos colombianos, voluntarios sanos, encontramos en la frecuencia genotípica un predominio de homocigotos *AA* para el SNP *1298A>C* del gen *MTHFR*, mientras que para el polimorfismo *677C>T* *MTHFR*, la frecuencia genotípica de heterocigotos *CT* es la que predomina.

SNP	1298A>C			677C>T		
Genotipo	Homocigoto AA	Heterocigoto AC	Homocigoto CC	Homocigoto CC	Heterocigoto CT	Homocigoto TT
Sanos	126	47	8	147	162	56
%	0.70	0.26	0.04	0.40	0.45	0.15

Tabla 10. Polimorfismos 1298A>C y 677C>T del gen *MTHFR*.

Total de muestras analizadas, genotipos homocigotos y heterocigotos en una población colombiana sin infección por el VIH.

Si bien, las frecuencias genotípicas para los voluntarios, colombianos adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (ver [Tabla 11](#)), presentan un comportamiento similar a las frecuencias de los adultos no infectados, encontrando predominio de homocigotos *AA* para el polimorfismo *1298A>C* y de heterocigotos *CT* para el SNP *677C>T*, en lo que respecta a las frecuencias de homocigotos en el polimorfismo *677C>T* las dos poblaciones muestran una diferencia importante, siendo más frecuentes los homocigotos *CC* en adultos sanos, mientras que en aquellos con VIH predomina *TT*.

En la [Tabla 12](#), se comparan los dos grupos poblacionales de adultos colombianos, con y sin infección por el VIH haciendo visualmente más fácil corroborar lo dicho anteriormente y rectificando el comportamiento similar a nivel general, pero haciendo evidente las diferencias

en el comportamiento homocigoto del SNP 677C>T tal como se había descrito en el párrafo anterior.

SNP	1298A>C			677C>T		
Genotipo	Homocigoto AA	Heterocigoto AC	Homocigoto CC	Homocigoto CC	Heterocigoto CT	Homocigoto TT
VIH	145	50	6	41	103	57
%	0.72	0.25	0.03	0.20	0.52	0.28

Tabla 11. Polimorfismos 1298A>C y 677C>T del gen *MTHFR*.

Total de muestras analizadas, genotipos homocigotos y heterocigotos en una población colombiana de adultos con infección por VIH.

SNP	1298A>C			677C>T		
Genotipo	Homocigoto AA	Heterocigoto AC	Homocigoto CC	Homocigoto CC	Heterocigoto CT	Homocigoto TT
VIH%	0.72	0.25	0.03	0.20	0.52	0.28
Sanos%	0.70	0.26	0.04	0.40	0.45	0.15

Tabla 12. Polimorfismos 1298A>C y 677C>T del gen *MTHFR*.

Comparación de los porcentajes de genotipos homocigotos y heterocigotos en una población de adultos colombianos con y sin infección por VIH.

Presentando las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos 677C>T y 1298A>C del gen *MTHFR* para cada grupo de nuestras, adultos colombianos sanos – sin infección por VIH- y adultos colombianos infectados por VIH se encuentra la Tabla 13; en esta tabla, observamos que las frecuencias alélicas entre las dos poblaciones son similares, a excepción de las frecuencias alélicas del polimorfismo 677C>T *MTFHR*, en donde se encuentra una mínima diferencia entre sanos e infectados por VIH, principalmente en la frecuencia del alelo T, el cual se presenta en un mayor porcentaje en infectados por VIH comparándolo con personas sanas; del mismo modo, la frecuencia alélica más alta para el alelo *MTHFR* 677C es mucho más elevada en adultos sanos.

En la Figura 15, se representa gráficamente lo anterior, corroborando las frecuencias alélicas y genotípicas, de los polimorfismos de gen *MTHFR* analizados, en las muestras de adultos colombianos con y sin infección por el VIH, en definitiva, la similitud de ambas frecuencias alélicas y genotípicas en ambos grupos cuando se observa el SNP 1298 del gen *MTHFR*, deja claro que no hay diferencia significativa, sin embargo para el SNP 677, las personas adultas no expuestas ni infectadas por VIH presentan una frecuencia alélica significativamente mayor del alelo C, mientras que en los infectados por este tipo de retrovirus, predomina el alelo T con respecto a este polimorfismo 677 del gen *MTHFR*.

Frecuencias Genotípicas y Alélicas de las poblaciones analizadas											
Tipo de individuo	n	Frecuencias Genotípicas						Frecuencias Alélicas			
		Polimorfismo 677C>T MTHFR			Polimorfismo 1298A>C MTHFR			Polimorfismo 677C>T MTHFR		Polimorfismo 1298A>C MTHFR	
		CC	CT	TT	AA	AC	CC	C	T	A	C
Adultos colombianos no infectados por VIH	365	0.40	0.45	0.15	0.70	0.26	0.04	0.63	0.37	0.83	0.17
Adultos colombianos infectados por VIH	201	0.20	0.52	0.28	0.72	0.25	0.03	0.46	0.54	0.85	0.15

Tabla 13. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos 677C>T y 1298A>C del gen *MTHFR* en adultos colombianos sin infección e infectados por VIH.

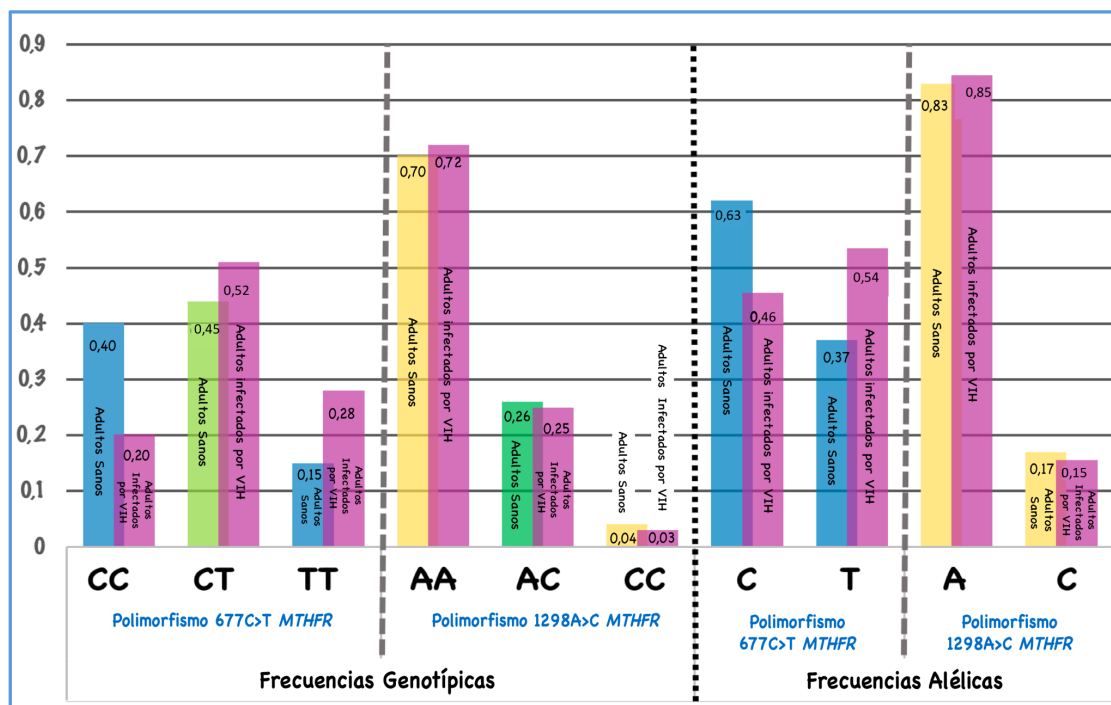


Figura 15. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos 677C>T y 1298A>C en poblaciones colombianas sin y con infección por VIH.

En las Figuras 16 y 17, se puede observar el comportamiento de los dos polimorfismos principales del gen *MTHFR* en las dos poblaciones adultas colombianas con y sin infección por el virus de inmunodeficiencia humana, con respecto a la presencia de homocigotos y heterocigotos en dichas poblaciones, aunque el comportamiento es similar en ambas poblaciones, 1298 predominan los homocigotos y para el 677 los heterocigotos, y si somos estrictos el porcentaje de heterocigotos para el polimorfismo 677 es mayor en las personas infectadas por VIH en comparación con los adultos sanos, de igual manera el porcentaje de homocigotos para el 1298C>T del *MTHFR* es mayor en las personas infectadas.

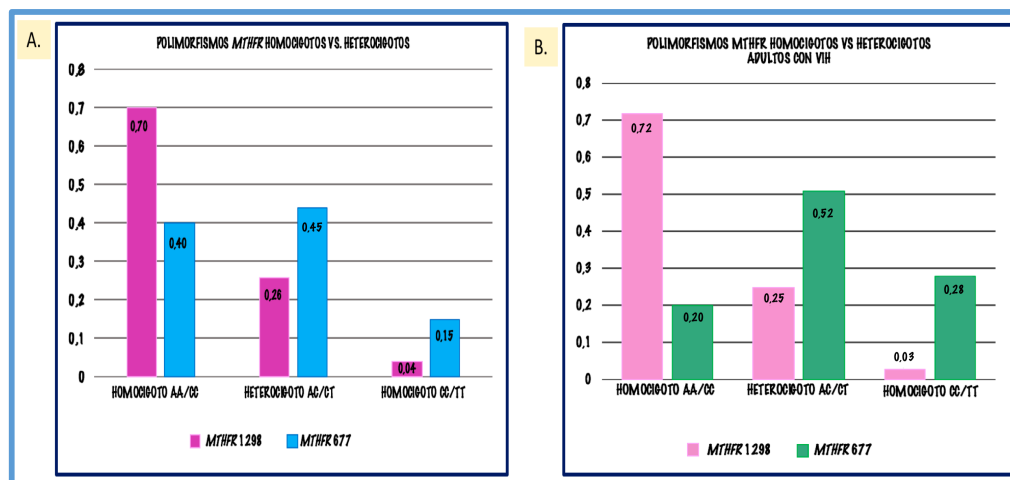


Figura 16. Polimorfismo del gen *MTHFR* 1298A>C y 677C>T

Comparación de homocigotos y heterocigotos.

A. Población colombiana adulta sana

B. Población colombiana adulta con infección por VIH

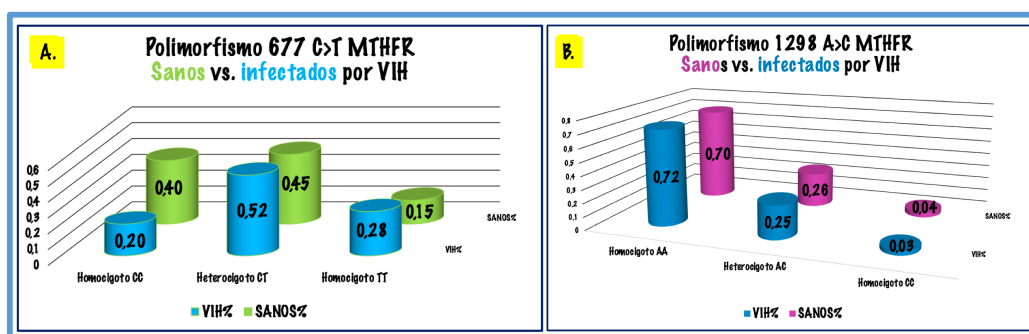


Figura 17. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos del gen *MTHFR*.

*A. Polimorfismos del gen *MTHFR* 1298A>C adultos sanos vs. infectados por VIH.*

*B. Polimorfismos del gen *MTHFR* 677C>T adultos sanos vs. infectados por VIH.*

A partir de la genotipificación de las muestras se analizaron los dos polimorfismos principales del gen *MTHFR*, 1298A>C y 677C>T, para las dos poblaciones de adultos colombianos con y sin infección por VIH, a continuación se presentan los resultados.

6.1 Resultados Genético Poblacionales: Equilibrio de Hardy Weinberg

6.1.1 Resultados de los análisis poblacionales por Locus

Los resultados presentados en la Tabla 14, indican que ambas poblaciones se encuentran en EHW, con una probabilidad de 0,4436 calculada con una prueba de χ^2 (chi-cuadrado) por el método de Fisher (Método de Fisher $\rightarrow \chi^2 = 3,7313$ Df=4,0000 Probabilidad= 0,4436).

Locus 677C>T gen <i>MTHFR</i>					
Población	n	P-val	S.E.	W&C	R&H
Adultos Infectados por VIH	201	0.4854	0.0065	-0.0527	-0.0529
Adultos sanos/sin infección por VIH	365	0.3189	0.0068	0.0549	0.0549

Tabla 14. Análisis genético-poblacional, *Fis* para el 677C>T del gen *MTHFR* en poblaciones de adultos colombianos con y sin infección por VIH.

Los resultados de este análisis muestran que no existe una diferencia estadísticamente significativa si se compara la población de adultos colombianos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana con los adultos sanos sin infección por VIH en lo que respecta al polimorfismo 677C>T del gen *MTHFR*.

La proporción de variación genética entre las dos poblaciones analizadas para este polimorfismo, es demasiado pequeña, el exceso de heterocigotos evidenciado en las frecuencias genotípicas para ambas poblaciones es muy similar, y aunque con respecto a las frecuencias alélicas para este SNP, se halló una diferencia entre los infectados con el VIH en quienes predomina el alelo T y los adultos sanos en los que la frecuencia del alelo C es mayor, la diferencia entre estas frecuencias alélicas no alcanza a ser significativa, por lo cual, al correr el programa GENEPOP, no se encuentra una diferencia entre las dos poblaciones con respecto a este polimorfismo 677 C>T del gen *MTHFR*.

Los resultados presentados en la Tabla 15, no se encuentran en EHW, siendo la probabilidad de 0,0215 calculada con una prueba de prueba de χ^2 (chi-cuadrado) por el método de Fisher (Método de Fisher $\rightarrow \chi^2 = 11,5025$ Df=4,0000 Probabilidad= 0,0215).

Locus 1298A>C gen <i>MTHFR</i>					
Población	n	P-val	S.E.	W&C	R&H
Adultos Infectados por VIH	201	0.7829	0.0019	0.0230	0.0230
Adultos sanos/sin infección por VIH	365	0.0041	0.0007	0.1519	0.1522

Tabla 15. Análisis genético-poblacional, *F_{is}* para el 1298A>C del gen *MTHFR* en poblaciones de adultos colombianos con y sin infección por VIH.

A diferencia de lo encontrado para el polimorfismo 677C>T, en este polimorfismo 1298A>C del gen *MTHFR*, se encuentra una diferencia estadísticamente significativa en la proporción de variación genética. Esto se debe a los valores de la población de adultos sanos que son estadísticamente significativos a pesar de que en los resultados observados de las frecuencias genotípicas y alélicas anteriormente graficados y descritos, para este polimorfismo 1298A>C, las frecuencias genotípicas en la población sana, al igual que para la población infectada por el VIH, tienen un predominio del genotipo homocigoto AA, seguido del genotipo heterocigoto AC, con resultados muy similares entre ambas poblaciones. Con respecto a las frecuencias alélicas, para ambas poblaciones el alelo predominante del SNP analizado 1298A>C del gen *MTHFR*, es el alelo A, con resultados que podría decirse que son casi idénticos entre los infectados por el VIH y los que no lo están.

6.1.2 Resultados de los análisis por población

La búsqueda de diferencias entre los dos polimorfismos en cada una de las poblaciones muestreadas se muestran a continuación en las Tabla 16 y Tabla 17.

Población Adultos Infectados por VIH = 201 muestras				
Locus	P-val	S.E.	W&C	R&H
677C>T	0.4854	0.0065	-0.0527	-0.0529
1298A>C	0.7829	0.0019	0.0230	0.0230

Tabla 16. Análisis genético-poblacional, *F_{is}* para adultos infectados por VIH.

Los resultados presentados en la Tabla 16 están en EHW, siendo la probabilidad de 0,7477 calculada con una prueba de prueba de χ^2 (chi-cuadrado) por el método de Fisher (Método de Fisher $\rightarrow \chi^2 = 1,9350$ Df=4,0000 Probabilidad= 0,7477).

Por medio de los estadísticos F_{IS} y F_{IT} , con los cuales se determina el exceso o déficit de heterocigotos en una población total (F_{IS}) y en cada grupo poblacional (F_{IT}), y el estadístico F_{ST} que se asocia con la diferenciación genética entre las poblaciones, se realizaron los análisis de cada población.

Teniendo en cuenta la fórmula $F_{IS} = H_s - H_o / H_s$, se establece la correlación existente entre dos gametos que se toman al azar desde una subpoblación, de esta manera F_{IS} tendrá valores que oscilan entre -1 y +1, indicando que no hay endogamia si se trata de valores negativos -1, que a su vez se traduce en un exceso de heterocigotos en la población analizada, pero si este tiene valores positivos +1, indica déficit de heterocigotos y se correlaciona con endogamia en la población, los resultados siempre se deben probar por medio de la prueba de χ^2 .

En este caso, los infectados por virus de la inmunodeficiencia humana, analizados en este estudio, evidencian un exceso de heterocigotos cuando se trata del polimorfismo 677C>T, y un déficit de los mismos en el SNP 1298A>C, en el cual se encuentra predominio de genotipo homocigoto AA en esta población.

En lo que respecta a las frecuencias alélicas, en la población infectada por VIH, el porcentaje del alelo T es mayor para el polimorfismo 677C>T del gen *MTHFR*, y es mayor la frecuencia alélica A para el polimorfismo 1298A>C.

Aunque los resultados para esta población muestran diferencia entre los dos polimorfismos analizados al ver el predominio de heterocigotos para el 677 y predominio de homocigotos para el 1298, la importancia estadística se encuentra en la relación de estos hallazgos con respecto a la otra población analizada, y como pudimos ver en gráficas anteriores, y veremos en el siguiente análisis, no hay una diferencia significativa al comparar población infectada por el virus con población sana.

Los resultados de la [Tabla 17](#), no se encuentran en EHW, siendo la probabilidad de 0,0099 calculada con una prueba de prueba de χ^2 (chi-cuadrado) por el método de Fisher (Método de Fisher $\rightarrow \chi^2 = 13,2988$ Df =4,0000 Probabilidad= 0,0099). Esta probabilidad, refleja la desviación estadística para la población para el locus 1298A>C

Población Adultos sanos sin infección por VIH; 365 muestras				
Locus	P-val	S.E.	W&C	R&H
677C>T	0.3189	0.0068	0.0549	0.0549
1298A>C	0.0041	0.0007	0.1519	0.1522

Tabla 17. Análisis genético poblacional, FIS para adultos no infectados por VIH.

De la misma manera que para la población infectada por el virus de la inmunodeficiencia humana, se aplicaron los análisis por separado para la población sin infección por este virus, población adulta sana, muestras tomadas de personal académico de voluntarios pertenecientes a colegios de Bogotá. En este caso, con relación a la frecuencia genotípica para la población sana, en lo que respecta al polimorfismo 677C>T predominan los heterocigotos de manera similar que en los adultos infectados por el VIH; y respecto a la frecuencia alélica del SNP 677 del gen *MTHFR* en esta población sana, es mayor para el alelo C, a diferencia de los infectados en donde predomina la frecuencia del alelo T, que como nombramos anteriormente es una diferencia mínima que al hacer los análisis no posee una significancia estadística. Para el polimorfismo 1298 del gen *MTHFR*, el predominio de la frecuencia genotípica es evidentemente para los homocigotos AA, al igual que en la población con infección por VIH, y las frecuencias alélicas son similares en esta población con respecto a la población infectada siendo mayor para el alelo A, de esta manera y aunque para el polimorfismo 677 se identifica exceso de heterocigotos y en el SNP 1298 es mayor la presencia de homocigotos y como se había nombrado anteriormente la diferencia significativa en lo que respecta al polimorfismo 1298A>C en la población sana también se hace evidente por medio de los estadísticos, aunque en las gráficas de porcentajes al comparar las dos poblaciones no se encuentre diferencia estadísticamente significativa.

6.1.3 Resultados de análisis uniando todos los locus, todas las poblaciones.

El análisis global de las poblaciones para ambos polimorfismos, nos muestran que globalmente las poblaciones se encuentran en EHW, siendo la probabilidad de 0,0548 calculada con una prueba de X² con el método de Fisher (Método de Fisher $\rightarrow X^2 = 15,2339$ Df =4,0000 Probabilidad= 0,0548). Esta probabilidad refleja el comportamiento general de

las dos poblaciones para ambos polimorfismos descartando un proceso de subdivisión poblacional.

En general, al analizar los resultados del análisis de los dos polimorfismos principales del gen *MTHFR*, 677 C>T y 1298 A>C, en dos poblaciones de adultos colombianos voluntarios divididos en dos subgrupos uno de ellos infectado por el virus de la inmunodeficiencia humana y el otro sin dicha infección, podemos afirmar que se presenta un exceso de heterocigotos en ambas poblaciones con respecto al polimorfismo 677C>T, indicando que no existen procesos de endogamia en estas poblaciones, y para el 1298A>C se encuentra un predominio de homocigotos, sin embargo al determinar deriva genética y flujo genético, además de la proporción de variación genética entre las dos poblaciones analizadas, con F_{ST} de cero se establece que no existe diferenciación entre las poblaciones estudiadas que presentan en realidad frecuencias alélicas casi idénticas, el coeficiente de endogamia que normalmente puede ser anulado por procesos de selección natural, en estos casos analizados se ve afectado para ambas poblaciones, lo que hace pensar que en estos polimorfismos, puede existir procesos de selección natural que haga persistir el polimorfismo en la población colombiana en general, a pesar de su asociación con susceptibilidad a enfermedades y/o protección de enfermedades virales.

6.2 Búsqueda de Equilibrio de ligamiento entre los dos polimorfismos del gen *MTHFR* analizados en población colombiana con y sin infección del VIH

En las [Tabla 18](#) y [Tabla 19](#), se encuentra la posible asociación de los dos loci en los gametos, lo que se encuentra dentro de las celdas de color azul claro muestra las frecuencias gaméticas esperadas partiendo de la hipótesis de que los dos loci se encuentren en equilibrio, en la [Tabla 18](#) se toma la población analizada sin infección por VIH y en la [Tabla 19](#) se encuentra la población colombiana de adultos infectados por VIH

Las tablas anteriores muestran los apareamientos que podrían presentarse, así que $p+q=1$, de este modo para 1298 de acuerdo a los genotipos A_1A_1 , A_1A_2 y A_2A_2 , se esperan proporciones p^2 (AA) $2pq$ (AC) q^2 (CC) llevándose esto a cabo sólo si se cumple con el principio de aleatoriedad que establece el equilibrio de Hardy Weinberg, así mismo las proporciones para el 677 B_1B_1 , B_1B_2 y B_2B_2 serían r^2 (CC) $2rs$ (CT) s^2 (TT).

Adultos colombianos sanos sin infección por VIH			Alelos 1298	
			A ₁ =A	A ₂ =C
		Frecuencias	<i>p</i> 0,83	<i>q</i> 0,17
Alelos 677	B ₁ =C	<i>r</i> 0,63	AC (pr)	CC(qr)
	B ₂ =T	<i>s</i> 0,37	AT(ps)	CT(qs)

Tabla 18. Asociación de los alelos de los polimorfismos 677C>T y 1298 A>T del gen *MTHFR* en una población de adultos colombianos sin infección por VIH

Adultos colombianos infectados por VIH			Alelos 1298	
			A ₁ =A	A ₂ =C
		Frecuencias	<i>p</i> 0,85	<i>q</i> 0,15
Alelo 677	B ₁ =C	<i>r</i> 0,46	AC (pr)	CC(qr)
	B ₂ =T	<i>s</i> 0,54	AT(ps)	CT(qs)

Tabla 19. Asociación de los alelos de los polimorfismos 677C>T y 1298 A>T del gen *MTHFR* en una población de adultos colombianos con infección por VIH

Por otra parte, partiendo de la aleatoriedad, es posible que se encuentre una asociación de los alelos de cada locus por separado pero también podría presentarse que los alelos 1298 no muestren asociación aleatoria con los alelos 677.

Si hay asociación entre los dos loci las cuatro frecuencias posibles de gametos de la población colombiana de adultos sin infección serán:

$$A_1B_1 \rightarrow AC = pr \rightarrow (0,83 \times 0,63) = 0,523$$

$$A_1B_2 \rightarrow AT = ps \rightarrow (0,83 \times 0,37) = 0,307$$

$$A_2B_1 \rightarrow CC = qr \rightarrow (0,17 \times 0,63) = 0,107$$

$$A_2B_2 \rightarrow CT = qs \rightarrow (0,17 \times 0,37) = 0,063$$

$$0,523 + 0,307 + 0,107 + 0,063 = 1$$

Si hay asociación entre los dos loci las cuatro frecuencias posibles de gametos de la población colombiana de adultos con infección serán:

$$A_1B_1 \rightarrow AC = pr \rightarrow (0,85 \times 0,46) = 0,391$$

$$A_1B_2 \rightarrow AT = ps \rightarrow (0,85 \times 0,54) = 0,459$$

$$A_2B_1 \rightarrow CC = qr \rightarrow (0,15 \times 0,46) = 0,069$$

$$A_2B_2 \rightarrow CT = qs \rightarrow (0,15 \times 0,54) = 0,081$$

$$0,391 + 0,459 + 0,069 + 0,081 = 1$$

En los datos anteriores es claro que si estos dos genes muestran tienen una asociación al azar de sus alelos en los gametos se encontrarán en equilibrio de ligamiento; pero si no hay asociación aleatoria se puede decir que están en desequilibrio de ligamiento.

Para determinar el estado de equilibrio o desequilibrio de los dos polimorfismos del gen *MTHFR* analizados en nuestra investigación dentro de la población colombiana adulta vamos a centrarnos en la población no infectada por el VIH.

Si suponemos que hay dos poblaciones una con genotipos únicos ($A_1A_1B_1B_1$) **AACC** y otra con genotipos ($A_2A_2B_2B_2$) **CCTT** teniendo en cuenta las frecuencias halladas en nuestra investigación tendríamos los siguientes datos:

- Población **AACC**

$$A_1 = \text{Alelo } A = 0,83 \rightarrow p$$

$$B_1 = \text{Alelo } C = 0,63 \rightarrow q$$

- Población **CCTT**

$$A_2 = \text{Alelo } C = 0,17 \rightarrow r$$

$$B_2 = \text{Alelo } T = 0,37 \rightarrow s$$

Si se produce apareamiento al azar entre estas poblaciones mezcladas y si se cumplen los supuestos que se deben tener en cuenta al hablar de una población ideal, es decir, que tenga un tamaño poblacional grande y que no existan mutaciones ni selección; el equilibrio entre los loci de estas dos poblaciones será alcanzado en algún momento, pero esto sucederá de manera gradual.

Posterior a que se presente la primera generación de apareamiento aleatorio, las proporciones que se deben encontrar con estos datos son $p^2=0,689$ (AA), $2pq= 1,046$ (AC) y $q^2= 0,397$ (CC) y $r^2=0,029$ (CC), $2rs= 0,126$ (CT) y $s^2= 0,137$ (TT). Estos datos nos muestran un desequilibrio inicial que solo se alcanzará hasta que los apareamientos permitan que se mezclen de tal forma que llegaran a presentarse no como estos supuestos de poblaciones sino como en realidad tenemos las poblaciones de nuestro estudio $A_1A_1A_2A_2$ (AACC) y $B_1B_1B_2B_2$ (CCTT) cuyo equilibrio está presente con estas frecuencias: $A_1A_1A_2A_2 \rightarrow A_1 = p = 0,83$ $A_2 = q = 0,17$ $B_1B_1B_2B_2 \rightarrow B_1 = r = 0,63$ $B_2 = s = 0,37$.

Observando detalladamente los resultados, si tenemos en cuenta la generación inicial producto de la aleatoriedad de los genotipos AACC y CCTT con sus correspondientes frecuencias los sujetos AACC darán gametos AC y los de la población CCTT tendrán gametos CT.

La situación cambia si consideramos ambos loci simultáneamente; como cada uno tiene dos alelos, existen nueve genotipos posibles; pero en la generación inicial (G_0) solo los genotipos $A_1A_1B_1B_1 \rightarrow AACC$ y $A_2A_2B_2B_2 \rightarrow CCTT$ estarán presentes en la población; si teniendo en cuenta las frecuencias halladas en nuestra población adulta colombiana sin infección por VIH, suponemos que AACC tiene una frecuencia de 0,83 y el otro CCTT de 0,17 // ($A_1 = A = p = 0,83$ y $B_1 = C = r = 0,83$ // $A_2 = C = q = 0,17$ y $B_2 = T = s = 0,17$) // y que en esta generación inicial -Go-, solo estos dos están presentes mientras que los otras combinaciones posibles están ausentes, entonces tendríamos en la G_0 los datos que se encuentran en la Tabla 20.

Tipo de gameto	AC	AT	CC	CT
Frecuencias en G_0	0.83	0.00	0.00	0.17

Tabla 20. Frecuencias de los gametos en la primera generación.

De esta manera tendríamos una asociación entre lo que se determina por los dos loci y con un análisis rápido pareciera que todo estuviera determinado por una sola diferencia génica. Con esto se puede pensar que el desequilibrio se origina por la mezcla de poblaciones que tienen diferentes frecuencias génicas; gracias al apareamiento aleatorio los gametos y genotipos que se encuentran ausentes en la G_0 aparecerán en las posteriores generaciones pero alcanzar las frecuencias de equilibrio será un proceso lento que se llevará a cabo gradualmente y simultáneamente de manera progresiva se irá disminuyendo la asociación inicial de los dos loci. Cuando dos loci están ligados tardará más en alcanzarse las frecuencias de equilibrio, esto es debido a que dependiendo de la fracción de recombinación entre los loci aparecen los gametos y genotipos ausentes. Al alcanzar el estado de equilibrio de ligamiento con este supuesto las frecuencias serían las que se describen en la [Tabla 21](#).

Tipo de gameto	A_1B_1	A_1B_2	A_2B_1	A_2B_2
Frecuencias en el equilibrio	$pr =$ 0.689	$ps =$ 0.141	$qr =$ 0.141	$qs =$ 0.029

Tabla 21. Frecuencias de los diferentes gametos al alcanzar el equilibrio.

Al comparar las frecuencias de los gametos en la G_0 de partida con las esperadas luego de alcanzar el equilibrio nos podemos dar cuenta que la frecuencia de cada tipo de gameto G_0 se desvía bien sea por encima o por debajo de la frecuencia de equilibrio en una cantidad de 0,141 en el valor absoluto. A ese valor se le tomará como el valor *del coeficiente de desequilibrio* = D; de esta manera el coeficiente de desequilibrio en la generación inicial será $D_0 = 0,141$ y con los apareamientos aleatorios D irá disminuyendo su valor progresivamente a través del tiempo. Conociendo que pasa en la situación inicial y poder deducir que a través del tiempo se llegará al equilibrio surge la pregunta de ¿qué pasa mientras se llega a ese punto de equilibrio? Para dar respuesta a esta pregunta, debemos volver a donde partimos con una población $A_1A_1B_1B_1 \rightarrow \text{AACC}$, con frecuencia de 0,83 y $A_2A_2B_2B_2 \rightarrow \text{CCTT}$ de 0,17; cada una contribuyendo inicialmente con gametos $A_1B_1 \rightarrow \text{AC}$ con frecuencia de 0,83 y $A_2B_2 \rightarrow \text{CT}$ con frecuencia de 0,17 respectivamente. El apareamiento aleatorio posterior entre sujetos de estas poblaciones generaría entonces los siguientes gametos con las frecuencias que se muestran en la [Tabla 22](#).

			Tipo de Gameto	
			$A_1B_1 \rightarrow AC$	$A_2B_2 \rightarrow CT$
		Frecuencias	0,83	0,17
Tipo de Gameto	$A_1B_1 \rightarrow AC$	0,83	$A_1B_1 AC / A_1B_1 AC$ $0,83 \times 0,83 = 0,689$	$A_2B_2 CT / A_1B_1 AC$ $0,17 \times 0,83 = 0,141$
	$A_2B_2 \rightarrow CT$	0,17	$A_1B_1 AC / A_2B_2 CT$ $0,83 \times 0,17 = 0,141$	$A_2B_2 CT / A_2B_2 CT$ $0,17 \times 0,17 = 0,029$

Tabla 22. Gametos posteriores a apareamiento aleatorio entre las primeras generaciones con sus respectivas frecuencias.

En la tabla anterior se observan los genotipos con las respectivas frecuencias esperadas posterior a la primera generación de estas poblaciones apareadas aleatoriamente; de esta manera encontramos tres posibilidades de genotipos: doble homocigoto $A_1A_1B_1B_1 \rightarrow AACC$ con frecuencia de 0,689, otro doble homocigoto $A_2A_2B_2B_2 \rightarrow CCTT$ con frecuencia de 0,029 y por último un heterocigoto doble $A_1A_2B_1B_2 \rightarrow ACCT$ con frecuencia de 0,141; los dobles homocigotos generarán tipos únicos de gametos bien sea ($A_1A_1B_1B_1 \rightarrow AC$ y $A_2A_2B_2B_2 \rightarrow CT$), los dobles heterocigotos, en cambio, pueden producir cuatro diferentes gametos, dos no recombinantes ($A_1B_1 AC$ y $A_2B_2 CT$) y dos recombinantes también llamados parentales y dos recombinantes ($A_1B_2 AT$ y $A_2B_1 CC$); las frecuencias de $A_1B_1 AC$ será igual a la de $A_2B_2 CT$, y así mismo la de $A_1B_2 AT$ será igual que la de gametos $A_2B_1 CC$, cumpliendo con las leyes de segregación mendelianas; sin embargo, la frecuencia total de los gametos recombinantes ($A_1B_2 + A_2B_1$) no tendrá que ser la misma que la de los gametos recombinantes ($A_1B_1 + A_2B_2$). La proporción de gametos recombinantes que es consecuencia de un doble heterocigoto, es aquella que determina la llamada frecuencia de recombinación representada con la letra c , así es que si por ejemplo el genotipo A_1B_1 / A_2B_2 produce gametos A_1B_1 , A_2B_2 , A_1B_2 y A_2B_1 en frecuencias 0,689, 0,029, 0,0141 y 0,0141 respectivamente. Entonces, la frecuencia de recombinación entre los genes es $c = 0,689 + 0,029 + 0,0141 + 0,0141 = 1$; se debe tener en cuenta que esta frecuencia de recombinación también dependerá de si están localizados en el mismo cromosoma y de la distancia entre ellos; si están localizados en diferentes cromosomas la frecuencia generalmente es $c=0,5$ porque las cuatro posibilidades producirán igual frecuencia, en cambio, cuando están en el mismo cromosoma los genes, la frecuencia de recombinación depende de la distancia existente entre ellos

debido a que cada cromosoma se aparea con su homólogo durante la meiosis y allí puede realizarse un proceso de rotura-reunión que lleva a intercambios entre los cromosomas homólogos siempre y cuando estén alejados porque entre más cercanos estén estos dos genes, es menos probable que se produzca el proceso de rotura-reunión; en este caso nos da =1 debido a que se encuentran en el mismo gen y muy cercanos los dos polimorfismos que estamos analizados.

Cuando se presenta una frecuencia de recombinación de $c = 0$, que es la más baja que puede existir, indica que los dos genes están tan próximos que la rotura nunca tiene lugar entre ellos. Si es de $c = 0,5$ que es la frecuencia más alta de recombinación indica que están demasiado alejados en el mismo cromosoma o situados en diferentes cromosomas; las frecuencias de recombinación entre 0 y 0,5 indican que deben estar estos dos en el mismo cromosoma necesariamente y a estos se les considera como ligados. Pero al contrario de lo que se puede pensar dos *loci* no tienen que estar ligados para estar en desequilibrio.

El coeficiente desequilibrio (D) como se había nombrado anteriormente, va disminuyendo en cada generación de apareamiento aleatorio, dicha disminución se realiza en una fracción igual a la frecuencia de recombinación. Luego de la primera generación de apareamiento aleatorio $D_1 = (1 - c) D_0 \rightarrow$ el coeficiente de desequilibrio en la generación inicial; transcurridas ciertas (t) generaciones de apareamiento aleatorio, el coeficiente de desequilibrio sería:

$$D_t = (1 - c)^t D_0$$

Con esta fórmula podemos deducir que llegar al estado de equilibrio de ligamiento será más factible y más rápido entre más grande sea el valor de la frecuencia de recombinación entre loci.

Teniendo en cuenta que para buscar si existe o no ligamiento entre los dos polimorfismos analizados en nuestro estudio solo tomamos la población colombiana sin infección por VIH, con las respectivas frecuencias halladas en nuestro estudio, diremos que contando con una frecuencia de recombinación de 1 y un $D_0 = 1 - c$ es decir $D_0 = 1 - 1 = 0$, y conociendo que ambos polimorfismos se encuentran dentro del mismo gen, podríamos decir que este valor de 0

indica que por lo menos en esta población colombiana de adultos sin VIH, los dos polimorfismos analizados se encuentran tan próximos que no da lugar a que existan procesos de rotura entre ellos, en otras palabras están siendo segregados en su mayoría juntos y no de forma independiente, generando un desequilibrio de ligamiento entre estos dos polimorfismos.

7 Discusión

Durante los procesos de evolución de la especie humana, múltiples patologías, se han asociado a procesos hereditarios o a alteraciones genéticas lo que ha conducido a la comunidad científica a enfocarse en investigaciones al respecto, llegando en la última década al desarrollo de terapia genética, y finalmente, a la medicina personalizada.

Una de las incógnitas que han surgido con estos avances científicos es ¿por qué a través de la evolución persisten polimorfismos de ciertos genes en algunas poblaciones a pesar de su clara relación con susceptibilidad a patologías? Y aunque parece una pregunta que se han planteado varios investigadores, en las diferentes bases de datos científicas no son muchos los datos al respecto; éste es el caso de los dos polimorfismos principales del gen *MTHFR*, el 677C>T y 1298 A>C, que durante muchos años han revelado asociación clara a enfermedades humanas, primordialmente al alterar el ciclo del folato, y los ciclos metabólicos asociados con él, estudiados a nivel mundial pero con muy pocas investigaciones realizadas en nuestro país. Para tratar de dar respuesta a la incógnita, ha surgido la hipótesis, de que estos polimorfismos pueden estar asociados no solo con susceptibilidad para algunas patologías, sino que también pueden estar presentes de tal manera que logren prevenir algunas otras situaciones de la salud humana; y al igual que nuestro grupo de investigación, diversos autores han considerado la persistencia de estos SNPs como parte de los procesos de selección natural a través de la evolución humana ⁽¹¹³⁾.

En el caso de enfermedades virales, como las causadas por retrovirus, incluido el VIH que conlleva a una patología altamente morbimortal en el humano, se han identificado expuestos seronegativos, quienes hacen una resistencia natural a la infección a pesar de estar expuestos al virus. Los estudios al respecto han descifrado variaciones genéticas, principalmente en receptores para el virus de la inmunodeficiencia humana que permiten esta resistencia los cuales vienen siendo estudiados desde años atrás, para el año 1996 investigadores pudieron demostrar que personas con un déficit en el correceptor del VIH-1 cuentan con macrófagos resistentes al ingreso del virus limitando la infección o haciendo más lenta la progresión a SIDA ⁽¹⁸³⁾, desde allí, los intentos por la creación de una vacuna eficaz, se han centrado en dichos receptores de VIH, en la búsqueda de la capacidad para volverse resistente a la

infección⁽¹⁸⁶⁾, sin embargo la capacidad del VIH para evadir la defensa e infestar el sistema inmune hace que siga siendo investigado sin resultados óptimos y que la mejor manera de limitar su progresión es la prevención eficaz ante la exposición.

Respecto al folato, la razón que lleva a pensar que un polimorfismo del gen que codifica para la enzima principal del ciclo que lleva su mismo nombre -ciclo del folato-, pueda estar asociado a esta protección, limitación o resistencia de infección por VIH, se basa principalmente en la deficiencia que puede presentarse en la replicación del virus, desde que se descubre el folato en 1930⁽¹¹⁾, la comunidad científica muestra interés por esta vitamina debido a que muy pronto empezaron a ver que su déficit no solo era la causa de anemias megaloblásticas, sino que afectaba la homeostasis celular ampliamente y podía influenciar en la salud humana a nivel del sistema nervioso, cardiovascular, inmune, reproductivo y psiquiátrico entre otros, razón suficiente para que la FDA diera un alerta para la fortificación de las harinas, orden mundial que se hizo efectiva desde 1998 y en el 2006 la OMS lanza una guía al respecto. Las investigaciones enfocadas al déficit de folato condujeron rápidamente a los científicos hacia el ciclo de su mismo nombre y los efectos nocivos en la salud humana que producía cualquier alteración a nivel de los pasos de este ciclo del folato, que al tener variaciones contribuía a desestabilizar el equilibrio celular alterando a su vez todos los demás ciclos metabólicos asociados al folato. Rápidamente todo se empieza a enfocar en la enzima principal del ciclo del folato, la *MTHFR* (metilentetrahidrofolato reductasa), y con estas investigaciones se llega al eje principal, a él gen *MTHFR*, y las variaciones que este puede tener en sus nucleótidos con las consecuencias que pudiera generar en la salud humana.

Los hallazgos en las variaciones del gen *MTHFR*, se centraron principalmente en variaciones de un solo nucleótido, SNP, de los cuales los que han sido más estudiados son las variaciones 677C>T y 1298A>C, los dos objeto de nuestro estudio.

Aunque las investigaciones a nivel mundial acerca de estos polimorfismos se ha centrado en la relación que tienen estos con patologías claramente definidas y se ha logrado identificar la asociación a las mismas, los estudios acerca de su relación con la protección ante exposiciones virales no ha sido estudiada ampliamente y los datos al respecto a nivel mundial son escasos y en ocasiones contradictorios en las diferentes bases de datos, por ejemplo, algunos estudios afirman que personas con infección crónica por el virus de la hepatitis C se

relacionaban con alta concentración de homocisteína secundaria a la persistencia del polimorfismo 677C>T del *MTHFR* ⁽¹⁹¹⁾, en contraste, se presentan argumentos que muestran que polimorfismos de este gen permiten que se reduzca la infección o se limite el avance de la misma al mostrar que la presencia del polimorfismo 677C>T del gen *MTHFR* se asocia a resistencia a la malaria y cómo esto puede ser una razón de selección natural sobre dicho polimorfismo en las poblaciones ⁽¹¹⁴⁾.

Otros autores ha mostrado al VIH como un virus causal de daño nervioso severo al incluir en las investigaciones no solo las predisposiciones genéticas sino las concentraciones de vitaminas ⁽¹⁴⁸⁾. Si bien el déficit de vitaminas asociado a deterioro más grave del sistema nervioso llevando a polineuropatías puede ser cierto, no por esto todas las variaciones genéticas predisponen a crear más daño por el virus de inmunodeficiencia humana, sino que muy por el contrario, algunos polimorfismos, como es el caso de los de nuestro estudio protegen ante el progreso de infección, lo que podría verse al comparar los resultados presentados previamente (Tablas 16, 17, 18 y 19).

Estudios han mostrado que de la misma manera como el folato puede estar involucrado en el conteo de CD4 en mujeres seropositivas ⁽¹⁹²⁾, un déficit de folato lleva de manera indiscutible a complicaciones hematológicas del VIH que van a requerir estabilidad de niveles de folato para influenciar así mismo en el conteo de CD4, siendo esto importante en este tipo de pacientes infectados por el VIH ya que limita la progresión a SIDA ⁽¹⁹²⁾. Respecto a población colombiana por ejemplo, estudios en prevalencia de los polimorfismos se encuentran en bases de datos, e incluso el estudio de población colombiana de adultos y niños realizado en la fase I de este estudio determina las prevalencias e incidencias del polimorfismo *MTHFR* 677C>T apoyando claramente procesos de selección, sin embargo, en relación con el VIH o con la asociación a resistencia a patologías infecciosas, no se encuentran estudios en nuestra población, siendo este el primero al respecto. A pesar de conocer que la presencia de estos SNP afecta las vías del folato, conduciendo a alteración de la enzima *MTHFR*, fundamental en el equilibrio celular, debilitándola y alterando o haciendo menor la síntesis de nucleótidos, lo que sin duda alguna conduce a desequilibrio celular llevando a fenotipos asociados con susceptibilidad para múltiples patologías, a resistencia o modificación de la acción de algunos fármacos y quizá planteándose la asociación positiva de una posible disminución en la

replicación viral debido a la necesidad de múltiples microorganismos virales, entre los que se encuentra lentivirus VIH, de tener una adecuada síntesis de nucleótidos para poder infestar las células de interés, replicarse e ir destruyendo el sistema de defensa humano y esto estar asociado con la consecuente resistencia a la infección o limitación de la misma sin dejarla avanzar a estadios de enfermedades con mayor morbi-mortalidad, son nulos los estudios al respecto siendo nuestra investigación la primera realizada en Colombia.

Del mismo modo, y aunque es conocido que el folato, que hace parte de las vitaminas que conforman el complejo B, es indispensable para que el sistema de defensa humano funcione adecuadamente y que cuando existe un déficit conduce a disfunción del sistema inmune, acelerando la progresión de la enfermedad^{(3),(8)}, no existen en bases de datos suficientes estudios respecto ni a nivel mundial ni en nuestro país; y con respecto a la relación del folato con el VIH, aunque podría pensarse fácilmente que si existe deficiencia de folato existirá una progresión hacia enfermedad SIDA, los datos encontrados en bases de datos no son concluyentes⁽¹⁵⁰⁾ y no existen suficientes investigaciones al respecto, podría decirse que el aporte adecuado de folato, o variaciones en el genoma que alteren la concentración de dicha vitamina y por ende lleven a cambios en el ciclo del folato, marcan una diferencia significativa entre las personas inmunes o resistentes al VIH y los que en definitiva no lo son, pero aún faltan datos para poder afirmarlo de manera definitiva.

La búsqueda de la existencia de una diferencia significativa en las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos 677C>T y 1298A>C del gen *MTHFR* entre casos de adultos infectados con VIH y controles sin infección por este virus en la población colombiana, partiendo del hecho de no encontrar datos con respecto a este tema a nivel de Latinoamérica y mucho menos en nuestro país, Colombia, fue el principal motor para nuestra investigación; el preguntarse si los procesos de selección de estos dos polimorfismos podrían o no estar asociados a protección ante infección por un virus que ha sido investigado por más de 50 años, el VIH y que para nadie es secreto que su tratamiento ha tenido avances notables en la calidad de vida de las personas infectadas, pero que la cura definitiva no ha sido posible a causa de su facilidad para evadir la acción farmacológica y mutar frecuentemente para lograr sobrevivir y replicarse, llevo a nuestro grupo a investigar en una población colombiana

comparando adultos en tratamiento para el VIH, con adultos considerados como sanos al encontrarse libres de infección por este virus.

Evaluando la presencia de estos polimorfismos y determinando los porcentajes de los alelos en las dos poblaciones mediante análisis genético-poblacionales, se determinó que existe una fuerza de selección natural sobre los polimorfismo *MTHFR* 677C>T y 1298 A>C en nuestra muestra de población colombiana al encontrar la persistencia de estos polimorfismos en la mayor parte de los adultos analizados de manera global.

Las inquietudes planteadas nos permitieron determinar las diferencias entre los genotipos y frecuencias alélicas de las dos poblaciones de adultos colombianos con y sin infección por VIH, y aunque las diferencias entre las poblaciones fueron mínimas, aparte de dar una noción de selección natural clara que permite que persistan estos polimorfismos; la protección ante complicaciones o progresión del VIH considerando el posible bloqueo de la replicación viral no pudo ser concluida, sin embargo, la demostración del predominio de heterocigotos del polimorfismo 677 C>T y de homocigotos 1298A>C, puede ser el comienzo de un estudio más amplio que pueda determinar si realmente dichos polimorfismos se encuentran involucrados en la reducción de la infección por VIH o quizá en la estabilización del conteo de CD4 en lo infectados, limitando la infección o creando una especie de resistencia, y quizá más adelante y con más estudios se logre determinar la posibilidad de crear una prueba de laboratorio en donde midiendo la metilentetrahidrofolato reductasa se pueda determinar el riesgo de susceptibilidad a enfermedades y al mismo tiempo la protección para el desarrollo, progresión o complicación de infecciones virales incluyendo la infección por VIH.

Lamentablemente los últimos estudios publicados en el 2017, realizados por otros investigadores^{(148),(192)}, no se enfocan exclusivamente en los polimorfismos, sin embargo, concuerdan con lo presentado en este trabajo donde la persistencia de variaciones genéticas y su posible influencia en la salud humana puede verse en tendencias, como la persistencia de heterocigotos para uno de los polimorfismos que se presentó en todos los casos en mayor frecuencia en personas infectadas con VIH que en personas sin la infección. Este tipo de tendencias puede ser fundamental para investigaciones futuras.

Aunque las expectativas eran mucho mayores, en los análisis realizados no podemos hablar de diferencias significativas claras entre las dos poblaciones estudiadas y de manera global, en los adultos colombianos con y sin infección por VIH ya que no se encuentra diferencia significativa, encontrando las poblaciones en equilibrio de Hardy Weinberg en ambas situaciones. Sin embargo, las frecuencias para cada uno de los genotipos dentro de los dos grupos son distintas y las mayores diferencias se observan al comparar la frecuencia de homocigotos para 677C>T: para 677CC la población sana tiene una frecuencia genotípica de 0.40 mientras que para los pacientes con VIH es de la mitad (0.20), de igual manera, para 677TT el caso se invierte al tener en los pacientes con VIH una frecuencia de 0.28 y en la población sana tan solo 0.15. De estos resultados podría irse más allá buscando la evolución de los pacientes, sometiéndolos a un consumo de concentraciones mayores de ácido fólico y analizando el comportamiento futuro de los niveles de CD4 en dichos pacientes, quizá con un estudio al respecto, podría determinarse si las diferencias encontradas en los homocigotos del polimorfismo 677C>T, tienen alguna influencia en las concentraciones de CD4 comprobando la limitación de la progresión del VIH de manera certera.

Al ser este el primer estudio respecto a los polimorfismos del gen *MTHFR* y su asociación a la infección por VIH en población colombiana, no se puede comparar con otros estudios en el país y a nivel mundial, si bien existen estudios de variaciones en el folato y en los polimorfismos del gen *MTHFR* asociados a enfermedades, o de la relación de alguno de los polimorfismos con infecciones, los estudios en relación a los dos polimorfismos principales del gen *MTHFR* junto con su asociación a virus de la inmunodeficiencia humana no existen en bases de datos por lo cual la mayoría de los datos encontrados son únicos hasta el momento, sin embargo si podemos decir que de acuerdo con muchos investigadores que han tomado por separado en otros contextos estos SNP, nuestros datos concuerdan con la existencia de procesos de selección para estos polimorfismos. Con los hallazgos en los diferentes análisis estadísticos, aunque no se encontró una diferencia significativa, se logró encontrar una pequeña diferencia en las frecuencias alélicas entre las dos poblaciones analizadas en lo que respecta al polimorfismo 677C>T del gen *MTHFR*, siendo la frecuencia alélica del alelo C mayor en las personas no infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana, y la frecuencia alélica del alelo T mayor en aquellos infectados por VIH, además de encontrar una persistencia de heterocigotos CT en lo que respecta a las frecuencias

genotípicas para este polimorfismo 677C>T en ambas poblaciones. Para el polimorfismo 1298A>C, las frecuencias alélicas y genotípicas similares determinan que no hay diferencia significativa entre los dos grupos evaluados, presentando un predominio del genotipo homocigoto AA.

A pesar de que el comportamiento en las dos poblaciones adultas colombianas estudiadas, con y sin infección por el virus de inmunodeficiencia humana, fue encontrado como similar en lo que respecta a la presencia de homocigotos y heterocigotos para cada uno de los dos polimorfismos del gen *MTHFR* analizados, corroborando que para el SNP 1298 predominan los homocigotos AA y para el 677 los heterocigotos CT, se encontró que los porcentajes de las personas infectadas por VIH en comparación con los adultos sanos presentan una tendencia a ser mayores en los hallazgos de homocigosis para el SNP 1298*MTHFR* y heterocigosis 677*MTHFR*. El resultado en porcentajes de frecuencias de homocigotos y heterocigotos para el polimorfismo 677C>T, en definitiva es similar en ambas poblaciones de infectados y no infectados por VIH y de igual manera al comparar al comparar con estudios previos sobre población colombiana⁽¹⁹³⁾, los valores encontrados por los autores muestran una importante similitud con los hallados por nosotros para la población sana, lo que refuerza los resultados de este trabajo.

Resultados que afirman que ambas poblaciones de adultos colombianos analizadas se encuentran en EHW con respecto al polimorfismo 677C>T, corroboran una vez más la no existencia de diferencia estadísticamente significativa, y la proporción de variación genética entre las dos poblaciones analizadas para este polimorfismo, es demasiado pequeña, lo que permite que el exceso de heterocigotos evidenciado en las frecuencias genotípicas para ambas poblaciones sea muy similar, y esas diferencias mínimas que se encontraron en el estudio, no permitieron que el software genético-poblacional encontrara una diferencia entre las dos poblaciones. En contraste, al analizar el polimorfismo 1298 del gen *MTHFR* en el software estadístico de genética de poblaciones (Genepop) y pese a lo encontrado en las gráficas iniciales de resultados en donde se observaron los porcentajes de frecuencias para cada población en estudio, se determinó que dicho polimorfismo no estaba en EHW lo que indica que aquí si existe una diferencia estadísticamente significativa en la proporción de variación genética, aunque es claro que predomina el genotipo homocigoto AA en población sana, al

igual que en la población infectada por el VIH, se pudo observar que en lo que respecta a las frecuencias alélicas de este polimorfismo 1298A>C predomina el alelo A con diferencias mínimas y valores casi idénticos entre la población de adultos infectados y los no infectados, que si logra detectarse en los programas estadísticos de genética de poblaciones. Como hemos venido describiendo, todos los hallazgos de manera global conducen a poblaciones en EHW, esto descarta procesos de subdivisión poblacional, y excluye procesos de endogamia sobre todo cuando se logra verificar el exceso de heterocigotos en ambas poblaciones con respecto al polimorfismo 677C>T y el predominio de homocigotos en las poblaciones analizadas para el 1298A>C .

Los resultados de nuestro estudio, sin duda alguna y concordando con varias investigaciones⁽⁹⁸⁾, se acercan a corroborar que la presencia de estos polimorfismos del gen *MTHFR* en la población persisten como un mecanismo de selección natural, ya que sin duda alguna el predominio de heterocigotos del 677C>T y de homocigotos 1298A>C con el predominio de los alelos T y A respectivamente en los infectados por VIH, afecta el metabolismo de la homocisteína involucrándose en el riesgo de déficit de folato, y por ende asociándose a susceptibilidad de algunas enfermedades y en lo que respecta solo a nuestro estudio y aunque no hay datos suficientes, pensar en la protección ante infecciones virales que requieran del buen funcionamiento del ciclo del folato para replicarse sigue siendo un interrogante por resolver, pero ya con los hallazgos demostrados puede ser que con una población mayor se puedan encontrar diferencias ampliamente significativas que sean determinantes para corroborar esta hipótesis; hipótesis que tiene sentido ya que como ha sido descrito previamente⁽⁸⁴⁾, la metilación del cDNA es clara y esto permite que todos los procesos en relación con la homeostasis celular que suceden en el ciclo del folato entre los que se encuentra la síntesis de ácidos nucleicos se encuentren alterados por la presencia de polimorfismos y una síntesis adecuada de ácidos nucleicos es necesaria para la inmunidad innata⁽¹⁹⁴⁾ y los ácidos nucleicos juegan un papel clave en los mecanismos moleculares del VIH⁽¹⁹⁵⁾.

De igual manera, la no diferenciación entre las poblaciones con similitud en sus frecuencias alélicas junto con la determinación de posible deriva genética y flujo genético puede anular el coeficiente de endogamia lo cual reitera nuestra hipótesis de selección natural de dichos

polimorfismos, permitiendo la presencia de estos polimorfismos en la población colombiana en general.

Podríamos pensar, que el no encontrar diferencia significativa entre las frecuencias alélicas y genotípicas de estos polimorfismos, quizá responde a que en realidad las personas infectadas por VIH se encontraban totalmente controladas y tratadas con medicamentos antiretrovirales al hacer este proyecto, y esto podría influenciar y hacer que se comporte su ciclo metabólico del folato de la misma manera que las personas sanas, sin embargo, los polimorfismos no cambian su comportamiento por tratamientos antirretrovirales, así que podemos afirmar que no existe una diferencia entre la infección por VIH en aquellas personas con presentación de una u otra forma de estos dos polimorfismos del gen *MTHFR*, pero la investigación si puede comprobar cómo hemos venido diciendo, que un déficit de folato afecta negativamente el sistema inmune conduciendo, no solo en este caso sino en todas las infecciones, a progresión más rápida y severa de enfermedades y co-infecciones por lo que se aconseja un consumo adecuado de folato no solo en personas gestantes para la protección del feto, sino durante toda la vida.

Aunque aún quedan muchas incógnitas por resolver, esta primera investigación en nuestro país pretende abrir las puertas al estudio de los polimorfismos genéticos en relación con el VIH y la resistencia natural ante la infección por este virus.

8 Conclusiones

- Comparando la población colombiana de adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana junto con aquellos adultos de nacionalidad colombiana mayores de edad que no se encontraran infectados por VIH y no hubieran tenido exposición alguna ante dicho virus, se buscaron las diferencias genético-poblacionales de los polimorfismos más estudiados del gen *MTHFR*, 1298A>C y 677C>T, sin embargo los datos encontrados arrojaron que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las dos poblaciones que se encuentran en EHW.
- Logrando realizar la genotipificación de los 365 adultos voluntarios colombianos sin infección y los 201 adultos con infección por el VIH en lo que respecta a los polimorfismos 677C>T *MTHFR* se logra determinar el predominio de heterocigotos CT en ambas poblaciones con el predominio del alelo T en los infectados por el virus y del alelo C en aquellos sin infección por VIH; para el polimorfismo 1298A>C *MTHFR*, la frecuencia alélica del alelo A fue mayor para ambas poblaciones, y respecto a la frecuencia genotípica en lo que respecta a este gen se encontró un predominio de homocigotos AA, y aunque las diferencias poblacionales fueron muy pequeñas al correr el programa de software genético poblacional se logró determinar una diferencia significativa encontrando que no estaban las poblaciones en este caso en EHW sin embargo la diferencia es demasiado pequeña como para ser concluyente y se requiere de más estudios y una población más amplia para llegar a conclusiones definitivas.
- Con esta investigación y analizando los múltiples artículos encontrados en las diferentes bases de datos científicas en referencia a *MTHFR*, folato, VIH y enfermedades asociadas a polimorfismos del gen metilentetrahidrofolato reductasa, hiperhomocistinemia secundaria a variaciones genéticas, alteraciones en los ciclos del folato y de un carbono, entre otras, se puede concluir que la susceptibilidad para enfermedades que se asocia a estos dos polimorfismos del gen *MTHFR* tienen estudios profundos que corroboran dichas asociaciones, entre los estudios algunos han sido replicados en una y otra parte del mundo dando importante significancia estadística, pero sin embargo y a pesar de las múltiples investigaciones, con respecto a la asociación de estos polimorfismos a la

resistencia o limitación de la infección por virus como el de la inmunodeficiencia humana, no han sido realizados y no existen datos concluyentes al respecto ni en nuestro país ni a nivel mundial.

- La hipótesis propuesta al inicio de nuestra investigación, con respecto a la presencia de una fuerza de selección que permitiera la persistencia de los polimorfismos del gen *MTHFR* en la población colombiana analizada a pesar de su asociación con susceptibilidad ante múltiples enfermedades, pudo ser corroborada en este estudio, como se describe claramente en los resultados y en la discusión, descartamos procesos de endogamia, se verificó el exceso de heterocigotos para el polimorfismo 677C>T y de homocigotos para el 1298A>C en ambas poblaciones de adultos colombianos con y sin infección por VIH, sin diferencias estadísticamente significativas, lo que permite determinar esta hipótesis como verdadera, reiterando un proceso de selección natural de dichos polimorfismos, que permite la presencia de estos polimorfismos en la población colombiana en general.
- Si bien no se encuentra diferencia significativa, este es el primer estudio realizado en nuestro país, y siendo estrictos el primero a nivel mundial que involucra adultos con infección por VIH y adultos sanos y pretende ver el comportamiento de los dos principales polimorfismos del gen *MTHFR*; y aunque no hay diferencia significativa, y esperábamos encontrar más de lo hallado, estos hallazgos de nuestra investigación representan el inicio de estudios que pueden ir más allá hasta quizá para determinar la relación de estos polimorfismos con resistencia ante infección vital por VIH o su asociación con el no progreso a SIDA de personas infectadas por VIH, o tal vez se pueda crear una prueba en donde midiendo la enzima MTHFR y asociándola con la presencia o no de polimorfismo se pueda determinar el riesgo de predisposición ante enfermedades o la predisposición genética a ser resistente ante algunas infecciones.

9 Referencias

1. Crider KS, Bailey LB, Berry RJ. Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directions. *Nutrients*. 2011;3(3):370–84.
2. Lucock M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab*. 2000;71(1–2):121–38.
3. Brito A, Hertrampf E, Olivares M, Gaitán D, Sánchez H, Allen LH, et al. Folate, vitamin B12 and human health. *Rev Med Chil*. 2012;140(11):1464–75.
4. Gate D, Danielpour M, Levy R, Breunig JJ, Town T. Basic biology and mechanisms of neural ciliogenesis and the B9 family. *Mol Neurobiol*. 2012;45(3):564–70.
5. Llera Rodríguez L. Importancia del ácido fólico en la salud humana. *Aliment Rev Tecnol e Hig los Aliment*. 2003;(345):19–23.
6. Stover PJ. One-carbon metabolism-genome interactions in folate-associated pathologies. *J Nutr*. 2009;139(12):2402–5.
7. Bailey LB, Gregory JF. Recent Advances in Nutritional Science Folate Metabolism and. *J Nutr*. 1999;129:779–82.
8. Rodríguez GP. Ácido Fólico y Vitamina B2 en la nutrición humana. *Revista Aubana aliment Nutr*. 1998;12(2):107–19.
9. Obican SG, Finnell RH, Mills JL, Shaw GM, Scialli AR. Folic acid in early pregnancy: a public health success story. *FASEB J*. 2010;24(11):4167–74.
10. Harper. *Bioquímica ilustrada*. Igarss 2014. 2014;(1):1–5.
11. Rosenberg IH. A history of the isolation and identification of folic acid (folate). Vol. 61, *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2012. p. 231–5.
12. Bastian H. Lucy Wills (1888-1964): the life and research of an adventurous independent woman. *J R Coll Physicians Edinb*. 2008;38(1):89–91.
13. Green R, Miller JW. Folate deficiency beyond megaloblastic anemia: hyperhomocysteinemia and other manifestations of dysfunctional folate status. *Semin Hematol*. 1999;36(1):47–64.
14. McNulty H, Pentieva K. Folate bioavailability. *Proc Nutr Soc*. 2004;63(4):529–36.
15. Arenas BC. Interrelación entre vitamina B12 y ácido fólico. *Avances*. 2011; 8(25): 10–5.
16. Suh JR, Herbig AK, Stover PJ. New perspectives on folate catabolism. *Annu Rev*

Nutr. 2001;21:255–82.

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).
18. De M, Barboza P, María L, Solís U. Impacto de la fortificación de alimentos con ácido fólico en los defectos del tubo neural en Costa Rica. *Rev Panam Salud Pública*. 2011;30(1):1–6.
19. Correa LMM, Sosa BEP, Cadavid AD, Mesa SLR, López LPM. Ingesta de hierro y folatos durante el embarazo y su relación con indicadores bioquímicos maternos. *Iatreia*. 2012;25(3):194–202.
20. Ferrer RL, Lugo NT, Sánchez YT, Portilla CV. Fundamentos del ácido fólico en la prevención primaria farmacológica de defectos congénitos. *Rev Cuba Med Gen Integr*. 2005;21.
21. Calvo EB, Biglieri A. Impacto de la Fortificación con Ácido Fólico Sobre el Estado Nutricional en Mujeres y la Prevalencia de Defectos del Tubo Neural. Vol. 81, *Revista chilena de pediatría*. 2010.
22. Raymond E. Informe Programa de Fortificación de las Harinas. Departamento de salud Ambiental Instituto de Salud Pública de Chile. 2008.
23. Olivares Grohnert M, Cuestas Montañés E. La fortificación de las harinas y cereales con ácido fólico reduce la prevalencia de cardiopatías congénitas severas. *Evidencias en pediatría*. 2009;5(3).
24. Who/Fao. Guidelines on food fortification with micronutrients. *UnscnOrg*. 2006;341.
25. 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.
26. Palomino-Morales R, Gonzalez-Juanatey C, Vazquez-Rodriguez TR, Rodriguez L, Miranda-Fillooy JA, Fernandez-Gutierrez B, et al. A1298C polymorphism in the *MTHFR* gene predisposes to cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(2):R71.
27. Trovato FM, Catalano D, Ragusa A, Martines GF, Pirri C, Buccheri MA, et al. Relationship of *MTHFR* gene polymorphisms with renal and cardiac disease. *World J Nephrol*. 2015;4(1):127–37.

28. Klai S, Fekih-Mrissa N, El Housaini S, Kaabechi N, Nsiri B, Rachdi R, et al. Association of MTHFR A1298C polymorphism (but not of MTHFR C677T) with elevated homocysteine levels and placental vasculopathies. Vol. 22, Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis. 2011. p. 374–8.
29. Gilbody S, Lightfoot T, Sheldon T. Is low folate a risk factor for depression? A meta-analysis and exploration of heterogeneity. J Epidemiol Community Health. 2007;61(7):631–7.
30. Lazarou C, Kapsou M. The role of folic acid in prevention and treatment of depression: an overview of existing evidence and implications for practice. Complement Ther Clin Pract. 2010;16(3):161–6.
31. Zhang C, Xie B, Fang Y, Cheng W, Du Y, Wang D, et al. Influence of maternal MTHFR A1298C polymorphism on the risk in offspring of schizophrenia. Brain Res. 2010;1320:130–4.
32. Singh K, Singh SK, Raman R. MTHFR A1298C polymorphism and idiopathic male infertility. J Postgrad Med. 2010;56(4):267–9.
33. Oliveira KC De, Bianco B, Verreschi ITN, Guedes AD, Galera BB, Galera MF, et al. Prevalence of the polymorphism MTHFR A1298C and not MTHFR C677T is related to chromosomal aneuploidy in Brazilian Turner Syndrome patients. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2008;52(8):1374–81.
34. Pozzi E, Vergani P, Dalprà L, Combi R, Silvestri D, Crosti F, et al. Maternal polymorphisms for methyltetrahydrofolate reductase and methionine synthetase reductase and risk of children with Down syndrome. Am J Obstet Gynecol. 2009;200(6).
35. Wu X, Wang X, Chan Y, Jia S, Luo Y, Tang W. Folate metabolism gene polymorphisms MTHFR C677T and A1298C and risk for down syndrome offspring: A meta-analysis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2013;167(2):154–9.
36. Ergul E, Sazci A, Utkan Z, Canturk NZ. Polymorphisms in the MTHFR gene are associated with breast cancer. Tumour Biol. 2015;24:286–90.
37. Izmirli M. A literature review of MTHFR (C677T and A1298C polymorphisms) and cancer risk. Mol Biol Rep. 2013;40:625–37.

38. Reddy JA, Clapp DW, Low PS. Retargeting of viral vectors to the folate receptor endocytic pathway. In: Journal of Controlled Release. 2001. p. 77–82.
39. Rodríguez Toro E. Impacto de la deficiencia de micronutrientes en pacientes con VIH/sida. Asoc Colomb Infectología. 2007;11(2):78–86.
40. Hoey L, McNulty H, Duffy ME, Hughes CF, Strain JJ. EURRECA-Estimating folate requirements for deriving dietary reference values. Crit Rev Food Sci Nutr. 2013; 53(10): 1041–50.
41. Ohrvik VE, Witthoft CM. Human folate bioavailability. Nutrients. 2011;3(4):475–90.
42. Skipper HE, Mitchell JH, Bennett LL. Inhibition of Nucleic Acid Synthesis by Folic Acid Antagonists. Cancer Res. 1950;10(8):510–2.
43. Rossi M, Amaretti A, Raimondi S. Folate production by probiotic bacteria. Vol. 3, Nutrients. 2011. p. 118–34.
44. Subramanian VS, Chatterjee N, Said HM. Folate uptake in the human intestine: Promoter activity and effect of folate deficiency. J Cell Physiol. 2003;196(2):403–8.
45. Fowler B. The folate cycle and disease in humans. Vol. 78, Kidney international. Supplement. 2001. p. S221–9.
46. Fox JT, Stover PJ. Folate-mediated one-carbon metabolism. Vitam Horm. 2008;79:1–44.
47. Nijhout HF, Reed MC, Budu P, Ulrich CM. A mathematical model of the folate cycle: New insights into folate homeostasis. J Biol Chem. 2004;279(53):55008–16.
48. Shane B. Folate chemistry and metabolism. Clin Res Regul Aff. 2001;18:137–59.
49. Bailey LB, Gregory JF. Folate metabolism and requirements. J Nutr. 1999;129:779–82.
50. Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. Vol. 533, Gene. 2014.
51. Thakur S, More D, Rahat B, Khanduja KL, Kaur J. Increased synthesis of folate transporters regulates folate transport in conditions of ethanol exposure and folate deficiency. Mol Cell Biochem. 2016;411(1–2):151–60.
52. Mason JB, Choi SW. Effects of alcohol on folate metabolism: Implications for carcinogenesis. In: Alcohol. 2005. p. 235–41.

53. Halsted CH, Villanueva JA, Devlin AM, Chandler CJ. Metabolic interactions of alcohol and folate. J Nutr [Internet]. 2002;132(8 Suppl):2367S–2372S. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163694>
54. Chen C, Ke J, Zhou XE, Yi W, Brunzelle JS, Li J, et al. Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. Nature. 2013;500(7463):486–9.
55. Antony AC. Folate Receptors. Annu Rev Nutr. 1996;16(1):501–21.
56. Sabharanjak S, Mayor S. Folate receptor endocytosis and trafficking. Vol. 56, Advanced Drug Delivery Reviews. 2004. p. 1099–109.
57. Kamen BA, Smith AK. A review of folate receptor alpha cycling and 5-methyltetrahydrofolate accumulation with an emphasis on cell models in vitro. Vol. 56, Advanced Drug Delivery Reviews. 2004. p. 1085–97.
58. 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.
59. Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. Vol. 533, Gene. 2014. p. 11–20.
60. Daubner SC, Matthews RG. Purification and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from pig liver. J Biol Chem. 1982;257(1):140–5.
61. 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.
62. 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.
63. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan a M, Rosenblatt DS, Matthews RG, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. Vol. 7, Nature genetics. 1994. p. 195–200.
64. 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.

65. Rosenblatt DS. Methylenetetrahydrofolate reductase. Clin Invest Med. Canada; 2001 Feb;24(1):56–9.
66. Toffoli G, De Mattia E. Pharmacogenetic relevance of MTHFR polymorphisms. Pharmacogenomics. 2008;9:1195–206.
67. Yafei W, Lijun P, Jinfeng W, Xiaoying Z. Is the prevalence of MTHFR C677T polymorphism associated with ultraviolet radiation in Eurasia? J Hum Genet. 2012;57(12):780–6.
68. Gaughan DJ, Barbaux S, Kluijtmans LAJ, 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.
69. Berman HM, Battistuz T, Bhat TN, Bluhm WF, Bourne PE, Burkhardt K, et al. The protein data bank. Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr. 2002;58(6 I):899–907.
70. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation Between Folate Status, a Common Mutation in Methylenetetrahydrofolate Reductase, and Plasma Homocysteine Concentrations. Circulation. 1996;93(1):7–9.
71. Trabetti E. Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardiovascular risk. J Appl Genet. 2008;49(3):267–82.
72. Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. Vol. 34, Journal of Inherited Metabolic Disease. 2011. p. 75–81.
73. Han IB, Kim OJ, Ahn JY, Oh D, Hong SP, Huh R, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR 677C>T and 1298A>C) polymorphisms and haplotypes with silent brain infarction and homocysteine levels in a Korean population. Yonsei Med J. 2010;51(2):253–60.
74. Adinolfi LE, Ingrosso D, Cesaro G, Cimmino A, D'Antò M, Capasso R, et al. Hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T polymorphism promote steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C patients. Hepatology [Internet]. 2005;41(5):995–1003. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.20664>
75. Vilaseca MA, Sierra C, Colomé C, Artuch R, Valls C, Muñoz-Almagro C, et al. Hyperhomocysteinemia and folate deficiency in human immunodeficiency virus-

- infected children. Eur J Clin Invest. 2001;31(11):992–8.
76. Deschamps MM, Noel F, Bonhomme J, Devieux JG, Saint-Jean G, Zhu Y, et al. Prevention of mother-to-child transmission of HIV in Haiti. Rev Panam Salud Publica. 2009;25(1):24–30.
 77. Matthews RG. Methylenetetrahydrofolate reductase: A common human polymorphism and its biochemical implications. Vol. 2, Chemical Record. 2002. p. 4–12.
 78. Ravanel S, Rébeillé F. Folate. In: Phytonutrients. 2012. p. 173–202.
 79. Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB. Folate and DNA Methylation : A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate ' s Role. Am Soc Nutr. 2012;3(14):21–38.
 80. Heinzinger NK, Bukinsky MI, Haggerty S a, Ragland a M, Kewalramani V, Lee M a, et al. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(15):7311–5.
 81. Rein A, Henderson LE, Levin JG. Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: Significance for viral replication. Vol. 23, Trends in Biochemical Sciences. 1998. p. 297–301.
 82. Wang L, Shanguan S, Chang S, Yu X, Wang Z, Lu X, et al. Determining the association between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and genomic DNA methylation level: A meta-analysis. Birth Defects Res Part A - Clin Mol Teratol. 2016;106(8):667–74.
 83. Bronowicki J-P, Abdelmouttaleb I, Peyrin-Biroulet L, Venard V, Khiri H, Chabi N, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase 677 T allele protects against persistent HBV infection in West Africa. J Hepatol. Elsevier; 2008 Apr 1 [cited 2017 Jan 20];48(4):532–9.
 84. Kang SS, Wong PWK, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. Metabolism. 1987;36(5):458–62.
 85. Friso S, Choi S-W, 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.

86. 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.
87. Qi Z, Hoffman G, Kurtycz D, Yu J. Prevalence of the C677T substitution of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in Wisconsin. *Genet Med.* 2003;5(6):458–9.
88. Bottiglieri T, Parnetti L, Arning E, Ortiz T, Amici S, Lanari a, et al. Plasma total homocysteine levels and the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene: a study in an Italian population with dementia. *Mech Ageing Dev.* 2001;122(16):2013–23.
89. Belkahla R, Omezzine A, Kchok K, Rebhi L, Ben Hadj Mbarek I, Rejeb J, et al. Effect of polymorphisms on key enzymes in homocysteine metabolism, on plasma homocysteine level and on coronary artery-disease risk in a Tunisian population. *Ann Cardiol d'angéiologie.* 2008;57(4):219–24.
90. Liew S-C, Gupta E Das. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet.* 2015;58(1):1–10.
91. 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.
92. Olivares AB, Berruezo GR, Cava MJB, Graciá CM, Caston MJP. Estimación de la ingesta y necesidades de enriquecimiento de folatos y ácido fólico en alimentos. *Arch Latinoam Nutr.* 2005;55(1):5–14.
93. Bailey LB. Dietary reference intakes for folate: the debut of dietary folate equivalents. *Nutr Rev.* 1998;56(10):294–9.
94. Zappacosta B, Graziano M, Persichilli S, Di Castelnuovo A, Mastroiacovo P, Iacoviello L. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms: Genotype frequency and association with homocysteine and folate levels in middle-southern Italian adults. *Cell Biochem Funct.* 2014;32(1):1–4.

95. Wilcken B. 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.
96. Kim Y-I. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Pharmacogenetics: A New Role of Single Nucleotide Polymorphisms in the Folate Metabolic Pathway in Human Health and Disease. *Nutr Rev.* 2005;63(11):398–407.
97. Schwahn B, Rozen R. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: clinical consequences. *Am J Pharmacogenomics.* 2001;1(3):189–201.
98. Li WX, Dai SX, Zheng JJ, Liu JQ, Huang JF. Homocysteine metabolism gene polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) jointly elevate the risk of folate deficiency. *Nutrients.* 2015;7(8):6670–87.
99. Liang S, Zhou Y, Wang H, Qian Y, Ma D, Tian W, et al. The effect of multiple single nucleotide polymorphisms in the folic acid pathway genes on homocysteine metabolism. *Biomed Res Int.* 2014;2014:560183.
100. Bai R, Liu W, Zhao A, Zhao Z, Jiang D. Quantitative assessment of the associations between MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and risk of fractures: A meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2013;40(3):2419–30.
101. Kumar J, Das SK, Sharma P, Karthikeyan G, Ramakrishnan L, Sengupta S. Homocysteine levels are associated with MTHFR A1298C polymorphism in Indian population. *J Hum Genet.* 2005;50(12):655–63.
102. Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. Nutrition and epigenetics: An interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. Vol. 23, *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2012. p. 853–9.
103. De Vos L, Chanson A, Liu Z, Ciappio ED, Parnell LD, Mason JB, et al. Associations between single nucleotide polymorphisms in folate uptake and metabolizing genes with blood folate, homocysteine, and DNA uracil concentrations. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(4):1149–58.
104. Caudill MA. Folate bioavailability: Implications for establishing dietary recommendations and optimizing status. Vol. 91, *American Journal of Clinical Nutrition.* 2010.
105. Chen P, Li C, Li X, Li J, Chu R, Wang H. Higher dietary folate intake reduces the

- breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2014;110(9):2327–38.
106. Antoniadou C, Shirodaria C, Leeson P, Baarholm OA, Van-Assche T, Cunningham C, et al. MTHFR 677 C>T polymorphism reveals functional importance for 5-methyltetrahydrofolate, not homocysteine, in regulation of vascular redox state and endothelial function in human atherosclerosis. *Circulation*. 2009;119(18):2507–15.
 107. 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.
 108. Srisawat U, Reynolds GP, Zhang ZJ, Zhang XR, Arranz B, San L, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C/T polymorphism is associated with antipsychotic-induced weight gain in first-episode schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* [Internet]. 2014;17(3):485–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24229535>
 109. Nishi A, Numata S, Tajima A, Kinoshita M, Kikuchi K, Shimodera S, et al. Meta-analyses of blood homocysteine levels for gender and genetic association studies of the MTHFR C677T polymorphism in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2014;40(5):1154–63.
 110. Gallegos-Arreola MP, García-Ortiz JE, Figueroa LE, Puebla-Pérez AM, Morgan-Villela G, Zúñiga-González GM. Association of the 677C→T polymorphism in the MTHFR gene with colorectal cancer in Mexican patients. *Cancer Genomics and Proteomics*. 2009;6(3):183–8.
 111. Haerian MS, Haerian BS, Molanaei S, Kosari F, Sabeti S, Bidari-Zerehpooch F, et al. MTHFR rs1801133 polymorphism and susceptibility to colorectal cancer in Iranian population: evidence of a case-control study and meta-analysis. *Pharmacogenomics*. 2016;
 112. Zarebska A, Ahmetov II, Sawczyn S, Weiner AS, Kaczmarczyk M, Ficek K, et al. Association of the *MTHFR* 1298A>C (rs1801131) polymorphism with speed and strength sports in Russian and Polish athletes. *J Sports Sci*. 2014;32(4):375–82.
 113. 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.

114. Malavazi I, Abrão EP, Mikawa AY, Tagliavini SA, da Costa PI. [Evaluation of the polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene and the levels of folate and B12 in HIV-infected patients under antiretroviral therapy]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004;37(6):469–75.
115. Zhang T, Lou J, Zhong R, Wu J, Zou L, Sun Y, et al. Genetic Variants in the Folate Pathway and the Risk of Neural Tube Defects: A Meta-Analysis of the Published Literature. *PLoS One.* 2013;8(4).
116. Meethal SV, Hogan KJ, Mayanil CS, Iskandar BJ. Folate and epigenetic mechanisms in neural tube development and defects. *Child's Nerv Syst.* 2013;29(9).
117. Vanderput NMJ, Steegerstheunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, Eskes TKAB, Vandenheuvel LP, et al. Mutated Methylenetetrahydrofolate Reductase As A Risk Factor for Spina-Bifida. *Lancet.* 1995;346(8982):1070–1.
118. Bae J, Shin SJ, Cha SH, Choi DH, Lee S, Kim NK. Prevalent genotypes of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T and A1298C) in spontaneously aborted embryos. *Fertil Steril.* 2007;87(2):351–5.
119. Talaulikar V, Arulkumaran S. Folic acid in pregnancy. *Obstet Gynaecol Reprod Med* [Internet]. 2013;23(9):286–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1751721413001206>
120. Vásquez AO, Suarez-Obando F. [Neural tube defects and folic acid: a historical overview of a highly successful preventive intervention]. *História, ciências, saúde--Manguinhos* [Internet]. 2015;22(4):1157–72. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84948978758&partnerID=tZOtx3y1>
121. Alghasham A, Settin AA, Ali A, Dowaidar M, Ismail H. Association of MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms with hypertension. *Int J Health Sci (Qassim).* 2012;6(1):3–11.
122. Wu Y Le, Hu CY, Lu SS, Gong FF, Feng F, Qian ZZ, et al. Association between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T/A1298C polymorphisms and essential hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Metabolism.*

2014;63(12):1503–11.

123. 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.
124. De Paz R, Hernández-Navarro F. Manejo, prevención y control de la anemia megaloblástica secundaria a déficit de ácido fólico. In: *Nutricion Hospitalaria.* 2006. p. 113–9.
125. Pu D, Shen Y, Wu J. Association between mthfr gene polymorphisms and the risk of autism spectrum disorders: A meta-analysis. *Autism Res.* 2013;6(5).
126. Liu X, Solehdin F, Cohen IL, Gonzalez MG, Jenkins EC, Lewis MES, et al. Population- and family-based studies associate the MTHFR gene with idiopathic autism in simplex families. *J Autism Dev Disord.* 2011;41:938–44.
127. Snowdon DA, Tully CL, Smith CD, Riley KP, Markesbery WR. Serum folate and the severity of atrophy of the neocortex in Alzheimer disease: Findings from the Nun Study. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(4):993–8.
128. Clarke R, Smith a D, Jobst K a, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 1998;55(11):1449–55.
129. Zidan HE, Rezk NA, Mohammed D. MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms and their relation to homocysteine level in Egyptian children with congenital heart diseases. *Gene.* 2013;529(1):119–24.
130. Yan L, Zhao L, Long Y, Zou P, Ji G, Gu A, et al. Association of the Maternal MTHFR C677T Polymorphism with Susceptibility to Neural Tube Defects in Offsprings: Evidence from 25 Case-Control Studies. *PLoS One.* 2012;7(10).
131. Jongbloet PH, Verbeek ALM, Den Heijer M, Roeleveld N. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms resulting in suboptimal oocyte maturation: A discussion of folate status, neural tube defects, schizophrenia, and vasculopathy. *J Exp Clin Assist Reprod.* 2008;5.
132. Hussein TM, Elneely DI. Y-chromosome microdeletions and the MTHFR C677T polymorphism in Egyptian men with nonobstructive azoospermia. *Hum Androl.* 2014;4(3):66–70.

133. Gupta N, Sarkar S, David A, Gangwar PK, Gupta R, Khanna G, et al. Significant impact of the MTHFR polymorphisms and haplotypes on male infertility risk. *PLoS One*. 2013;8(7):e69180.
134. Eloualid A, Abidi O, Charif M, El houate B, Benrahma H, Louanjli N, et al. Association of the MTHFR A1298C variant with unexplained severe male infertility. *PLoS One*. 2012;7(3):1–7.
135. Nair RR, Khanna A, Singh R, Singh K. Association of maternal and fetal MTHFR A1298C polymorphism with the risk of pregnancy loss: A study of an Indian population and a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2013;99(5):1311–1318.e4.
136. Montjean D, Benkhalifa M, Dessolle L, Cohen-Bacrie P, Belloc S, Siffroi JP, et al. Polymorphisms in MTHFR and MTRR genes associated with blood plasma homocysteine concentration and sperm counts. *Fertil Steril*. 2011;95(2):635–40.
137. van Huis-Tanja LH, Gelderblom H, Punt CJ a, Guchelaar H-J. MTHFR polymorphisms and capecitabine-induced toxicity in patients with metastatic colorectal cancer. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(4):208–18.
138. Kulkarni A, Dangat K, Kale A, Sable P, Chavan-gautam P, Joshi S. Effects of altered maternal folic acid, vitamin B12 and docosahexaenoic acid on placental global DNA methylation patterns in Wistar rats. *PLoS One*. 2011;6(3):e17706.
139. Yan J, Yin M, Dreyer ZE, Scheurer ME, Kamdar K, Wei Q, et al. A meta-analysis of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and risk of acute lymphoblastic leukemia in children. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;58(4):513–8.
140. C.E. BJ, Butterworth CEJ. Folate status, women's health, pregnancy outcome, and cancer. *J Am Coll Nutr*. 1993;12(4):438–41.
141. Jennings BA, Willis G. How folate metabolism affects colorectal cancer development and treatment; a story of heterogeneity and pleiotropy. Vol. 356, *Cancer Letters*. 2015. p. 224–30.
142. 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.
143. Guerrero Sánchez F, Arizcorreta Yarza A, Gutiérrez Saborido D, Ruiz Estévez B. Tratamiento de la infección por el VIH. *Med - Programa Form Médica Contin*

Acreditado. 2014;11(49):2912–9.

144. Hughes LB, Beasley TM, Patel H, Tiwari HK, Morgan SL, Baggott JE, et al. Racial or ethnic differences in allele frequencies of single-nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and their influence on response to methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(9):1213–8.
145. ONUSIDA E de trabajo intergerencial del. Prevencion del VIH/ SIDA entre los jovenes. articulo. 2006;1:1–8.
146. Tobón JC, Toro AI. Estudio del paciente con infección por VIH. *Med Lab*. 2008;14:11–42.
147. Ndakala FN, Oyugi JO, Oluka MO. HIV-Associated Polyneuropathy in Resource-Limited Settings: Genetic Predisposition and Vitamin Variations. *World J AIDS* [Internet]. 2017;7(2):106–21. Available from: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/wja.2017.72010>
148. Vodicka MA, Koepp DM, Silver PA, Emerman M. HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev*. 1998;12(2):175–85.
149. Puligujja P, McMillan J, Kendrick L, Li T, Balkundi S, Smith N, et al. Macrophage folate receptor-targeted antiretroviral therapy facilitates drug entry, retention, antiretroviral activities and biodistribution for reduction of human immunodeficiency virus infections. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2013;9(8):1263–73.
150. Uccelli MC, Torti C, Lapadula G, Labate L, Cologni G, Tirelli V, et al. Influence of folate serum concentration on plasma homocysteine levels in HIV-positive patients exposed to protease inhibitors undergoing HAART. *Ann Nutr Metab*. 2006;50(3):247–52.
151. Montagnier L. Historical essay: A History of HIV Discovery. *Science* (80-). 2002;298(5599):1727–8.
152. Chavan LB. History of HIV & AIDS. *Natl J Community Med*. 2011;2(3):502–3.
153. OMS. OMS | VIH/SIDA [Internet]. WHO. 2015. p. 1. Available from: http://www.who.int/topics/hiv_aids/es/
154. ONUSIDA. Información Básica sobre el VIH. ONU [Internet]. 2008;1(2):1–2. Available from:

http://data.unaids.org/pub/factsheet/2008/20080519_fastfacts_hiv_es.pdf

155. Gallo RC, Montagnier L. The discovery of HIV as the cause of AIDS. *N Engl J Med*. 2003;349(24):2283–5.
156. Barré-Sinoussi F, Ross AL, Delfraissy J-F. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2013;11(12):877–83. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro3132>
157. Nuñez RL, Paola S, Mira Á. Boletín epidemiológico, situación del VIH / Sida Colombia 2013. MinSalud. 2013;19.
158. ONUSIDA E. Informe Mundial VIH/SIDA. Naciones Unidas. 2013. 214 p.
159. Contreras AM, Reta CB, Torres O, Celis A, Domínguez J. Sangre segura en ausencia de infecciones virales por VHB, VHC y VIH en período de ventana serológica de donadores. *Salud Publica Mex*. 2011;53(SUPPL. 1).
160. Guerra ME, Rodríguez A, Tovar V, Blanco-Cedres L, Garrido E, Carvajal A, et al. Relación entre lactancia materna y transmisión del VIH/SIDA. *Acta Odontológica Venez*. 2009;313–9.
161. Clinica de Barcelona H universitario. VIH y embarazo. *Clin Barcelona*. 2014;1–27.
162. Montagnier L. 25 Years after HIV discovery: Prospects for cure and vaccine (Nobel Lecture). *Angew Chemie - Int Ed*. 2009;48(32):5815–26.
163. Esparza J. A brief history of the global effort to develop a preventive HIV vaccine. Vol. 31, *Vaccine*. 2013. p. 3502–18.
164. Frange P, Blanche S. [Mother-to-child transmission (MTCT) of HIV]. *Presse Med*. 2014;43(6 Pt 1):691–7.
165. Drake AL, Wagner A, Richardson B, John-Stewart G. Incident HIV during Pregnancy and Postpartum and Risk of Mother-to-Child HIV Transmission: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Med*. 2014;11(2).
166. Shaw GM, Hunter E. HIV transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(11).
167. Delgado R. Características virológicas del VIH. Vol. 29, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011. p. 58–65.
168. Gimeno Cardona C, Pérez JL, Orta Mira María del Remedio Guna Serrano N, María González-Alba J, Rodríguez-Domínguez María Luisa Mateos Lindemann M.

- Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Determinación de la carga viral del VIH-1. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(3):47–50.
169. Paz M. Compendio de microbiología médica. Univ Marian Galvez [Internet]. 2012;50–6. Available from: https://books.google.com/books?id=OaSu2eowg_wC&pgis=1
 170. Murray Patrick R, Rosenthal Ken S & PMA. Microbiología médica. Microbiología médica. 2005. Capítulo I, pags: 17-18.
 171. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Introducción a la microbiología médica. Microbiología médica. 2013. 3 p.
 172. Soto Ramírez LE. Mecanismos patogénicos de la infección por VIH. *Rev Investig clínica*. 2004;56(2):143–52.
 173. Codina C, Martín M. T IO. Fisiopatogenia del VIH. In: *Farmacia Hospitalaria*, Tomo II. 2002. p. 1493–516.
 174. Sabin CA, Lundgren JD. The natural history of HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*. 2013;1.
 175. O’Cofaigh E, Lewthwaite P. Natural history of HIV and AIDS. *Medicine (Baltimore)*. 2013;41(8):411–6.
 176. Lozano de León-Naranjo F. Infección por el VIH (I). *Med - Programa Form Médica Contin Acreditado*. 2014;11(49):2893–901.
 177. Restrepo C, Rallón NI, Benito JM. Factores que influyen en la resistencia a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Med Clin (Barc)*. 2011;137(13):600–4.
 178. Heeney JL. Origins of HIV and the Evolution of Resistance to AIDS. *Science (80-)*. 2006;313(5786):462–6.
 179. Llano A, Esté JA. Chemokines and other cytokines in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. *Inmunol*. 2005;24(2):246–60.
 180. Valadez-González N, González-Martínez P, Lara-Perera D, Vera-Gamboa L, Góngora-Biachi R. Implicación del alelo CCR5-Δ32 en la progresión clínica de pacientes VIH-1+ en Yucatán, México. *Salud Publica Mex*. 2011;53(6):463–8.
 181. 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.
182. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell.* 1996;86(3):367–77.
 183. Mouquet H, Nussenzweig MC. HIV: Roadmaps to a vaccine. *Nature.* 2013;496:441–2.
 184. Johnston MI, Fauci AS. An HIV vaccine--evolving concepts. *N Engl J Med.* 2007;356(20):2073–81.
 185. Haynes BF, Burton DR. Developing an HIV vaccine. *Science* (80-). 2017; 355(6330): 1129–30.
 186. Rousset F. Genepop 4.4. *J Chem Inf Model.* 1989;53:160.
 187. Rousset F. GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour.* 2008;8(1):103–6.
 188. Pita Fernández S, Pérttega Díaz S. Asociación de variables cualitativas: test de Chi-cuadrado. *Metofología la Investig.* 2004;(1):1–5.
 189. Sabando M. Genética de poblaciones. *Eikasias Rev Filos.* 2012;(42):105–14.
 190. Segnini S. Prueba de hipótesis. In: *Fundamentos de Bioestadística.* 2005. p. 55.
 191. Siqueira ERF, Oliveira CPMS, Muniz MTC, Silva F, Pereira LMMB, Carrilho FJ. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and high plasma homocysteine in chronic hepatitis C (CHC) infected patients from the Northeast of Brazil. *Nutr J [Internet].* 2011;10(1):86. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3170250&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 192. Kharb S, Kumawat M, Lallar M, Ghalaut PS, Nanda S. Serum iron, Folate, Ferritin and CD4 Count in HIV Seropositive Women. *Indian J Clin Biochem.* 2017;32(1):95–8.
 193. Romero-Sanchez C, Gomez-Gutierrez A, Gomez PE, Casas-Gomez MC, Briceno I. C677T (RS1801133) MTHFR gene polymorphism frequency in a colombian population. *Colomb medica (Cali, Colomb.* 2015;46(2):75–9.
 194. Yoneyama M, Fujita T. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. Vol. 20, *Reviews in Medical Virology.* 2010. p. 4–22.

195. Levin JG, Guo J, Rouzina I, Musier-Forsyth K. Nucleic Acid Chaperone Activity of HIV-1 Nucleocapsid Protein: Critical Role in Reverse Transcription and Molecular Mechanism. Vol. 80, Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. 2005. p. 217–86.

10 Anexos

Anexo 1. Fenotipos y rasgos relacionados al gen *MTHFR*.

Fenotipo o rasgo	Fuente	Localizaciones genómicas	Fenotipo o rasgo	Fuente	Localizaciones genómicas
<i>Espina bífida aperta</i>	Orphanet (ORPHA268392)	<i>Cromosoma 1</i> → 1:10597190; 1:114811507; 1:159474785 <i>Cromosoma 6</i> → 6:164050067 <i>Cromosoma 14</i> → 14:64895255 <i>Cromosoma 19</i> → 19:47881280	<i>Deficiencia de metilentetrahidrofolato reductasa</i>	DDG2P - Decipher (GRCh37)	<i>Cromosoma 1</i> → 1:10597190
<i>Espina bífida cística</i>	Orphanet (ORPHA268762)	<i>Cromosoma 1</i> → 1:10597190; 1:114811507; 1:159474785 <i>Cromosoma 6</i> → 6: 164050067 <i>Cromosoma 14</i> → 14:64895255 <i>Cromosoma 19</i> → 19:47881280	<i>Defectos de tubo neural, sensibilidad y susceptibilidad al folato</i>	OMIM morbid #601634	<i>Cromosoma 1</i> → 1:10597190; 1: 237221973 <i>Cromosoma 5</i> → 5: 5621498 <i>Cromosoma 14</i> → 14:64071841

<i>Espina bífida cervicotorácica abierta</i>	Orphanet (ORPHA268397)	<i>Cromosoma 1 → 1:10597190; 1:114811507; 1:159474785</i> <i>Cromosoma 6 → 6:164050067</i> <i>Cromosoma 14 → 14:64895255</i> <i>Cromosoma 19 → 19:47881230</i>	<i>Esquizofrenia</i>	OMIM morbid #181500	Múltiples genes involucrados en todos los cromosomas autosómicos y en los sexuales.
<i>Espina bífida cervicotorácica cística</i>	Orphanet (ORPHA268766)	<i>Cromosoma 1 → 1:10597190; 1:114811507; 1:159474785</i> <i>Cromosoma 6 → 6:164050067</i> <i>Cromosoma 14 → 14:64895255</i> <i>Cromosoma 19 → 19:47881230</i>	<i>Interconversión del tetrahidrofolato</i>	GOA (GO 0035999) PMID:25736335 PMID:12673793	<i>Cromosoma 1 → 1:10597190</i> <i>Cromosoma 15 → 15:79629210</i>
<i>Homocistinuria por deficiencia de actividad de N (5,10) - metilentetrahidr</i>	OMIM morbid #236250	<i>Cromosoma 1 → 1:10597190</i>	<i>Espina bífida toracolumbosacral abierta</i>	Orphanet (ORPHA268384)	<i>Cromosoma 1 → 1:10597190; 1:114811507; 1:159474785</i> <i>Cromosoma 6 → 6:164050067</i>

Búsqueda de selección en los polimorfismos 1298A>C (c.1286A>C) (rs1801131) (p.E429A) y 677C>T (c.665C>T) (rs1801133) (p.A222V) del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) en una población colombiana

<i>ofolato reductasa</i>					<i>Cromosoma 14</i> → 14:64895255 <i>Cromosoma 19</i> → 19:47881280
<i>Homocistinuria por deficiencia de metilentetrahidrofolato reductasa</i>	Orphanet (ORPHA395)	<i>Cromosoma 1</i> → 1:10597190	<i>Espina bífida toracolumbosacral cística</i>	Orphanet (ORPHA268752)	<i>Cromosoma 1</i> → 1:10597190; 1:114811507; 1:159474785 <i>Cromosoma 6</i> → 6:164050067 <i>Cromosoma 14</i> → 14:64895255 <i>Cromosoma 19</i> → 19:47881280
<i>Anencefalia / Exencefalia aislada</i>	Orphanet (ORPHA1048)	<i>Cromosoma 1</i> → 1:10597190; 1: 159474785	<i>Trombofilia por defecto de trombina</i>	OMIM morbid #188050	<i>Cromosoma 1</i> → 1:10597190 <i>Cromosoma 6</i> → 6:5621333 <i>Cromosoma 10</i> → 10:11231594 <i>Cromosoma 11</i> → 19:45148997
<i>Espina bífida lumbosacra abierta</i>	Orphanet (ORPHA268388)	<i>Cromosoma 1</i> → 1:10597190; 1:114811507; 1:159474785	<i>Espina bífida total abierta</i>	Orphanet (ORPHA268377)	<i>Cromosoma 1</i> → 1:10597190; 1:114811507; 1:159474785

Búsqueda de selección en los polimorfismos 1298A>C (c.1286A>C) (rs1801131) (p.E429A) y 677C>T (c.665C>T) (rs1801133) (p.A222V) del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) en una población colombiana

		Cromosoma 6 → 6:164050067 Cromosoma 14 → 14:64895255 Cromosoma 19 → 19:47881280			Cromosoma 6 → 6:164050067 Cromosoma 14 → 14:64895255 Cromosoma 19 → 19:47881280
Espina bífida lumbosacra cística	Orphanet (ORPHA268758)	Cromosoma 1 → 1:10597190; 1:114811507; 1:159474785 Cromosoma 6 → 6:164050067 Cromosoma 14 → 14:64895255 Cromosoma 19 → 19:47881280	Espina bífida total cística	Orphanet (ORPHA268748)	Cromosoma 1 → 1:10597190; 1:114811507; 1:159474785 Cromosoma 6 → 6:164050067 Cromosoma 14 → 14:64895255 Cromosoma 19 → 19:47881280
Toxicidad de Metrotexate o selección de dosis	Orphanet (ORPHA413690)	Cromosoma 1 → 1:10597190 Cromosoma 8 → 8:63343632 Cromosoma 21 → 21:43337603	Alta Espina bífida abierta	Orphanet (ORPHA268740)	Cromosoma 1 → 1:10597190; 1:114811507; 1:159474785 Cromosoma 6 → 6:164050067 Cromosoma 14 → 14:64895255

Búsqueda de selección en los polimorfismos 1298A>C (c.1286A>C) (rs1801131) (p.E429A) y 677C>T (c.665C>T) (rs1801133) (p.A222V) del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) en una población colombiana

					<i>Cromosoma 19</i> → 19:47881280
<i>Actividad metilentetrahidrofolato reductasa (NAD(P)H)</i>	<i>GOA</i> (GO 0004489) PMID:25736335 PMID:12673793	<i>Cromosoma 1</i> → 1:10597190	<i>Alta Espina bífida cística</i>	Orphanet (ORPHA268770)	<i>Cromosoma 1</i> → 1:10597190; 1:114811507; 1:159474785 <i>Cromosoma 6</i> → 6:164050067 <i>Cromosoma 14</i> → 14:64895255 <i>Cromosoma 19</i> → 19:47881280

Basada en Ensembl Human GRCh38.p7 *gen MTHFR* - fenotipos

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Phenotype?db=core;g=ENSG00000177000;r=1:11785723-11806920

Anexo 2. Fenotipos, enfermedades y características asociadas con variaciones en el gen *MTHFR*.

Fenotipo o rasgo/ #Variantes asociadas	Fuente	Variación/ localización genómica /Genes involucrados	Descripción
Fibrilación Auricular 65 variantes	NHGRI-EBI GWAS catalog PMID:19597492	rs17375901 // 1:11787479- 11797459 // <i>MTHFR</i>, <i>NPPA</i>	Latidos auriculares descoordinados y desorganizados, que generan un ritmo cardíaco rápido e irregular; arritmia muy común en la práctica clínica, en el electrocardiograma no se observan ondas P.
Enfermedad Coronaria 13 variantes	dbGap	rs1476413 // 1:11787243 - 11797243 // <i>MTHFR</i>	Placa ateromatosa se deposita dentro de las arterias coronarias impidiendo el normal suministro de sangre oxigenada al músculo cardíaco, con una probabilidad alta de infarto agudo de miocardio.
Tumor Estromal Gastrointestinal	ClinVar	rs1801131 // rs1811133// 1:11789419-11799419 // 1:11791321-11801321 // <i>MTHFR</i>	Neoplasia conocida como GIST (gastrointestinal <i>stromal tumors</i>), tumor mesenquimal frecuente maligno, se manifiesta inicialmente con disfagia, hemorragias gastrointestinales o no muestra síntomas hasta su aparición tardía en forma de metástasis principalmente a hígado.
Homocistinuria por déficit de <i>MTHFR</i> 6 variantes	OMIM #607093 ClinVar	rs121434296// 1:11789766- 11799766 // <i>MTHFR</i> rs267606886//1:11790114- 11800114 // <i>MTHFR</i> rs267606887 // 1:11790158- 11800158// <i>MTHFR</i> rs121434297 // 1:11790161- 11800161// <i>MTHFR</i>	Enfermedad metabólica caracterizada por daño neurológico. Aparece durante el primer año de vida con signos neurológicos graves, apneas recurrentes, microcefalia y convulsiones. Existen formas que aparecen en la adolescencia o en la edad adulta con regresión mental, ataxia y, trastornos psiquiátricos tipo esquizofrenia que pueden ligarse a accidentes cerebrovasculares. Puede asociarse a degeneración subaguda de la médula espinal. Se transmite de forma autosómica recesiva.

Búsqueda de selección en los polimorfismos 1298A>C (c.1286A>C) (rs1801131) (p.E429A) y 677C>T (c.665C>T) (rs1801133) (p.A222V) del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) en una población colombiana

<i>Homocisteinuria debido a déficit de MTHFR 1 variante.</i>	ClinVar OMIM #607093	<i>rs45590836</i> // 1:11786216- 11796216 // <i>MTHFR</i>	Sinónimo de la anterior. Deficiencia de <i>cistationina beta sintasa</i> ; enfermedad hereditaria autosómica recesiva, afecta el metabolismo de la metionina, con múltiples formas de presentación en donde predomina la de la infancia.
<i>Homocistinemia por deficiencia de MTHFR 45 variantes</i>	ClinVar	<i>rs768434408</i> // 1:11785682- 11795682 // <i>MTHFR</i> <i>rs45590836</i> // 1:11786216- 11796216 // <i>MTHFR</i> <i>rs574132670</i> // 1:11795250- 11805250 // <i>MTHFR</i>	Trastorno muchas veces considerado como factor de riesgo oculto para enfermedad cerebrovascular isquémica; cursa con elevación de homocisteína en sangre, se usa indiscriminadamente el término Homocistinemia y Homocistinuria con síntomas similares.
<i>Tumor maligno de próstata 1 variante</i>	ClinVar	<i>rs193921032</i> // 1:11786220- 11796220 // <i>MTHFR</i>	Neoplasia maligna de la próstata. Cursa con síntomas de obstrucción y urgencia urinaria. Este tipo de tumor presenta un crecimiento acelerado con diseminación a otros órganos en un tiempo record de no ser detectado a tiempo
<i>Susceptibilidad a Esquizofrenia 1 variante</i>	ClinVar OMIM #181500	<i>rs1801131</i> // 1:11789419- 11799419 // <i>MTHFR</i>	Se trata de grupo de enfermedades mentales complejas con síntomas divididos en dos grupos: positivos y negativos. Las características principales son alteraciones de la personalidad, con alucinaciones y una clara pérdida del contacto con la realidad.

Basada en Ensembl Human GRCh38.p7 gen *MTHFR* - fenotipos

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Phenotype?db=core;g=ENSG00000177000;r=1:11785723-11806920

Anexo 3. Datos relevantes en la historia del VIH.

Año	Descripción del hecho relevante en historia del VIH
1959	Primeros casos de infección por el virus en población Africana
1969	Primeros casos de infección por el virus en población norteamericana
1980/81	Epidemia mortal que crecía rápidamente, se creía que había sido un virus creado por la KGB o la CIA que causaba inmunodeficiencia mortal por coinfección por patógenos oportunistas
1981	-Neumonía por <i>Pneumocystis carinii</i> en homosexuales, casos que crecen rápidamente y se asocian a Sarcomas de Kaposi → “señal de una nueva enfermedad” -Único marcador de la enfermedad : Linfocitos T CD4 que ante la infección muestran un descenso importante que se empezaron a identificar gracias a <i>Milstein</i> y <i>Kholer</i> quienes descubren anticuerpos monoclonales que permiten detectar LT CD4
1982	27 de julio en Washington se da el nombre de “ Síndrome de Inmunodeficiencia Humana” a la nueva enfermedad que venía cobrando cada vez más vidas
1983	Instituto Pasteur aísla un nuevo retrovirus que puede ser el causal del SIDA
1984	Estados Unidos nombra al virus causal como Virus linfotrópico de células-T humano (HTLV) de tipo III.
1985	Uganda informa 63 casos de enfermedad causada por este virus en homosexuales promiscuos y por producir una grave pérdida de peso la llaman “ enfermedad de la delgadez”
1986	Comité de taxonomía define el nuevo nombre del virus como Virus de la Inmunodeficiencia humana – VIH, investigador francés Daniel Zagury realiza el primer ensayo no oficial de una vacuna preventiva contra el sida, una versión genéticamente modificada de una proteína del VIH y la inyecta a 9 niños en Zaire y a él mismo, ensayo que se realizó sin aprobación de comités de ética y sin pruebas preclínicas adecuadas
1987	Primer ensayo de vacuna contra el sida, participan 81 voluntarios homosexuales sin VIH, vacuna experimental fracasa y no logra proteger a los chimpancés frente al virus.

1988	El Consejo de Investigación Médica del Reino Unido y el Instituto para la Investigación en Virus de Uganda (UVRI), crean la primera unidad de investigación centrada en determinantes de la infección por VIH y la progresión de la enfermedad
1992	Macacos <i>rhesus</i> vacunados con una versión viva atenuada del virus de la inmunodeficiencia simica (VIS), equivalente en monos al VIH, está protegido frente a la infección. Se considera una expectativa frente a lo que podría tratarse del desarrollo de una vacuna contra el VIH factible.
1994	-Se rechaza el ensayo de eficacia de La candidata a vacuna, AIDSVAX, contiene una versión modificada genéticamente de la proteína de la superficie del VIH. - Aíslan un anticuerpo humano a partir de médula ósea de un hombre con VIH que estuvo asintomático por 6 años, el anticuerpo es conocido como b12. - Se demuestra en laboratorios que b12 neutraliza más del 75% de las cepas del virus, considerándolo desde entonces, un anticuerpo ampliamente neutralizante (bNAbs)
1995	Introducción de terapia antiretroviral de gran actividad –TARGA-, Investigador David Ho, es el pionero en usar “ inhibidores de la proteasa” como fármacos en tratamiento de VIH
1996	-Se forma una entidad sin ánimo de lucro que trabaja por generar una vacuna preventiva segura y eficaz frente al VIH, participantes públicos y privados se asocian y se le da el nombre de “Iniciativa Internacional por una Vacuna contra el sida” -La vacuna basada en el virus de inmunodeficiencia de simios provocó la enfermedad en algunos macacos lo que redujo la esperanza de ser segura y poder probarse en el humano
1997	18 de Mayo se proclama el día mundial de la vacuna contra el sida, ya que el presidente de ese entonces de Estados Unidos, Bill Clinton anuncia el objetivo de crear la vacuna antes de una década
1998	VaxGen, filial de Genentech, inicia ensayo de fase III de AIDSVAX, primer ensayo de eficacia de una candidata a vacuna contra el sida. Participan 5.400 voluntarios
1999	Empresas farmacéuticas con ayuda de universidades de renombre a nivel mundial toman iniciativa para desarrollar vacunas seguras y eficaces contra el sida, dentro de las más nombradas para este año se encuentran ALVAC vCP205 de Pasteur Mérieux Connaught,

	(actual Sanofi Pasteur), KAVI, vacuna Keniana con ayuda de la universidad de Oxford
2003	Datos preliminares del ensayo de fase III para AIDSVAX no es eficaz. Científicos de todo el mundo se reúnen y refieren que la investigación sobre el sida es insuficiente para resolver los retos científicos y que esto impide el desarrollo de una vacuna adecuada
2004	Se desarrolla un estudio de fase IIb para probar la eficacia de la candidata a vacuna de Merck (MRKAd5), esta con el fin de prevenir la infección por VIH o disminuir la carga viral en voluntarios infectados
2007	MRKAd5 se suspende en su ensayo IIb al no funcionar y no ser segura se hace una publicación en donde quizá pudo haber aumentado el riesgo de adquirir VIH
2008	Estructura del virus del VIH totalmente dilucidada con las proteínas que lo componen
2009	*Vacuna RV144 que inició sus estudios al mismo tiempo que la MRKAd5, muestra un avance reduciendo el riesgo de infección en un 31% de los voluntarios lo que sugiere que si es posible generar una vacuna e impulsa a la comunidad científica a seguir investigando. *Se aíslan por primera vez anticuerpos neutralizantes en personas infectadas con el VIH
2011	*Nuevas pruebas de la vacuna RV144, se concentran datos y desde entonces se espera el análisis de los datos encontrados.

Basada en http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802003000200016

Anexo 4. Categorías clínicas de la infección por VIH.

Categoría clínica	Descripción
A	Asintomáticos con/sin linfadenopatía generalizada persistente
B	Pueden presentar: angiomatosis bacilar, candidiasis oral recidivante, candidiasis vulvovaginal persistente con pobre respuesta a tratamientos, displasia cervical leve-moderada o carcinoma "in situ", fiebre o diarrea inexplicada por más de 1 mes, leucoplasia vellosa oral, herpes, púrpura trombocitopénica idiopática, listeriosis, enfermedad pélvica inflamatoria, neuropatía periférica. “ Síntomas no incluidos en la categoría C”
C	Presentan complicaciones que permiten definir la presencia de la enfermedad SIDA. Dentro de estas se encuentran: candidiasis traqueal, bronquial, pulmonar o esofágica, carcinoma de cérvix invasivo, coccidiomicosis diseminada, histoplasmosis diseminada, criptococosis diseminada y meníngea, neumonía por <i>Pneumocystis carinii</i> , criptosporidiasis, toxoplasmosis cerebral/pulmonar, isosporidiasis crónica, neumonía bacteriana recurrente, sepsis recurrente por <i>Salmonella entérica</i> no typhi, tuberculosis pulmonar, extrapulmonar y diseminada, infección diseminada o extrapulmonar por <i>Mycobacterium avium</i> o <i>M. kansasii</i> , infección diseminada o extrapulmonar por otras micobacterias, encefalopatía por VIH, retinitis-encefalitis o infección diseminada por citomegalovirus, leucoencefalopatía multifocal progresiva, síndrome caquectizante, Sarcoma de Kaposi, linfoma de Burkitt o equivalente, linfoma inmunoblástico, linfoma cerebral primario

Basada en <http://www.todosida.org/etapas-infeccion-vih>

11 Glosario

- ✓ **ADNc:** ADN complementario que no posee intrones, obtenido *in vitro* mediante la enzima transcriptasa inversa que utiliza como templado el ARNm maduro.
- ✓ **Adsorción:** primer paso. etapa que utiliza el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) para lograr infectar, en esta etapa el virus se adhiere a células que tengan en su superficie la proteína CD4 (Linfocitos T colaboradores y macrófagos principalmente).
- ✓ **AINEs:** Siglas para definir un grupo de medicamentos cuya función principal es antiinflamatoria. Antiinflamatorios No Esteroideos.
- ✓ **Alelo:** Forma alternativa de un gen dentro de un mismo locus.
- ✓ **Aneuploidias:** cambio en el número de cromosomas que llevan a enfermedades genéticas; una persona aneuploide difiere de una persona euploide (normal número de cromosomas) en que posee un número extra o faltante de cromosomas; en el humano algunas monosomías y trisomías son viables.
- ✓ **ARNm:** Siglas para describir Ácido Ribonucleico mensajero, es el encargado de transportar la información genética presente en los genes hasta los ribosomas, en el citoplasma, donde se realiza la traducción de la información para su conversión en proteína.
- ✓ **CDC:** Siglas que provienen del inglés *Communicable Disease Center*, hace referencia al Centro de control de enfermedades contagiosas, esta entidad funciona desde 1946 e inicia sus actividades con el fin de prevenir la propagación de malaria, que producía una enfermedad debilitante conocida como paludismo, y que para esta época, afectaba gran parte de la población mundial con un alto impacto en la salud pública.
- ✓ **Codón:** Se refiere a un triplete, es decir a una secuencia de 3 nucleótidos, bien sea en la hebra codificante del ADN, o en el ARNm, y que representan a un aminoácido específico en el código genético cuando pasa por el proceso de traducción, aunque

algunos codones no se traducen a aminoácidos específicos sino a secuencias de terminación de señal y funcionan anunciando el final de este proceso de traducción.

- ✓ **Deriva genética:** hace referencia a un mecanismo evolutivo en donde se producen fluctuaciones al azar en las frecuencias alélicas de una a otra generación.
- ✓ **DHFR:** Dihidrofolato reductasa; enzima que reduce el ácido dihidrofólico a ácido tetrahidrofólico, utilizando NADPH como donador de electrones.
- ✓ **Ensembl:** Se trata de un sistema de software que produce y mantiene anotaciones automáticas en los genomas eucariotas seleccionados; es una base de datos bioinformática en donde se encuentran condensadas las investigaciones acerca de los diferentes genes y se actualiza cada cierto tiempo, se considera la base más completa de datos genómicos.
- ✓ **Ensamblaje viral:** secta etapa -paso- del ciclo de infección del virus de la inmunodeficiencia humana, en ella se forman las nucleocápsides inmaduras en el citoplasma. Comienza a actuar la proteasa permitiendo la maduración del virión.
- ✓ **Euploide:** Se le llama euploide a una persona con el número normal de pares de cromosomas, 23 pares de cromosomas, sin ningún cromosoma extra ni faltante.
- ✓ **FAD:** flavin adenin dinucleótido; es una molécula compuesta por una unidad de riboflavina, unida a pirofosfato que se encuentra unido a ribosa que está unida a una adenina. De manera más sencilla podemos definirla como la forma oxidada de una coenzima que interviene en reacciones de óxido -reducción en vías metabólicas, esta misma coenzima en su forma reducida llevara la abreviatura de FADH2
- ✓ **FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
- ✓ **FBPs:** proteínas de unión al folato, proteínas que hacen parte del ciclo del folato ayudando en el transporte del mismo.

- ✓ **Flavoproteína:** Proteína que contienen un nucleótido derivado de la vitamina B2 conocido como la flavín adenín dinucleótido (FAD) o flavín mononucleótido (FMN).
- ✓ **Frecuencia alélica:** término usado para cuantificar la variación genética, medida de la presencia de un alelo determinado en una población, en otras palabras se refiere a la proporción de todos los alelos de un gen en una población que corresponden a ese mismo tipo.
- ✓ **Frecuencia genotípica:** frecuencia de un genotipo dado dentro de una población.
- ✓ **FRs:** receptores de folato primordiales en el metabolismo del folato
- ✓ **Gemación (en relación con VIH):** séptima y última etapa-paso- del ciclo de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, El segmento proteico p17 permanece unido a la membrana celular del huésped y a la cápside del nuevo virión, cuando el virión se separa del huésped, el p17 "rasga" parte de la membrana celular y el virión sale de la célula.
- ✓ **Gen supresor de tumor:** Gen capaz de fabricar una proteína conocida como proteína supresora de tumores, que permite controlar el crecimiento celular, evitando crecimientos anormales; Sin embargo, cualquier alteración/mutación en este tipo de genes conduce sin duda alguna a la propagación tumoral (cáncer).
- ✓ **Genotipo:** se refiere al conjunto de genes que permanece invariable durante toda la vida independiente del entorno y es heredado de los progenitores.
- ✓ **HapMap:** abreviatura que hace referencia al proyecto internacional HapMap que relacionar las variaciones en secuencias del ADN humano con los genes que se asocian a patologías.
- ✓ **Hardy- Weinberg (principio):** Una población cuyo apareamiento se realice al azar da lugar a una distribución en equilibrio de genotipos después de tan solo una generación, de manera que se conserva la variación genética. Cuando se cumplen las suposiciones, la frecuencia de un genotipo es igual al producto de las frecuencias alélicas.

- ✓ **Heterocigoto:** Significa que la herencia de un gen se realiza con dos alelos diferentes uno proveniente del padre y otro de la madre no idénticos.
- ✓ **Hipótesis alternativa:** En genética de poblaciones es aquella que afirma que las frecuencias alélicas para un carácter no están en equilibrio
- ✓ **Hipótesis nula:** En genética de poblaciones es aquella que afirma que las frecuencias alélicas para un carácter en una población dada se encuentran en equilibrio de Hardy Weinberg.
- ✓ **Homocigoto:** Significa que la herencia de un gen se realiza con dos alelos idénticos, o los dos del padre o los dos de la madre
- ✓ **Homocisteína:** (Hcy) Aminoácido azufrado indispensable en el metabolismo celular para la transferencia de grupos metilo.
- ✓ **Integración (respecto al VIH):** se trata de la cuarta etapa –paso- del ciclo de vida del virus de la inmunodeficiencia humana, en ella, el ADN recién formado se incorpora al genoma del huésped mediante la acción de la enzima integrasa
- ✓ **Islas CpG:** Regiones de ADN en donde se encuentra una gran concentración de Citosina (C) y Guanina (G) enlazados por medio de fosfato (p); conforman el 40% de los genes de los mamíferos. El tamaño de estas regiones debe ser igual o mayor a 500pb, con porcentaje de GC mayor a 50 y promedio de CpG entre observado y esperado mayor de 0,6. En realidad, estas regiones permiten diferenciar a los genes constitutivos también llamados "*housekeeping*" que hacen parte del 70% de los genes del genoma y su promotor tiene un 0,61 de CpG, de los genes de tejidos específicos que representan el 30% de los genes faltante y tienen un valor de CpG menor promediado en 0,23.
- ✓ **kb:** kilo-bases
- ✓ **KIR:** Receptores de células Natural Killer que poseen alelos que actúan como factores protectores del huésped ante infección por los virus, incluido el VIH, asociándose con el progreso o no de la viremia.

- ✓ **Missense:** proveniente del inglés Missense, se refiere a un tipo de mutación con cambio de sentido, también conocida como mutación contrasentido o de tipo erróneo, en realidad se trata de una mutación puntual no sinónima en donde se presenta un cambio en un único nucleótido que genera un codón que codifica para otro aminoácido diferente.
- ✓ **MTHFR:** Metilentetrahidrofolato reductasa enzima.
- ✓ **MTHFR:** Gen que codifica para la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa, den de Metilentetrahidrofolato reductasa.
- ✓ **OAT:** Transportador de Aniones Orgánicos, principalmente multiespecíficos.
- ✓ **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- ✓ **Oncogén:** Gen con alta capacidad mutacional que induce la transformación de una célula normal en una célula tumoral.
- ✓ **Ortólogo:** Secuencia homóloga a otra que se han separado la una de la otra por eventos de especiación.
- ✓ **pb:** pares de bases
- ✓ **PCFT:** Transportador de folato acoplado a protones, proteínas especializadas para transportar folato.
- ✓ **Penetración:** se trata de la segunda etapa – paso del VIH en su ciclo de vida, hace parte de la historia natural de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, en donde este penetra en la célula mediante fusión de su envoltura con la membrana celular.
- ✓ ***Pneumocystis carinii*:** Microorganismo de tipo oportunista, clasificado como hongo unicelular atípico que produce infecciones altamente mortales, generalmente neumonías afectando principalmente a personas con algún estado de inmunosupresión.

- ✓ **Población:** Individuos de una misma especie que habitan dentro de una zona geográfica específica; genéticamente hace referencia a un grupo de individuos que tienen un acervo genético común con la posibilidad de aparearse.
- ✓ **Polimorfismo:** Variación en la secuencia, en un sitio específico del ADN entre los sujetos de una población; otra manera de definir un polimorfismo es decir que se trata de múltiples alelos de un mismo gen dentro de una población capaces de producir cambios que se traducen en diferentes fenotipos.
- ✓ **Protooncogen:** son genes que promueven el crecimiento y la división celular. Se trata de un gen que participa en el crecimiento normal de las células, pero que ante mutaciones o variaciones en él puede convertirse en un oncogén formador de células cancerosas.
- ✓ **Prueba del Chi – cuadrado:** Prueba hipotética útil para determinar si las frecuencias alélicas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg
- ✓ **RFC:** proteína portadora de folato reducido
- ✓ **SAM:** S- adenosilmetionina; co-sustrato común que interviene en la transferencia de grupos metilo. Se encuentra compuesta de adenosina trifosfato (ATP) y metionina, mediante la enzima metionina adenosiltransferasa.
- ✓ **Sarcoma de Kaposi:** Se trata de una enfermedad en la que se desarrollan tumores de comportamiento maligno en piel, mucosas, ganglios linfáticos y órganos del tubo digestivo, es detectada por pruebas diagnósticas que determinen la presencia de tumores en piel, pulmones y tejidos gastrointestinales.
- ✓ **SIDA:** Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, enfermedad de alto impacto en salud pública a nivel mundial, que en su gran mayoría se transmite por contacto directo con fluidos y secreciones corporales, producida por el retrovirus VIH que generan una pérdida gradual de linfocitos T hasta debilitar el sistema inmune, sistema de defensa del ser humano.

- ✓ **SNP:** del inglés Single Nucleotide Polimorfism, polimorfismo de un solo nucleótido, variación de un solo nucleótido.
- ✓ **Transcripción (en relación con VIH):** quinta etapa –paso- del ciclo de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, en este paso que sucede en el núcleo, la información contenida en el ADN viral se transcribe a ARNm, para la construcción de nuevos virus.
- ✓ **Transcripción inversa (en relación con VIH):** tercera etapa –paso – de la historia natural de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana; en esta etapa, posterior a la liberación del material genético y de las enzimas, la transcriptasa inversa usando como molde el ARN del virus, sintetiza una hebra de ADN (*transcripción inversa*) que posteriormente se convierte en un ADN lineal bicatenario. Este proceso es muy importante para que el genoma del virus pueda ser integrado al núcleo celular. Luego la ribonucleasa (de la transcriptasa inversa) destruye el ARN original.
- ✓ **VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana, retrovirus.