



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“POLIMORFISMOS C677T Y A1298C DE LA
METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA
(MTHFR) EN PACIENTES CON LEUCEMIA”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

KAREN IVETTE MARTÍNEZ CARRILLO

DIRECTOR DE TESIS: Dr. MARCO ANTONIO LEYVA VÁZQUEZ

CHILPANCINGO, GRO., ENERO DE 2008.

ACTA DE APROBACION DE TESIS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en la Ciudad de Chilpancingo Gro.

Bajo la dirección de

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Con la asesoría de

Dr. Guillermo Ruíz Argüelles

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dr. Alfonso Bernabé Carreño

M en C. Ma. Elena Moreno Godínez

Con la colaboración de

Dr. Marco Antonio Terán Porcayo

y

Dra. Ana Bertha Rivera Ramírez

Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega”

Durante el periodo en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Karen Ivette Martínez Carrillo recibió beca del CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Por permitirme vivir este día y estar con mis seres amados. También por la fuerza que me has dado.

A MIS PAPAS:

Gracias por el apoyo que me brindaron siempre y estar ahí cuando lo necesitaba, este no solo es un logro mío, también es de ustedes. Los amo.

A TI MI AMOR:

Francisco, por todo el apoyo y el amor que me has dado, por darme valor para enfrentar los obstáculos que se me presentaron y por apoyarme en todas las decisiones que tome.

A MI FAMILIA:

Dino y Lore antes que nada por ser mis amigas y saber que cuento con ustedes. Dino, gracias por el apoyo que me diste y darme ánimos para terminar mi trabajo y ayudarme en todas las dudas que se me presentaron. Lore por existir y saber que siempre vas a estar ahí.

A mis suegros Francisco, Mary; a mis cuñados y concuños Diana, Raúl, Hans, Liz; a Esther y René por apoyarme en mis deseos y sueños, por estar al pendiente de mis triunfos y fracasos, por su preocupación, pero sobre todo por permitirme ser parte de esta familia.

A MIS AMIGOS:

A Naty, Vero, Norma, Mónica, Temo, por su gran apoyo para realizar este trabajo, sin ustedes no se que hubiera hecho. A Pako, Dane, Ceci, Rox, Luis, Saul y Salvador, por permitirme conocerlos y compartir 2 años con ustedes y ver que todos estamos logrando nuestra meta, son los mejores.

A MIS MAESTROS:

Por todas sus aportaciones, observaciones y por el tiempo dedicado a este trabajo y sobre todo por ayudarme a salir adelante con este proyecto.

También agradezco a todos aquellos que no creyeron que llegaría este día tan pronto, porque ellos me dieron fuerza y coraje para demostrar que estaban equivocados y aquí está la prueba.

Karen Ivette Martínez Carrillo.

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	1
MATERIAL Y MÉTODOS	6
RESULTADOS	9
DISCUSIÓN	16
CONCLUSIONES	21
REFERENCIAS	22

ABREVIATURAS

LMA	Leucemia mieloblástica aguda
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLC	Leucemia linfocítica crónica
LMC	Leucemia mieloblástica crónica
dUMP	Desoxiuridín monofosfato
dTMP	Desoxitimidín monofosfato
5,10-MTHFR	5,10-Metilenotetrahidrofolato reductasa
5-MTHFR	5- Metilenotetrahidrofolato reductasa
SAM	S-adenosinmetionina
FAD	Flavín adenín dinucleótido
RFLP	Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Producto de PCR del polimorfismo C677T en gel de agarosa al 3%.	10
Figura 2. RFLP's del polimorfismo C677T en gel de poliacrilamida al 10% después de la digestión con <i>Hinfl</i> .	10
Figura 3. Producto de PCR del polimorfismo A1298C en gel de agarosa al 2%.	11
Figura 4. RFLP del polimorfismo A1298C en gel de poliacrilamida 10% después de la digestión con <i>MbolI</i> .	11

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Características generales de los casos de leucemias linfoblásticas agudas y controles.	9
Cuadro 2. Frecuencia de los polimorfismos C677T y A1298C de la MTHFR en casos de leucemias linfoblásticas agudas y controles.	12
Cuadro 3. Distribución de los genotipos A1298C y C677T de MTHFR en casos de leucemias linfoblásticas agudas y controles.	13
Cuadro 4. Asociación de los genotipos C677T y A1298C de MTHFR con leucemia linfoblástica aguda.	14
Cuadro 5. Combinación de los genotipos C677T y A1298c de la MTHFR y su asociación con leucemia linfoblástica aguda.	15

RESUMEN

ANTECEDENTES. La leucemia es una enfermedad que consiste en la proliferación incontrolada de leucocitos en sangre y médula ósea. Si bien el cáncer resulta de un proceso multifactorial, también existe evidencia que sugiere que el folato juega un papel importante para determinar el riesgo de desarrollar diversas malignidades. Siendo el folato un factor importante para diversas vías metabólicas, la enzima metileno tetrahidrofolato reductasa es importante en su metabolismo; cambios en su actividad podrían ser producto de los polimorfismos C677T y A1298C en el gen. Estos cambios podrían modificar la susceptibilidad al cáncer. **OBJETIVO.** Observar la asociación de los polimorfismos C677T y A1298C de la metileno tetrahidrofolato reductasa en pacientes con leucemia linfoblástica aguda. **MATERIAL Y MÉTODOS.** Se realizó un estudio de casos y controles durante agosto de 2006 a mayo de 2007. Se determinaron los polimorfismos C677T y A1298C de la MTHFR mediante los métodos de PCR-RFLP. **RESULTADOS.** Se estudiaron un total de 50 casos de leucemia linfoblástica aguda y 114 controles. El genotipo más frecuente del polimorfismo C677T fue el heterocigoto (677CT) en ambos grupos de estudio (42.1% y 42%); mientras que para el polimorfismo A1298C el genotipo homocigoto (1298AA) fue el más frecuente para ambos grupos (85.1% y 90%). Se encontró una asociación del genotipo 677TT con un OR de 1.4 (IC_{95%} 0.5-3.4) en los pacientes con leucemia linfoblástica aguda, mientras que para el polimorfismo A1298C no hubo asociación con ningún genotipo. Los haplotipos asociados con el riesgo de padecer LLA fueron el 677CT/1298AA (OR 1.3 IC_{95%} 0.46-3.88) y el 677TT/1298AA (OR 1.33 IC_{95%} 0.47-3.95). **CONCLUSIONES.** Se demostró que el polimorfismo C677T, se asocia al desarrollo de leucemia linfoblástica aguda en los pacientes con el genotipo 677TT o 677CT. El genotipo 1298CC o 1298AC no se encontró asociado con el desarrollo de leucemia linfoblástica aguda.

Palabras claves: Leucemias Linfoblásticas Agudas, Polimorfismo C677T, Polimorfismo A1298C, MTHFR.

ABSTRACT

BACKGROUND. Leukemia is a disease in which there is uncontrolled proliferation of leukocytes in the blood and bone marrow. Cancer is the result of a plethora of factors; however there is evidence that suggests that folate plays an important role in determining the risk of developing malignancies. Folate is an important factor for various metabolic routes, the methylenetetrahydrofolate reductase is important for its metabolism; changes in its activity could be due to polymorphisms C677T and A1298C of the MTHFR gene. These changes could modify the susceptibility to cancer. **OBJECTIVE.** Observe the association of polymorphisms C677T and A1298C of methylenetetrahydrofolate reductase in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). **MATERIALS AND METHODS.** A cases and controls study was carried out during August 2006 to May 2007. The MTHFR polymorphisms C677T and A1298C were determined by PCR-RFLP's. **RESULTS.** A total of 50 cases of acute lymphoblastic leukemia and 114 controls were studied. The most frequent genotype of the MTHFR C677T polymorphism was the heterozygous (677CT) in both groups (42.1% and 42%); meanwhile for the A1298C polymorphism the homozygous genotype (1298AA) was the most frequent for both groups (85.1% and 90%). An association was found between genotype 677TT and patients with acute lymphoblastic leukemia with an OR of 1.4 (CI_{95%}0.5-3.4), there was no association of polymorphism A1298C with any genotype. The haplotypes associated with the risk of ALL were 677CT/1298AA (OR 1.3 IC_{95%} 0.46-3.88) and 677TT/1298AA (OR 1.33 IC_{95%} 0.47-3.95). **CONCLUSIONS.** We demonstrated that the C677T polymorphism is associated with the development of acute lymphoblastic leukemia in patients with genotypes 677TT or 677CT. The 1298CC or 1298AC genotypes were not found to be associated with the development of ALL.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia, Polymorphism C677T, Polymorphism A1298C, MTHFR.

INTRODUCCIÓN

La leucemia es una enfermedad que consiste en la proliferación incontrolada de leucocitos en la sangre y en la médula ósea. Dependiendo de la estirpe celular afectada, se puede hacer la distinción de leucemias mieloblásticas agudas (LMA), leucemias linfoblásticas agudas (LLA) y de estirpe indiferenciada (linaje mezclado). Las LLA se originan en la médula ósea y se caracterizan por la proliferación incontrolada de formas celulares inmaduras de los componentes sanguíneos llamados blastos^{1,2}.

Los factores de riesgo establecidos para el desarrollo de leucemias como son entre otros, la exposición a radiación ionizante y al benceno; quimioterapia del cáncer, así como defectos genéticos tales como: translocaciones cromosomales, inversiones, eliminaciones o mutaciones puntuales, debido a interacciones ambientales o a susceptibilidad relacionada a polimorfismos en múltiples genes, ocasionan una alteración en el desarrollo normal de las células sanguíneas y originan una acumulación de las células leucémicas disfuncionales o no diferenciadas en el espacio de la médula ósea, reemplazando progresivamente a las células hematopoyéticas normales^{1,2}. La LLA en México es la leucemia aguda más común en niños entre 2-15 años; representa cerca del 85 % de los casos, mientras que la LMA constituye poco más del 14 % y la leucemia no diferenciada ocupa apenas un 0.8 %².

Las leucemias son los cánceres más frecuentes en menores de 15 años². En Estados Unidos, aproximadamente 9,000 individuos son diagnosticados anualmente con LMA y 4,000 con LLA³. Las LLA ocurren comúnmente en niños y en adultos jóvenes, con una edad media de diagnóstico de 10 años⁴. En la ciudad de México representan alrededor de 40 % de todas las neoplasias, mientras que en otros países constituyen entre 30 y 34 %². Actualmente se reconoce que en diferentes partes del mundo la frecuencia de las leucemias agudas se ha incrementado^{2,3}.

De 1982 a 1991, en la ciudad de México se observó un aumento importante en la incidencia de las LLA^{1,2}. En 1982 se reportó una tasa de incidencia de 7.75 por un millón de niños menores de 15 años y para 1991 se alcanzó un 22.19 por un millón de niños. Entre 1993 y 1994, en el Instituto Mexicano del Seguro Social, se encontró una frecuencia de 34 por un millón⁴; entre 1996 y 1998, de 60.3^{1,2} por un millón de niños, mientras que durante el periodo de 1996 a 2000 los datos muestran una tasa de 63.7 por un millón de niños, una de las más altas reportadas en el mundo².

De acuerdo con la base de datos de defunciones del INEGI y la Secretaría de Salud en México en el año 2005, a nivel nacional las leucemias ocuparon el séptimo lugar en niños en edad preescolar (de 1 a 4 años), ocurriendo 255 muertes por este padecimiento, de un total de 6,470; mientras que en los niños de 5 a 14 años, las leucemias ocuparon el segundo lugar de mortalidad, ocurriendo 602 muertes de un total de 6,773. Sin embargo, en la población en edad productiva entre los 15 a 64 años, las leucemias ocuparon el decimoctavo lugar con 1,993 muertes de un total de 181,719⁵.

Si bien hay suficiente evidencia de que el cáncer resulta de un proceso multifactorial, también existe evidencia que sugiere que el folato juega un papel muy importante para determinar el riesgo de desarrollar diversas malignidades incluyendo los cánceres colorectal, de pulmón, páncreas, esófago, cérvix, mama y leucemias; el folato es un factor importante para diversas vías metabólicas en la célula que involucran la transferencia de grupos de un carbono, entre las cuales se encuentran la síntesis de nucleótidos y las reacciones biológicas de metilación⁶. Por lo anterior se han realizado diversas investigaciones para evaluar variaciones genéticas en las enzimas claves del folato que pudieran afectar su papel biológico y su intervención en el proceso de enfermedad⁷.

La deficiencia del folato induce la disminución de la metilación del DNA, la cual es una característica universal de tumorigénesis temprana, puede promover la carcinogénesis por la represión de proto-oncogenes o por inducción de inestabilidad genómica, induciendo daño cromosomal, formación de sitios frágiles y micronúcleos^{8,9}.

La enzima 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa (5,10-MTHFR) es clave en el metabolismo del folato debido a que cataliza la conversión (reducción) irreversible de 5,10-MTHFR a 5-MTHFR y dirige el flujo del folato intracelular^{9,10,11,12}, el cual es su principal forma circulante. Esta reducción es crucial, debido a que sirve a muchas reacciones biológicas, como proveer el grupo metilo para la remetilación de homocisteína a metionina, la cual es un precursor del S-adenosilmetionina (SAM), donador universal de grupos metilo para muchas reacciones de metilación, incluyendo al DNA, proteínas, lípidos, hormonas, entre otros, mientras que la 5,10-MTHFR y sus derivados son cofactores esenciales para la síntesis tanto de timidilato como la de purinas *de novo*^{13,14}. Debido al papel clave en el metabolismo del folato que tiene la enzima, cualquier cambio en su actividad puede ser resultado de polimorfismos en el gen de la *mthfr*, los cuales modifican la susceptibilidad al cáncer¹³.

El gen *mthfr* es altamente polimórfico en la población en general; se han descrito catorce mutaciones, las cuales están asociadas con la deficiencia enzimática severa y homocisteinuria. Sin embargo, los polimorfismos más comunes son el C677T y A1298C y se encuentran asociados con el incremento de la termolabilidad y con la disminución significativa de un 50 al 60% de la actividad de la enzima^{17,18}.

El polimorfismo C677T en el gen de la *mthfr*, ocurre debido a una transición en el nucleótido 677 de C por T (C677T), resultando en la sustitución del aminoácido alanina por valina en el dominio catalítico N-terminal^{14,19}, codificando así para una enzima termolábil con actividad reducida, puesto que modifica el sitio de unión para el flavin adenin dinucleótido (FAD), que es un importante cofactor para la

MTHFR^{10,20}. El resultado son niveles elevados de homocisteína en plasma (hiperhomocisteinemia), especialmente durante la insuficiencia de folato. Se ha reportado que individuos que son homocigotos para la variante de riesgo (TT) tienen el 30% de actividad enzimática normal, mientras que los heterocigotos (CT) tienen el 65% de actividad enzimática normal de la enzima^{4,18,19}.

Se ha descubierto un segundo polimorfismo en el gen de la *mthfr*, la variación A1298C que ocurre por una transversión de una A por una C en la posición 1298, causando el reemplazo de un glutamato por una alanina en el codón 429 de la enzima; la sustitución de este aminoácido toma lugar en el dominio regulador de la MTHFR para la *s-adenosilmetionina*^{14,18,19}. Este polimorfismo ha sido asociado con una ligera reducción en la actividad de la MTHFR *in vivo* e *in vitro*, pero no con la termolabilidad; se ha sugerido que se encuentra asociado con el incremento del riesgo para los defectos del tubo neural¹⁴.

Mientras diversos estudios han investigado la asociación entre los polimorfismos relacionados al folato y los defectos del tubo neural, enfermedad arterial o venosa vascular y diversas formas de tumores sólidos; sólo pocos han investigado su influencia sobre el riesgo de malignidades linfoides^{16,17,18}.

El mecanismo por el cual las variantes de la MTHFR han sido asociadas con la modulación del riesgo de LLA, se relaciona con la síntesis de DNA, debido a que el folato se encuentra involucrado en el crecimiento celular normal, por lo que alteraciones en los sustratos provocarían una pérdida de homeostasis a nivel de síntesis de DNA, provocando alteraciones tales como translocaciones, inversiones o eliminaciones en genes reguladores involucrados en el desarrollo celular sanguíneo²⁰.

Aunque se han realizado pocos estudios en diversos países en los que se han buscado si las variantes del gen de la *mthfr* alteran el riesgo de padecer leucemia, se sugiere que la alteración del metabolismo del folato intracelular ocasionado por las variantes de la MTHFR pueden jugar un papel importante en el desarrollo de LLA, pues se ha sugerido que las células linfoides tienen un mayor requerimiento de folato, por lo que pueden ser susceptibles a daños al DNA como resultado de la deficiencia de folato^{4,20}.

Con base en lo anterior y debido a los resultados controversiales que se han obtenido en diversos estudios realizados en el mundo, y teniendo en cuenta que México presenta una de las frecuencias más altas de estos polimorfismos, principalmente del 677² y que los casos de LLA han aumentado cada año, se realizó un estudio de casos y controles en pacientes con LLA del estado de Guerrero, con el objetivo de evaluar la asociación individual o conjunta del polimorfismo C677T y A1298C de la MTHFR con la LLA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de casos y controles durante el período de agosto de 2006 a mayo de 2007 en el laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas con muestras de pacientes del Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega” de Acapulco, Gro, y del Hospital General “Dr. Raymundo Abarca Alarcón” de Chilpancingo, Gro. Se obtuvieron muestras de sangre por venipuntura, realizando la extracción de DNA mediante la técnica de Miller²¹, el cual fue almacenado a -20°C hasta su uso. Para los pacientes de los que no se obtuvo la muestra sanguínea, se realizó la toma de muestra de raspado de cachete obteniendo el DNA mediante el método estándar del fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), previa digestión de la muestra con proteinasa K²². Se determinaron los polimorfismos C677T y A1298T de la MTHFR, mediante los métodos de PCR-RFLPs adaptados de Frosst y col²³. Las regiones del genoma que contienen los dos polimorfismos se amplificaron de manera separada.

Detección del polimorfismo C677T de la MTHFR. Se realizó utilizando 1 µM del iniciador sentido 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' y 1 µM del iniciador antisentido 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3', amortiguador para PCR 1X, 2.5 mM MgCl₂, 1.25 U de Taq DNA Polimerasa recombinanteTM (Invitrogen Life Technologies, Carlsband, CA), 200 µM de cada dNTP (Invitrogen Life Technologies, Carlsband, CA) y 1.0 µg de DNA. Las condiciones de amplificación fueron: un período de desnaturalización inicial a 94°C por 10 min y 40 ciclos de: 94°C por 30s, 60°C por 30s y 72°C por 30s, seguidos de una extensión final de 7 min a 72°C. El producto de amplificación de este gen fue de 198 pb, el cual se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/µl) y visualizado bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador de geles. En la mezcla de reacción se sustituyó el DNA blanco por agua como control negativo.

La sustitución de C por T en el polimorfismo C677T, crea un sitio de restricción para *Hinfl*. La digestión del DNA se realizó mediante una mezcla con amortiguador 1X, 3 µg de RNasa, 3 U de *Hinfl* (Invitrogen Life Technologies, Carlsband, CA) y 8 µl del producto de PCR. El producto de la digestión fue observado por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% teñido con bromuro de etidio, en el cual se observó: para el homocigoto C (677CC) un fragmento de 198 pb, para el heterocigoto (677CT) tres fragmentos de 198, 175 y 23 pb, en cuanto al homocigoto T (677TT) origina dos fragmentos de 175 y 23 pb². Se utilizó como control positivo una muestra del genotipo 677CT caracterizada anteriormente en un estudio previo.

Detección del polimorfismo A1298C de la MTHFR. Se utilizó 1 µM del iniciador sentido 5'-CCTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC-3' y 1 µM del iniciador antisentido 5'-CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG-3' amortiguador para PCR 1X, 2.5 mM MgCl₂, 1.25 U de Taq DNA Polimerasa recombinanteTM (Invitrogen Life Technologies, Carlsband, CA), 200 µM de cada dNTP (Invitrogen Life Technologies, Carlsband, CA) y 1.0 µg de DNA. Las condiciones de amplificación fueron: un período de desnaturalización inicial a 94°C por 10 min y 35 ciclos de 92°C por 1 min, 60°C por 1 min, y 72°C por 30s, seguidos de una extensión final de 7 min a 72°C. El producto de amplificación de este gen fue de 163 pb, el cual se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/µl) y visualizado bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador de geles. En la mezcla de reacción se sustituyó el DNA blanco por agua como control negativo.

La sustitución de A por C en el polimorfismo A1298C, elimina el sitio de restricción para *MbolI*. La restricción se realizó con una mezcla con 3 U de la enzima de restricción *MbolI* (Amersham Biosciences, Brasil), seguido de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y teñido con bromuro de etidio, en el cual se observó: para el homocigoto A (1298AA) cinco fragmentos de 56, 31, 30, 28, y 18 pb; para el heterocigoto (1298 AC) seis fragmentos de 84, 56, 31, 30, 28 y 18 pb; y para el homocigoto C (1298 CC) cuatro fragmentos de 84, 31, 30, y 18 pb.² Se utilizó como

control positivo una muestra del genotipo 1298AC caracterizada anteriormente en un estudio previo²³.

Análisis estadístico. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 12 para la captura de datos y el paquete STATA versión 8.2 para el análisis estadístico, mediante el cual se calcularon las frecuencias de los genotipos de los polimorfismos C677T y A1298C de la MTHFR, tanto de los casos como de los controles; también se utilizaron medidas de asociación como razón de momios e intervalos de confianza al 95% (IC_{95%}) crudos y ajustados como pruebas de significancia estadística, para evaluar la asociación entre los polimorfismos C677T y A1298C de la MRHFR y la LLA.

RESULTADOS

A) Características generales de los casos de leucemia linfoblástica aguda y los controles.

Se estudiaron un total de 114 controles sanos y 50 casos de leucemia linfoblástica aguda. En el rango de 6 a 11 años se encontró la mayor frecuencia de controles con un 41.2%, mientras que en los casos de LLA el rango de edad entre los 12 a 17 años fue el más frecuente con un 40%. Se observó que la edad entre los grupos no mostró diferencia estadísticamente significativa, sin embargo en sexo si hubo diferencia estadísticamente significativa.

Cuadro1. Características generales de los casos de leucemia linfoblástica aguda y controles.

Característica	Grupo de estudio				Valor de P ^c
	Control ^a n=114		LLA ^b n= 50		
	n	%	n	%	
Rangos de edad (años)					0.270
De 1 a 5	29	25.4	16	32	
De 6 a 11	47	41.2	14	28	
De 12 a 17	38	33.3	20	40	
Sexo					< 0.001
Femenino	62	54.4	12	24	
Masculino	52	45.6	38	76	

^a Controles captados en el Hospital General "Dr. Raymundo Abarca Alarcón" de Chilpancingo, Gro.

^b Casos de leucemias linfoblásticas agudas captadas en el Instituto Estatal de Cancerología "Dr. Arturo Beltrán Ortega" en Acapulco, Gro.

^c χ^2

B) Identificación de los polimorfismos C677T y A1298C de la MTHFR en casos de LLA y en controles.

En las figuras 1 y 2 se muestra la detección y genotipificación del polimorfismo C677T de la MTHFR.

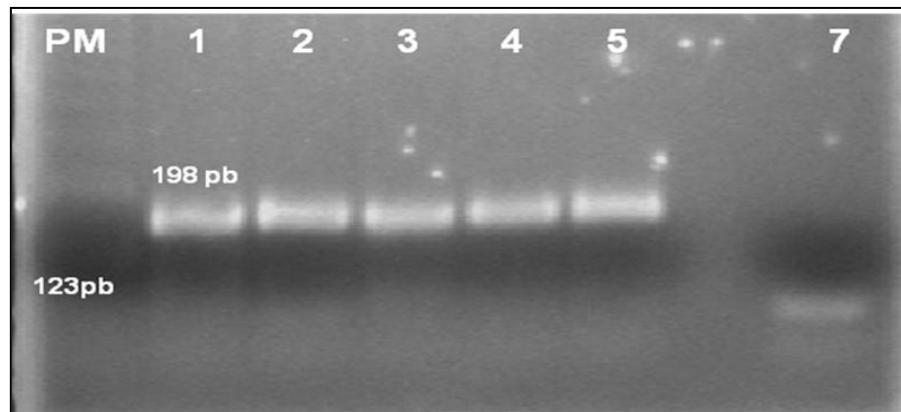


Figura 1. Producto de PCR del polimorfismo C677T en gel de agarosa al 3%. Carril PM: marcador de peso molecular de 123 pb, carril 1 al 5: producto de PCR de una región de 198 pb del exón 4 del gen MTHFR, carril 7 CN: control negativo de la PCR.

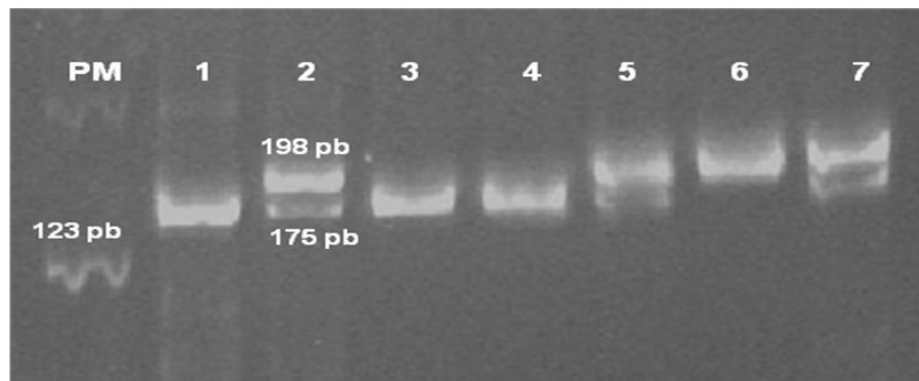


Figura 2. RFLP's del polimorfismo C677T en gel de poliacrilamida al 10% después de la digestión con *HinfI*. PM: Marcador de peso molecular de 123 pb, carril 1, 3, 4: homocigoto TT (677TT), carril 2,5,7: heterocigoto (677CT), carril 6: homocigoto CC (677CC).

En las figuras 3 y 4 se muestra la detección y genotipificación del polimorfismo A1298C de la MTHFR.

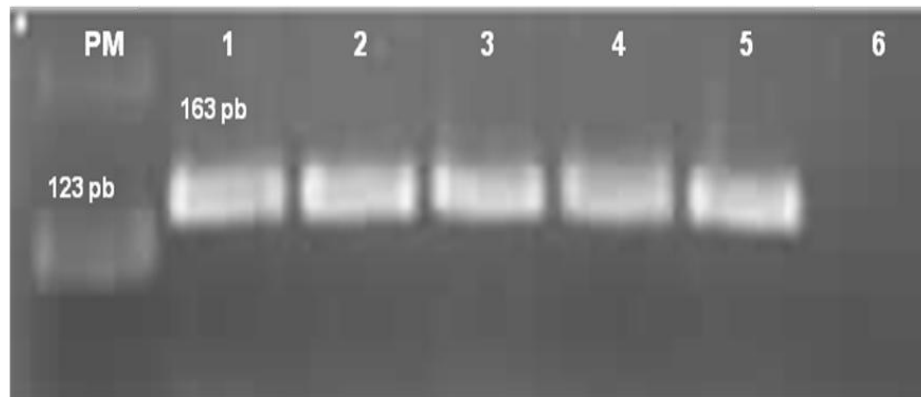


Figura 3. Producto de PCR del polimorfismo A1298C en gel de agarosa al 2%. Carril PM: marcador de peso molecular de 123 pb, carril 1-5: producto de PCR de una región de 163 pb del exón 7 del gen MTHFR. Carril 6: control negativo.

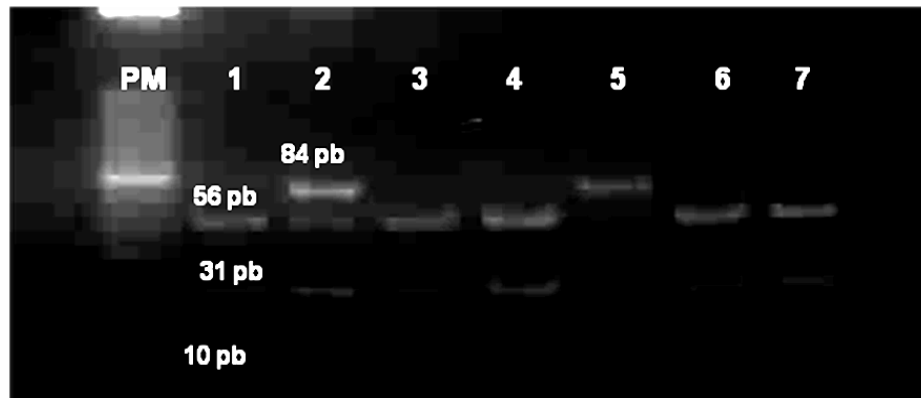


Figura 4. RFLP del polimorfismo A1298C en gel de poliácridamida al 10% después de la digestión con *MbolI*. PM: Marcador de peso molecular de 10 pb, carril 1, 3, 4, 6, 7: homocigoto AA (1298AA), carril 2: heterocigoto (1298AC), carril 5: homocigoto CC (1298CC).

C) Frecuencia de los genotipos C677T y A1298C de la MTHFR en casos de LLA y en controles.

Entre los 114 controles y los 50 casos de LLA, la frecuencia del genotipo heterocigoto (677CT) fue de 42% tanto para controles como para casos, seguidos del genotipo homocigoto T (677TT) con un 31.6% para controles y 36% para casos; la menor frecuencia se encontró para el genotipo homocigoto C (677CC) con un 26.3% para los controles y un 22% para los casos.

Con respecto a los genotipos 1298 el más frecuente para ambas poblaciones fue el homocigoto A (1298AA), con un 85.1% para los controles y un 90% para los casos. El genotipo homocigoto C (1298CC), con un 9.6% para los controles y un 8% para los casos fue el segundo más frecuente, seguido del heterocigoto (1298AC), con un 5.3% y un 2% respectivamente (cuadro 2).

Cuadro 2. Frecuencia de los polimorfismos C677T y A1298C de la MTHFR en casos de LLA y controles.

Genotipos	Grupo de estudio			
	Control ^a n=114		LLA ^b n= 50	
	n	%	n	%
C677T MTHFR^c				
CC	30	26.3	11	22
CT	48	42.1	21	42
TT	36	31.6	18	36
A1298C MTHFR^d				
AA	97	85.1	45	90
AC	6	5.3	1	2
CC	11	9.6	4	8

^a Controles captados en el Hospital General "Dr. Raymundo Abarca Alarcón" de Chilpancingo, Gro.

^b Casos de leucemias linfoblásticas agudas captadas en el Instituto Estatal de Cancerología "Dr. Arturo Beltrán Ortega" en Acapulco, Gro.

^c Genotipos C677T MTHFR: CC homocigoto, CT heterocigoto y TT homocigoto.

^d Genotipos A1298C MTHFR: AA homocigoto, AC heterocigoto y CC homocigoto.

D) Distribución de los genotipos A1298C y C677T de MTHFR en LLA y controles.

Los genotipos más frecuentes de los dos polimorfismos, en los controles fueron el 677TT/1298AA con un 31.6%; y los genotipos 677CT/1298AA con un 32.5%; mientras que en los casos los más frecuentes fueron 677TT/1298AA y el 677CT/1298AA con un 36%. No se encontró presencia de ningún paciente que contara con ambos genotipos de riesgo (677TT/1298CC), lo que nos sugeriría un efecto letal por ser portador de ambos polimorfismos.

Las frecuencias de los alelos 677C, 677T, 1298A y 1298C de la MTHFR en la población total de los casos y los controles fueron similares; sin embargo, el alelo 1298A se presentó con una menor frecuencia que el alelo 677T de la MTHFR (cuadro 3).

Cuadro 3. Distribución de los genotipos A1298C y C677T de MTHFR en LLA y controles.

	Frecuencias del genotipo A1298C						Frecuencia alélica	
	AA		AC		CC		A	C
	n	%	n	%	n	%		
Controles (n= 114) ^a							0.88	0.12
Genotipos C677T MTHFR ^c								
CC	24	21.1	3	2.6	3	2.6		
CT	37	32.5	3	2.6	8	7.0		
TT	36	31.6	0	0	0	0		
Frecuencia alélica								
C	0.47							
T	0.53							
Casos LLA (n= 50) ^b							0.91	0.09
Genotipos C677T MTHFR ^d								
CC	9	18	1	2	1	2		
CT	18	36	0	0	3	6		
TT	18	36	0	0	0	0		
Frecuencia alélica								
C	0.43							
T	0.57							

^a Controles captados en el Hospital General "Dr. Raymundo Abarca Alarcón" de Chilpancingo, Gro.

^b Casos de leucemias linfoblásticas agudas captadas en el Instituto Estatal de Cancerología "Dr. Arturo Beltrán Ortega" en Acapulco, Gro.

^c Genotipos A1298C MTHFR: AA homocigoto, AC heterocigoto, CC homocigoto Genotipos C677T MTHFR: CC homocigoto, CT heterocigoto, TT homocigoto.

E) Asociación de los genotipos C677T y A1298C de MTHFR con el riesgo de padecer LLA.

Con respecto al polimorfismo C677T, el OR ajustado mostró una asociación del genotipo 677TT (OR 1.3 IC_{95%} 0.5-3.4) con LLA; de la misma manera se observó asociación del genotipo 677CT (OR 1.1 IC_{95%} 0.4-2.6). Cuando se analizaron estos genotipos solos o combinados, se encontró esta asociación (OR 1.1 IC_{95%}0.5-3.6). Por el contrario, en el A1298C no hubo asociación de ningún genotipo con la LLA, sugiriéndonos que se comporta como un factor protector para el desarrollo de la misma; sin embargo se necesitan realizar más estudios que comprueben esto. El ajuste se realizó mediante el sexo y la edad de los pacientes; la comparación con los OR crudos no mostro diferencias significativas, indicándonos que estas variables pueden no estar participando en la asociación de los polimorfismos y el desarrollo de LLA (cuadro 4).

Cuadro 4. Asociación de los genotipos C677T y A1298C de MTHFR con leucemia linfoblástica aguda.

Genotipos	Controles (n=114)	Casos (n=50)	OR ^c (IC95%)	OR ^d (IC95%)
C677T MTHFR^a				
CC*	30	11	1.0*	1.0*
CT	48	21	1.2 (0.5- 3.2)	1.1 (0.4-2.6)
TT	36	18	1.4 (0.5-3.7)	1.3 (0.5 –3.4)
CT y TT	84	39	1.3 (0.5-3.1)	1.1 (0.5-2.6)
A1298C MTHFR^b				
AA*	97	45	1.0*	1.0*
AC	6	1	0.4 (0.01- 3.1)	0.5 (0.05-4.5)
CC	11	4	0.8 (0.2- 2.8)	0.6 (0.2-2.3)
AC y CC	17	5	0.6 (0.2- 1.9)	0.7(0.6-1.3)

*Categoría y valor de referencia.

^a Genotipos A1298C MTHFR: AA homocigoto, AC heterocigoto, CC homocigoto.

^b Genotipos C677T MTHFR: CC homocigoto, CT heterocigoto, TT homocigoto.

^c Razón de momios crudo.

^d Razón de momios ajustado por sexo y edad.

F) Combinación de los genotipos C677T y A1298C de la MTHFR y su asociación con leucemia linfoblástica aguda.

Se realizó el análisis de los haplotipos de la MTHFR para conocer si algún paciente presentó los genotipos de riesgo de los dos polimorfismos; encontramos que sólo dos haplotipos se asocian con LLA.

Los haplotipos asociados con LLA fueron 677CT/1298AA (OR 1.1 IC_{95%} 0.4-3) y el 677TT/1298AA (OR 1.2 IC_{95%} 0.5-3.9). Es importante destacar que no se encontró ningún paciente que contara con los genotipos de riesgo para los dos polimorfismos (677TT/ 1298AC ó CC), tanto de casos como de controles. Así mismo, se realizó el ajuste por sexo y edad, comportándose los OR de la misma manera, sugiriendo que estas variables no influyen en la asociación de los haplotipos con la LLA (cuadro 5).

Cuadro 5. Combinación de los genotipos C677T y A1298c de la MTHFR y su asociación con leucemia linfoblástica aguda.

Haplotipos MTHFR		Casos de LLA n=50		Controles n= 114		OR ^c (IC 95%)	OR ^d (IC 95%)
C677T ^a	A1298C ^b	n	%	n	%		
CC	AA	9	18	24	21.1	1.0*	1.0*
CC	AC	1	2	3	2.6	0.9 (0.2-12.9)	0.9 (0.1-10.5)
CC	CC	1	2	3	2.6	0.9 (0.2-12.9)	0.6 (0.1-7.3)
CT	AA	18	36	37	32.5	1.3 (0.5-3.9)	1.1 (0.4-2.9)
CT	AC	0	0.0	3	2.6	-	--
CT	CC	3	6	8	7.0	1.0 (0.2-5.5)	0.8 (0.2-3.9)
TT	AA	18	36	36	31.6	1.33 (0.5-3.9)	1.2 (0.5-3.4)
TT	AC	0	0.0	0	0.0	-	-
TT	CC	0	0.0	0	0.0	-	-

*Categoría y valor de referencia.

^a Genotipos A1298C MTHFR: AA homocigoto, AC heterocigoto, CC homocigoto.

^b Genotipos C677T MTHFR: CC homocigoto, CT heterocigoto, TT homocigoto.

^c Razón de momios crudo.

^d Razón de momios ajustado por sexo y edad.

DISCUSIÓN

Algunos estudios han mostrado que los polimorfismos C677T y A1298C aumentan el riesgo de algunas malignidades, incluyendo la LLA.^{24,25,26} La disponibilidad de grupos metilo para las reacciones de metilación del DNA es regulada principalmente por la actividad de la enzima MTHFR la cual es fundamental en el metabolismo del metilo. La evaluación de mutaciones comunes en la enzima, como son los polimorfismos C677T y A1298C y el nivel del folato pueden ser considerados factores de riesgo para el desarrollo de cáncer, por lo que su estudio puede llegar a ser el objetivo principal para la prevención del cáncer en un futuro cercano²⁴. Para ambos polimorfismos, los residuos de los aminoácidos del tipo “normal” alanina 222 y glutamato 429, son evolutivamente conservados entre secuencias de humanos y ratones; las sustituciones de estos aminoácidos representan cambios moderadamente conservados y moderadamente radicales, respectivamente. Esto sugiere que cada polimorfismo comúnmente tiene un efecto independiente sobre la función de la MTHFR.^{24,27,28}

Los resultados de nuestro estudio muestran que los genotipos 677CT/677TT fueron los más frecuentes en los casos (42% y 36%) y en los controles (42.1% y 31.6%), mientras que los genotipos 1298AC/CC se encontraron con muy baja frecuencia en ambas poblaciones (casos 2% y 8%); (controles 5.3% y 9.6%). Con respecto a otros hallazgos en poblaciones diferentes a la población mexicana, se encontró una frecuencia menor de los genotipos C677T y A1298C en niños con LLA y en controles. En este sentido, en una población brasileña de un total de 70 casos y 71 controles, se encontraron estos genotipos con una frecuencia de 8.6% y 18.3% respectivamente para el genotipo 677TT y para el genotipo 677CT un 40% y un 50.7% respectivamente²⁰. En el mismo sentido, Zanrosso y col., en la población de Brasil demostraron que las frecuencias para el genotipo 677TT en casos y en controles fueron de 6.3% y 12.7%, mientras que para el genotipo 677CT son de 26.6% y 40.5%.²⁸ En otros estudios llevados a cabo en Portugal y en Grecia, también demostraron la baja frecuencia del genotipo 677TT y del 677CT²⁰. Con respecto al

polimorfismo A1298C, en los estudios realizados en Brasil, se encontraron frecuencias muy similares a nuestros resultados, reportando una frecuencia muy baja para el genotipo 1298CC con un 7.04% y un 2.82% para casos y controles respectivamente; igual que el estudio hecho por Zanrosso y col., en Brasil, donde la frecuencia para ambos genotipos fue de 5.1%^{20,28}. De la misma manera, en el estudio realizado en población de Portugal, encontraron frecuencias de 8.7% para los casos y 8.2% para los controles. Cabe señalar que en estos tres estudios, el genotipo 1298AC se encontró muy similar o un poco más alto que el genotipo 1298AA, a diferencia de nuestros resultados donde este genotipo fue el menos frecuente.²⁰

La frecuencia del alelo 677T fue de 0.57 para la población de los casos y de 0.53 para la de los controles, coincidiendo con la frecuencia alélica de 0.59 reportada por Mutchinick y col., para diferentes regiones de México²⁹. Todos los estudios realizados en población mexicana reportan frecuencias altas del genotipo 677T. Dávalos y col., encontraron una frecuencia de 0.57 del alelo 677T en una población de mestizos mexicanos de Guadalajara, en padres de niños con defectos del tubo neural³⁰. González y col., demostraron las mismas frecuencias de este genotipo en niños con defectos del tubo neural en el estado de Yucatán³¹. De la misma manera el estudio realizado en Puebla por Ruiz-Argüelles y col., muestra que la población de mestizos sanos tiene una frecuencia del alelo 677T de 0.78, al igual que en otras regiones del país, existiendo poca diferencia entre las frecuencias de dichas regiones^{31,32}. Lo anterior confirma la alta prevalencia de la variante C677T en México y pone de manifiesto que cuenta con la más alta frecuencia reportada en todo el mundo^{30,31}.

Las frecuencias del alelo 1298C en nuestro estudio fueron de 0.09 y 0.12 respectivamente, muy similares a un estudio llevado a cabo en el Estado de Guerrero, México por Antonio (2004), en donde reporta una frecuencia de 0.11 y 0.12. Ambos datos son muy similares a los reportados por Song y col., que reporta una frecuencia de 0.14 y 0.17 para el alelo 1298C en la población China^{33,34}.

En América, la prevalencia más alta del polimorfismo C677T se presenta en Mexicanos (32%); la intermedia en caucásicos (9-11%) y la más baja en afroamericanos (0-3%). Mientras que en Europa, el rango de frecuencia va de 4 a 7% (en población Holandesa y Finlandesa); con valores intermedios en Francia y Hungría (8-10%), y valores altos en el sur de Europa (12-15% en España y con 20-26% en el sur de Italia)³⁵.

En un estudio realizado por Guéant y col., en el que compara la prevalencia de los polimorfismos en las poblaciones: de México, del oeste de África y de Europa, reportan que en el oeste de África y en México se encuentran las dos áreas con las frecuencias más bajas del alelo 1298C y del genotipo 1298CC, mientras que las frecuencias más altas se encontraron en Francia³⁶.

En nuestro estudio se encontró asociación con el riesgo de desarrollar LLA en presencia del polimorfismo C677T, en cualquiera de los genotipos CT, TT o ambos; de manera similar en el estudio realizado por Ruiz-Argüelles, encontraron una asociación del genotipo 677TT con LLA, con un OR de 2.82 (IC_{95%}1.26-5.52)³². Los resultados anteriores difieren con lo reportado en otros países, como Brasil, en donde no encontraron asociación del genotipo 677TT con LLA, con un OR de 0.42 (IC_{95%}0.15-1.17).²⁰ En el estudio hecho en Grecia, el OR fue de 0.54 (IC_{95%}0.14-2.08), por lo que no se encontró asociación entre el desarrollo de LLA y el genotipo de riesgo. Mientras que en un estudio realizado en la población de la ciudad de México el genotipo 677TT es un factor de riesgo para los defectos del tubo neural en madres, mientras que en la población de Guadalajara la variante C677T no puede ser relacionada como el principal factor de riesgo genético para el desarrollo de defectos del tubo neural³¹.

Con respecto a la asociación del polimorfismo A1298C con el riesgo de desarrollar LLA, en presencia del genotipo 1298CC no encontramos ninguna asociación, comportándose nuestra población de la misma manera que en los estudios llevados a cabo en Brasil y Portugal^{20,28}. Nuestro resultado es congruente

con lo reportado por Guéant y col., que encontró una baja frecuencia de este polimorfismo en la población mexicana³⁵.

Debido a la cercanía de las dos variantes del gen en el cromosoma decidimos examinar la asociación de los haplotipos con el riesgo de desarrollar LLA, encontrando que los haplotipos asociados son 677CT/1298AA y 677TT/1298AA, con un OR para ambos haplotipos de 1.3 (IC_{95%}0.5-3.9), indicándonos una asociación con el riesgo de desarrollo de LLA. Este resultado coincide con el estudio realizado por Song y col., en la población China, en donde encontró asociación de estos haplotipos con el riesgo de desarrollar cáncer de esófago, debido a que la metilación del DNA geonómico es significativamente baja en los portadores del genotipo 677TT, a diferencia de los que tienen el genotipo 677CC³³.

Con respecto a la ausencia de pacientes con el haplotipo 677TT/1298CC, Guéant y col., hacen referencia a un estudio realizado en fetos abortados en los que se incrementa la frecuencia de estos haplotipos, sugiriéndonos un efecto letal, ya que la actividad de la enzima MTHFR disminuye, sin contar con los efectos que se pudieron ocasionar en otras vías metabólicas, como en la conversión de homocisteína a metionina entre otros. Nosotros no encontramos este haplotipo en la población estudiada³⁴.

Tomando en cuenta datos obtenidos en un estudio realizado por Saavedra (2007), partiendo de las mismas muestras encontramos que de los 50 pacientes con LLA, 7 tuvieron las translocaciones 9:22, 8:21, 4:11 y 12:21 en sus cromosomas, lo cual es muy interesante, si consideramos que estos mismos pacientes tenían principalmente el alelo de riesgo 677T, lo cual nos da una idea de la importancia que tiene el nivel del folato y la función de la MTHFR para evitar la formación de sitios frágiles en el cromosoma e impedir que dichas translocaciones ocurran^{14,15}.

Los resultados de este trabajo son de los primeros obtenidos en población mexicana con respecto a los polimorfismos C677T y A1298C de la MTHFR y la asociación con el desarrollo de LLA en niños. Se han reportado varios estudios en otras patologías, principalmente en defectos del tubo neural. Sin embargo, una de las limitantes principales de este estudio fue el tamaño de la muestra; por lo que es necesario realizar estudios con una población más numerosa, considerando la ingesta de folato de los niños y realizar también el estudio de los polimorfismos en las madres durante el embarazo ya que se ha demostrado que si la ingesta de folato es adecuada durante el embarazo, se puede reducir el riesgo de padecer LLA.

CONCLUSIONES

- ♣ El genotipo 677CT del polimorfismo C677T fue el más frecuente tanto en pacientes con LLA como en controles, seguido del genotipo 677TT; ambos han sido reportados como genotipos de riesgo. Mientras que el genotipo 1298AA del polimorfismo A1298C, fue el más frecuente en ambas poblaciones, coincidiendo con estudios anteriores que lo han reportado como el genotipo normal.
- ♣ Se demostró que el tener el alelo T del polimorfismo C677T confiere susceptibilidad al desarrollo de LLA, ya sea en aquellos niños con el genotipo 677TT o 677CT. Mientras que el genotipo 1298CC o 1298AC se comportó como un factor protector para el desarrollo de este padecimiento.
- ♣ Aunque el alcance del estudio es bajo, debido al tamaño de la muestra, los resultados indican que los niños portadores del genotipo 677CT tienen riesgo de desarrollar LLA en comparación con aquellos niños que no portan este genotipo. Sin embargo, con los resultados obtenidos se puede llegar a pensar en estos polimorfismos como posibles biomarcadores de susceptibilidad para el desarrollo de LLA.

REFERENCIAS

1. Mejía-Aranguré JM, Fajardo-Gutiérrez A, Bernáldez-Ríos R, Paredes-Aguilera R, Flores-Aguilar H, Martínez-García MC. Incidencia de leucemias agudas en niños de la ciudad de México, de 1982 a 1991. *Salud Pública Mex* 2000; 42:431-437.
2. Mejía-Aranguré JM, Ortega-Alvarez MC, Fajardo-Gutierrez A. Epidemiología de las leucemias agudas en niños. *Rev Med IMSS* 2005; 43 (4): 323-333.
3. Mangano JJ. A rise in the incidence of childhood cancer in the United States. *Int J Health Surv* 1999;29:393-408.
4. Skibola CF, Smith MT, Kane E, Román E, Rollinson S, Raymond A, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *PNAS* 1999, 96:22, 12810-12815.
5. Publicaciones información. 2005. http://portal.salud.gob.mx/contenidos/publicaciones/publicaciones_informacion.html. 01-Diciembre 2007.
6. Schnakenberg E, Mehles A, Cario G, Rehe K, Seidemann K, Schlegelberger B, et al. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and susceptibility to pediatric acute lymphoblastic leukemia in a German study population. *BMC Medical Genetics* 2005, 6:23.
7. Robien K, Ulrich CM. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a HuGE minireview. *Am J Epidemiol* 2003; 157: 571-582.
8. Vaughn JD, Bailey LB, Shelnutt KP, von-Castel-Dunwoody KM, Maneval DR, Davis SR, et al. Methionine Synthase Reductase 66AG Polymorphism Is Associated with Increased Plasma homocysteine Concentration When Combined with the Homozygous Methylenetetrahydrofolate Reductase 677C3T Variant. *J. Nutr.* 2004, 134: 2985–2990.
9. Heijmans BT, Jolanda MA, Eka H, Suchiman D, Cornelisse CJ, Westendorp RG, et al, A common variant of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (1p36) is associated with an increased risk of cancer, *Cancer research* 2003, 63: 1249-1253.
10. Guenther BD, Sherppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Biol* 1999; 6(4): 359-365.
11. Robien K, Ulrich CM, Bigler J, Yasui Y, Gooley T, Bruemmer B, et al, Methylenetetrahydrofolate reductase genotype affects risk of relapse after hematopoietic cell transplantation for chronic myelogenous leukemia, *Clinical Cancer Research* 2004, 10; 7592-7598.

12. Friso S, Sang-Woon C, Girelli D, Mason 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 5606–5611 PNAS,2002; 99:8.
13. Krajcinovic M, Lamothe S, Labuda D, Lemieux-Blanchard E M, The ore  t Y, Moghrabi A, et al. Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. BLOOD 2004; 103:1.
14. Ghandour H, Zhoutao C, Selhub J, and Rozen R. Mice Deficient in Methylenetetrahydrofolate Reductase Exhibit Tissue-Specific Distribution of Folates. J. Nutr. 2004; 134: 2975–2978.
15. Vaughn JD, Bailey LB, Shelnutt KP, von-Castel-Dunwoody KM, Maneval DR, Davis SR, et al. Methionine Synthase Reductase 66AG Polymorphism Is Associated with Increased Plasma homocysteine Concentration When Combined with the Homozygous Methylenetetrahydrofolate Reductase 677C3T Variant. J. Nutr. 2004, 134: 2985–2990.
16. Hongbing S, Spitz M.R.,Wang L-E, Hong W. H, Wel Q. Polymorphism of methylene-tetrahydrofolate reductasa and risk of lung cancer: a case-control study. 2001. Cancer Epidemiology, biomarkers &prevention. 10, 397-401.
17. Gemmati D, Ongaro A, Scapoli GL, Della-Porta M, Tognazzo S, Serino ML, et al, Common gene polymorphisms in the metabolic folate and methylation pathway and the risk of acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin’s lymphoma in adults, cancer epidemiol biomarkers prev 2004; 13 (5): 787-794.
18. Castro R, Rivera I, Ravasco P, Camilo ME, Jakobs C, Blom HJ, et al, 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C-T and 1298 A-C mutations are associated with DNA hypomethylation, J Med Genet 2004; 41: 454-458.
19. Wiemels JL, Smith RN, Taylor M, Eden OB, Alexander FE. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of chlildhood acute leukemia. PNAS, 98;7, 4004-4009.
20. Veiga-PereiraT, Rudnicki M, Costa-Pereira A, Pombo-de-Oliveira MS. Rendrik-Franca F. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and acute lymphoblastic leukemia risk: a meta-analysis. Cancer Epidemiol biomarkers Prev 2006;15 (10): 1956-1963.
21. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. Nucleid Acids Res 1998; 16 (3)1215.
22. Sambrook J, Russel D. Molecular cloning a laboratory manual. 3ra ed.col Spring Harbor Laboratory Press. E.U. 2001.
23. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Gollete P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a commo mutation in methylenetetrahydrofolate reductasa. Nature Genet 1995; 10.

24. Matthew FR, Gabrielle SS, Ruth A, Matutes E, Catovsky D, Houlston RS. MTHFR Polymorphisms and Risk of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cáncer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(12):2268–70.
25. Choi SW, Mason JB. Folate Status: Effects on Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *J. Nutr* 2000; 132: 2413S–2418S.
26. Milne E, De Klerk NH, Bockxmeer FV, Kees UR1, Thompson JR, Baker D, et al. Is there a folate-related gene-environment interaction in the etiology of childhood acute lymphoblastic leukemia? *Int. J. Cáncer* 2006;119: 229–232.
27. Friso S, Girelli D, Trabetti E, Olivieri O, Guarini P, Pignatti PF, et al. The MTHFR 1298A>C Polymorphism and Genomic DNA Methylation in Human Lymphocytes. *Cáncer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(4):938–43.
28. Zanrosso CW, Hatagima A, Emerenciano M, Ramos F, Figueiredo A. The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population *Leukemia Research* 2006; 30:477–481.
29. Mutchinick OM, López MA, Luna L, Waxman J, Babinsky VE. High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Mol genet Metab* 1999;68:461-467.
30. Davalos IP, Olivares N, Castillo MT, Cantu JM, Ibarra B, Sandoval L, et al. The C677T polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate reductase gen in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Ann Genet* 2000; 43:89-92.
31. Gonzalez L, Garcia G, Castillo I, Canto J, Ceballos J, Pinto D, et al. Frecuency of the thermolabile variant C677T in the MTHFR gene and lack of association with neural tube defects in the state of Yucatan, Mexico. *Clin Genet* 2002;62: 394-398.
32. Ruiz-Argüelles GJ, Coconi-Linares LN, Garces-Eisele J, Reyes-Nuñez V. Methotrexate-induced mucositis in acute leukemia patients is not associated with the MTHFR 677T allele in Mexico. *Hematology* 2007; 00(0): 1–5.
33. Antonio-Vejar V. Polimorfismos C677T y A1298C en cáncer cervico uterino y lesiones precursoras (tesis). Guerrero (Gro): Universidad Autónoma de Guerrero, 2004.
34. Song C, Xing D, Tan W, Wei Q, Lin D. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms Increase Risk of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in a Chinese Population *Cáncer research* 2001; 61:3272–3275.
35. Lacassie HJ, Nazar C, Yonish B, Sandoval P, Muir HA, Mellado P. Reversible nitrous oxide myelopathy and a polymorphism in the gene encoding 5,10-methylenetetrahydrofolate reductasa. *Br J Anaesth* 2006; 96: 222–5.
36. Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP, et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductasa 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 701-707.

37. Saavedra-Herrera Mónica Virginia. Caracterización molecular de Leucemia Aguda en niños en Centros Hospitalarios de Guerrero y Morelos (Tesis). Guerrero (Gro): Universidad Autónoma de Guerrero. 2007.