

Mutación 677T del gen MTHFR en adenomas y cáncer colorrectal en una muestra de la población del noreste de México.

Resultados preliminares

Dr. Iván Delgado-Enciso,* Dra. Sandra Guadalupe Martínez-Garza,* Dr. Augusto Rojas-Martínez,* Dra. Rocío Ortiz-López,* Dr. Francisco Bosques-Padilla,** Dra. Ana Laura Calderón-Garcidueñas,*** Dra. Maricela Zárate-Gómez,**** Dr. Hugo Alberto Barrera-Saldaña *

*Laboratorio de Genética Molecular de la ULIEG, Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina de la UANL. **Servicio de Gastroenterología y ****Servicio de Cirugía del Hospital Universitario «Dr. José E. González» de la UANL. ***Hospital de Especialidades N° 25 del IMSS Monterrey N.L. Correspondencia: Dr. Hugo A. Barrera Saldaña. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Dr. Aguirre Pequeño y Madero, Col. Mitras Centro. 64460 Monterrey, N.L. México. Tel: 8 329 4174 Fax: 8 333 774. E-mail: hbarrera@fm.uanl.mx

Recibo para publicación: 15 de septiembre de 2000

Aceptado para publicación: 17 de enero de 2001

RESUMEN Introducción: la ingesta adecuada de folatos puede reducir el riesgo para cáncer de colon. La enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) juega un papel importante en el metabolismo del folato. El papel de la mutación 677T del gen MTHFR en el riesgo del cáncer de colon es controversial. Recientemente se reportó que la población mexicana presenta una de las frecuencias alélicas más altas del mundo para esta mutación, por lo que resulta interesante analizar si ésta influye en el riesgo de cáncer colorrectal en nuestra población. **Objetivo:** determinar la frecuencia de la mutación 677T del gen MTHFR en un grupo de pacientes con cáncer de colorrectal y adenomas vs. un grupo control en una muestra de la población en el noreste de México. **Método:** se procesaron 74 muestras de cáncer colorrectal, 32 adenomas y 110 muestras de controles apareados por edad y sexo. Se realizó extracción de DNA y análisis de la mutación 677T mediante PCR-RFLPs. **Resultados:** al comparar sujetos portadores de la mutación (homocigotos T/T y heterocigotos C/T) vs. portadores de alelos normales (C/C) se obtiene un riesgo relativo de 1.81 (IC 95% 0.97 a 3.3), con $\chi^2 = 3.5$ y $p = 0.06$. **Conclusiones:** los individuos portadores de la mutación presentan una tendencia hacia un riesgo aumentado para cáncer de colon, lo que sería congruente con el concepto que la deficiencia de folatos contribuye con la patogenia del cáncer colorrectal. La carencia de significancia estadística en este reporte se puede explicar por el tamaño de muestra.

SUMMARY Introduction: Adequate intake of folates has been associated to low prevalence of colon cancer. Methylene tetrahydrofolate reductase enzyme (MTHFR) plays an important role in folate metabolism. The role of the 677T mutation at the MTHFR gene in the risk for colorectal cancer remains controversial. A recent report established that this mutation has a high prevalence in the healthy Mexican population. **Aims:** To analyze the prevalence of 677T MTHFR mutation in patients with colorectal cancer and controls without chronic gastrointestinal disorders. **Methods:** Seventy-four colorectal cancer, 32 adenomas and 110 normal samples were analyzed. Patients and controls were matched for sex and age. For each sample, DNA isolation, PCR, and mutation detection by restriction enzyme digestion were performed to determine the allele at the 677 position in the MTHFR gene. **Results:** Genotype 677C/677C was found in 18.7, 20.3, and 30.9% in adenomas, cancer lesions and controls, respectively. Frequencies of the 677C/677T genotype were 59.4, 56.7, and 47.3%, in adenomas, cancer lesions, and controls, respectively. Genotype 677T/677T was found in 21.9, 23.0, and 21.8% in adenomas, cancer lesions, and controls, respectively. The odds ratio between genotypes carrying the mutation (T/T and C/T) and normal genotype (CC) was 1.81 (IC 95% 0.97-3.3), $\chi^2 = 3.5$, $p = 0.06$. **Conclusion:** Our results showed that persons who carry the 677T mutation at MTHFR locus have a tendency for an increased risk for colorectal cancer. This study supports the basic concept that low levels of folic acid contribute with the colorectal cancer pathogenesis.

Palabras clave: *cáncer de colon, adenoma, MTHFR, México, folato.*

Our lack of statistic significance may be due to reduced sample size.

Key words: *Colon cancer, adenoma, MTHFR, Mexico, folate.*

INTRODUCCIÓN

Dentro de las enfermedades neoplásicas, el cáncer colorrectal (CCR) ocupa la segunda causa de muerte por cáncer en los Estados Unidos¹ y el sexto lugar de incidencia de neoplasias malignas en México. En nuestro país durante 1997, se detectaron 3,381 casos de CCR (incluyendo conducto anal y ano), que representó 3.9% de las neoplasias malignas.² Sin embargo, se espera que la incidencia de este cáncer aumente al incrementarse la población en edad posproductiva de nuestro país, pues 90% de los casos se presenta después de los 50 años.³ Actualmente México ocupa el lugar número 45 a nivel mundial en la tasa de mortalidad por CCR, la cual es de 3.1 y 3.2 por 100,000 habitantes en mujeres y hombres respectivamente.⁴

El CCR es una enfermedad de la cual se conocen muchos aspectos de su patogénesis y varios factores que influyen en su desarrollo.⁵ Las células de la mucosa del colon acumulan alteraciones en los genes que controlan el crecimiento y la proliferación celular, particularmente genes supresores de tumor y proto-oncogenes. En 1990, Fearon y Vogelstein describieron el modelo genético de las etapas de la tumorigénesis colorrectal. Sugirieron que la progresión del epitelio normal a epitelio hiperplásico ® adenoma temprano ® adenoma intermedio ® adenoma tardío ® carcinoma ® carcinoma metastásico, se debe al acúmulo progresivo de múltiples mutaciones. Propusieron además las al-

teraciones en el DNA responsables de esta progresión, las cuales incluyen, mutaciones en APC (adenomatous polyposis coli, en inglés), K ras, p53 y DCC (deleted in colorectal carcinoma, en inglés), además de hipometilación del DNA (*Figura 1*).⁶

Sin embargo, el cáncer de colon es una enfermedad multifactorial, en donde además de los aspectos genéticos de cada individuo, influyen los factores ambientales. En este contexto, una alta ingesta de carnes rojas,⁷ la obesidad,⁸ el alcohol⁹ y el tabaco¹⁰ se han relacionado con un riesgo incrementado para CCR. Por el contrario, una alta actividad física,¹¹ el uso de aspirina y otros antiinflamatorios no esteroideos, así como una dieta alta en folato, reducen sustancialmente la aparición de CCR.⁵

El Nurses' Health Study demostró que las mujeres que consumen vitaminas con folato por 15 años o más, reducen 75% el riesgo de desarrollar CCR¹². El mecanismo por el cual el ácido fólico pueden reducir el riesgo de cáncer no ha sido bien establecido. La deficiencia crónica de folato puede causar alteraciones en la síntesis y reparación del DNA.¹² También puede contribuir con cambios en la metilación (hipometilación), lo que afectaría la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumor.¹³ Sin embargo, la biodisponibilidad del folato o sus metabolitos, no está determinada sólo por la ingesta, porque diversas enzimas intervienen en su metabolismo. Entre ellas destaca la enzima metilentetrahydrofolato reductasa (MTHFR), que cataliza la síntesis de 5-metiltetrahydrofolato, que es la prin-

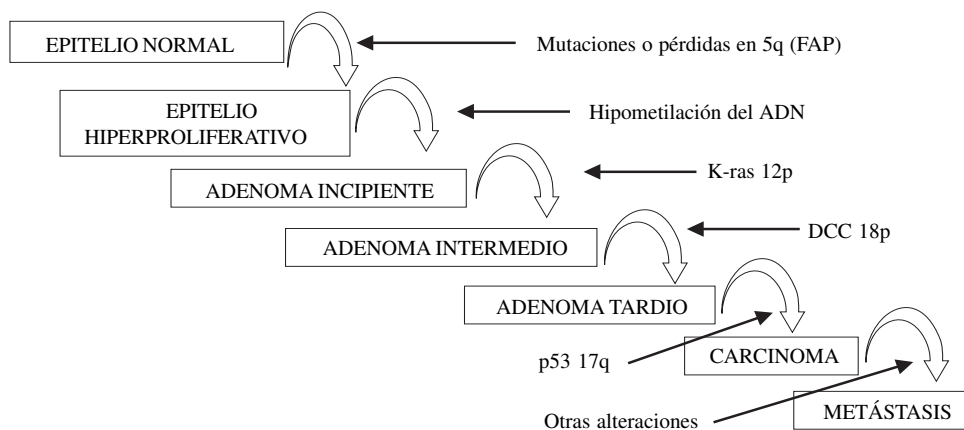


Figura 1. Ilustración de los cambios moleculares ocurridos durante la progresión de epitelio normal a CCR. (Modificada de Vogelstein).

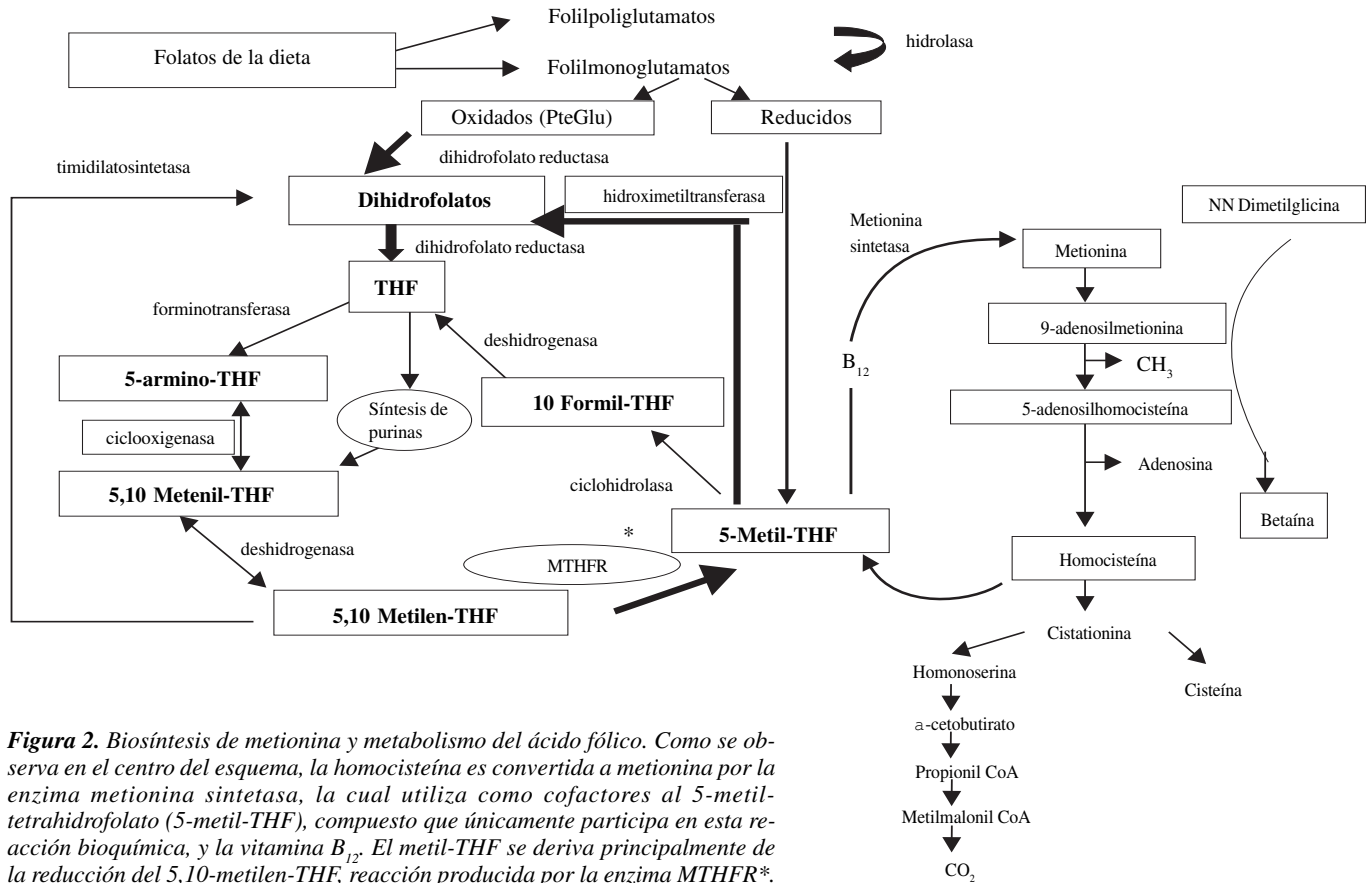


Figura 2. Biosíntesis de metionina y metabolismo del ácido fólico. Como se observa en el centro del esquema, la homocisteína es convertida a metionina por la enzima metionina sintetasa, la cual utiliza como cofactores al 5-metil-tetrahidrofolato (5-metil-THF), compuesto que únicamente participa en esta reacción bioquímica, y la vitamina B₁₂. El metil-THF se deriva principalmente de la reducción del 5,10-metilen-THF, reacción producida por la enzima MTHFR*.

principal forma de folato circulante y el donador de carbonos para la remetilación de homocisteína a metionina; además de ser el precursor de S-adenosilmetionina. La S-adenosilmetionina es el donador universal de grupos metilo para las reacciones de metilación, incluyendo la metilación del DNA¹⁴ (Figura 2). En 1995 Frost y cols. encontraron una mutación en la posición 677 (T por C) del gen de la enzima MTHFR. Dicha mutación ya sea en su estado homocigoto 677T/677T o heterocigoto 677C/677T tiene una actividad enzimática significativamente reducida.¹⁵ Individuos con genotipo 677T/677T han demostrado hipometilación del DNA,¹⁴ el cual puede ser uno de los eventos moleculares que intervienen en fases tempranas de la progresión del CCR.

En CCR, la mutación 677T ha sido relacionada de manera contradictoria con esta patología. Diversos estudios concluyeron una falta de asociación entre la mutación y adenomas o CCR,¹⁶⁻¹⁸ mientras otros investigadores han propuesto contrariamente un riesgo ligeramente disminuido en sujetos portadores de la mutación.¹⁹⁻²¹ De tal manera, dentro del proceso de carcinogénesis, la mutación de MTHFR podría ser un paradigma de las interacciones entre genes y nutrientes.²²

Recientemente se reportó que México cuenta con una de las frecuencias más altas para la mutación 677T en el mundo y resulta interesante analizar el riesgo que pueda representar la mutación 677T del gen MTHFR en el desarrollo del CCR en una muestra de la población mexicana.

MÉTODO

Se realizó un estudio de casos y controles cuya finalidad fue conocer la relación entre cáncer colorrectal-adenomas y el genotipo 677 de la enzima MTHFR.

Pacientes y controles

Todos los pacientes del presente estudio tuvieron un diagnóstico anatomopatológico confirmado de adenoma o cáncer colorrectal, de los cuales 38 muestras provinieron de mujeres y 68 provinieron de varones. El margen de edad en el grupo de casos fue de 7 a 92 años con un promedio de 56.5 años. Las muestras analizadas fueron 32 biopsias de adenomas y 74 biopsias de CCR obtenidas mediante colonoscopia o cirugía terapéutica durante 1997. Los controles fueron 110 sujetos asintomáticos comparados con el grupo de casos por edad y sexo. Del

grupo control se recolectó sangre periférica en tubos con EDTA. El tejido de biopsias fue conservado a -70°C y la sangre a 4°C hasta antes de su análisis. Todos los participantes fueron voluntarios y reclutados previa firma del consentimiento informado en hospitales de referencia de Monterrey, Nuevo León.

Aislamiento del DNA

Sangre periférica. La sangre se mezcló con un buffer de lisis (1% tritón, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) y posteriormente se añadieron los solventes fenol y Sevag (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1). Los componentes se mezclaron, centrifugaron y se separó el sobrenadante de donde se precipitó el DNA con etanol al 100%. El DNA fue reconstituido en TE 1X (Tris- EDTA pH 7.4).

Tejido tumoral. Se tomó un fragmento de 10 a 20 mg, se segmentó finamente con una hoja de bisturí y se digirió en el buffer "TE9" (500mM Tris pH 9.0, 20mM EDTA, 10mM NaCl, 0.5% de SDS). Se agregaron 25 mL de proteinasa K (0.1 mg/mL) y se incubó a 48°C en agitación por toda la noche. Posteriormente se realizaron dos extracciones fenol-cloroformo, de las cuales se recuperó el sobrenadante para después precipitar el DNA con etanol. La pastilla de DNA se reconstituyó en TE 1X. La concentración y calidad del DNA fue medida por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Análisis molecular de la mutación 677T del gen MTHFR

La genotipificación del gen MTHFR en la posición nucleotídica 677 fue desarrollada mediante PCR y una

digestión alelo específica, como previamente fue descrito¹⁵. El producto amplificado es de 198 pares de bases (pb). La sustitución T por C de la forma mutante crea un sitio de restricción para la enzima *Hinf* I, por lo que el producto de 198 pb se divide en un fragmento de 175 pb y otro de 23 pb. Los productos digeridos fueron resueltos en electroforesis en geles de agarosa al 3%.

Análisis estadístico

De todas las variables analizadas se obtuvieron porcentajes y frecuencias. La frecuencia alélica fue obtenida dividiendo el número de alelos T o C entre la totalidad de alelos del grupo analizado. La prueba de Ji cuadrada (χ^2) fue usada para comparar los genotipos 677 de MTHFR entre casos y controles. El riesgo relativo para los genotipos fue calculado mediante la razón de momios²³. La significancia estadística fue interpretada como significativa a valores de $p < 0.5$.

RESULTADOS

De todas las biopsias colectadas se obtuvo DNA que osciló desde 5 hasta 7 mg de DNA por cada 15 mg de tejido procesado. De la sangre se lograron extraer entre 100 a 150 mg de DNA/mL de sangre, procesando de 2 hasta 6 mL por paciente. En todos los casos el DNA fue de calidad suficiente para obtener productos de PCR.

En la *figura 3* se muestra la genotipificación de algunos pacientes. Para el análisis estadístico, los pacientes con adenomas y con CCR se ubicaron en un solo grupo, considerando que cada uno constituye una sola entidad clínica. De igual modo, los genotipos se clasificaron en dos grupos, uno con sujetos sin la mutación (C/C) y otro

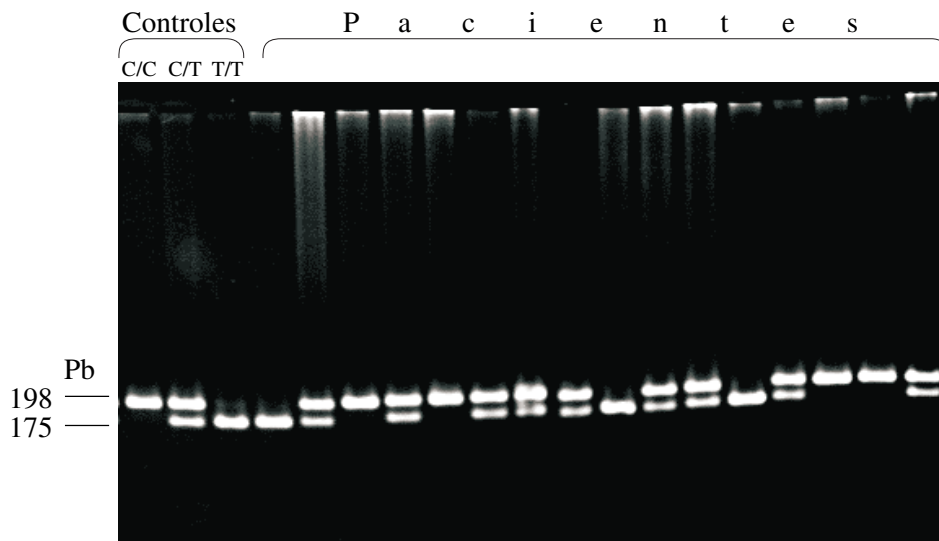


Figura 3. Gel de agarosa al 3%. A la izquierda se muestran controles para los tres genotipos 677 de MTHFR y a la derecha se observa la genotipificación de algunos pacientes. pb: pares de bases.

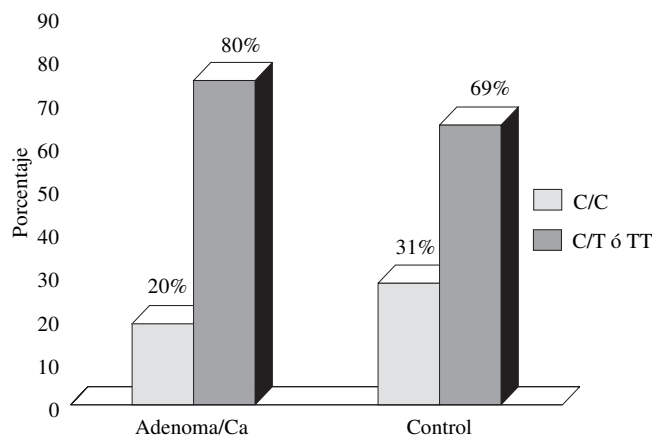


Figura 4. Comparación entre portadores de la mutación y portadores del alelo normal en casos y controles.

con portadores de la mutación (homocigotos T/T más heterocigotos C/T) (Figura 4). La frecuencia alélica para 677T fue 0.51 y 0.46 en casos y controles respectivamente, mientras que el alelo normal 677C se encontró en frecuencias de 0.49 y 0.55 en casos y controles respectivamente.

Los porcentajes del genotipo 677C/677C en adenomas, CCR y controles fueron 18.7, 20.3 y 30.9%, respectivamente. Los porcentajes del genotipo 677C/677T fueron 59.4, 56.7 y 47.3% en adenomas, CCR y controles, respectivamente. El genotipo restante 677T/677T se encontró en porcentajes de 21.9, 23.0, y 21.8% en adenomas, CCR y controles, respectivamente. Al comparar sujetos portadores de la mutación (homocigotos T/T y heterocigotos C/T) vs. portadores de alelos normales (C/C), se obtiene un riesgo relativo de 1.81 (IC 95% 0.97 a 3.3). La prueba de Ji cuadrado muestra una tendencia hacia una diferencia en la distribución de los genotipos portadores del alelo 677T entre casos y controles ($\chi^2 = 3.5$, $p = 0.06$).

DISCUSIÓN

La frecuencia alélica del alelo mutante 677T de MTHFR (0.59), reportada por Mutchinick y cols. para diferentes regiones del país, es una de las más altas del mundo.²⁴ En nuestro estudio, la frecuencia de la mutación 677T en el grupo control con un número mayor de sujetos estudiados (0.45) fue muy similar a la reportada por Mutchinick para la región norte del país (0.49). Los resultados de nuestro grupo control, tienen grandes implicaciones clínicas ya que confirman la alta frecuencia del alelo mutado en nuestra población, la cual se ha relacionado de manera contundente con hiperhomocisteinemia y enfermedades

cardiovasculares,²⁵⁻²⁷ además con defectos del cierre del tubo neural²⁸ y neoplasias malignas.^{29, 30}

Al comparar los portadores de la mutación (T/T y C/T) vs. portadores de alelos normales (C/C) se observa un riesgo de 1.81. Esto muestra que los individuos con la mutación presentan una tendencia de riesgo aumentado para desarrollar cáncer de colon. La falta de significancia estadística para la distribución de frecuencias de genotipos portadores del alelo 677T entre los casos y los controles se puede explicar por el tamaño de muestra. Este resultado es diferente a lo reportado en otros estudios, en donde contrariamente observan un riesgo ausente o ligeramente disminuido para CCR en los portadores de la mutación.¹⁶⁻²¹ Sin embargo, nuestro resultado es congruente con el concepto que la deficiencia de ácido fólico incide en la patogenia del CCR. Esto último debido a que el folato, al igual que otros nutrientes que están inmersos dentro de la vía metabólica de la enzima MTHFR y la mutación 677T, tienen efectos deletéreos en su actividad biológica.

El único estudio que ha relacionado al alelo 677T y CCR es el de Ulrich CM y cols. (1999). En este reporte se sugiere la interacción entre folato y la enzima MTHFR mutada, ya que individuos T/T con un adecuado consumo de folato no mostraron ningún riesgo para CCR. Sin embargo, los individuos T/T con una baja ingesta de nutrientes (folato, B12 y B6) presentaron un riesgo de 2 a 3 veces mayor para desarrollar CCR y de 3 a 6 si los sujetos son mayores de 60 años.³⁰ Esto muestra la modulación que el folato puede ejercer sobre el riesgo de CCR en sujetos T/T. Nuestro estudio es el primero que tiende a mostrar la asociación entre el genotipo 677T y CCR sin tomar en cuenta factores ambientales (nutricionales). Esto puede deberse a la alta frecuencia del alelo 677T y una probable baja ingesta de folato en nuestra población. Aunque los factores ambientales no medidos en nuestro estudio, como la ingesta de folato, pueden corregirse al emplear el grupo control (de la misma edad, sexo y población que el grupo experimental), el medir los factores nutricionales en estudios posteriores podrían demostrar de manera más clara el papel de la mutación 677T en nuestra población.

Aunque el mecanismo por el cual el ácido fólico pudiera disminuir el riesgo de CCR no está del todo claro. Se ha sugerido que alteraciones en la metilación del DNA puedan estar implicadas¹², las cuales también se han relacionado con la mutación 677T de MTHFR. Individuos con genotipo 677TT han mostrado una hipometilación de su DNA¹⁴, el cual podría ser uno de los eventos moleculares tempranos en la progresión del CCR⁶. Por

otra parte, se ha propuesto que la ingesta de ácido fólico interviene también en las fases tempranas de la progresión a CCR¹² y puede ser en este punto donde ambos factores genéticos, (MTHFR) y ambientales (folato), pueden interactuar y modificar el riesgo a cáncer. Sin embargo la relación entre hipometilación en personas con genotipo T/T MTHFR y el desarrollo de cáncer, así como la compleja interacción entre folato y MTHFR, están aún por definirse.

De confirmarse la tendencia mostrada en nuestro estudio, en la cual los portadores de la mutación 677T tienen un mayor riesgo a desarrollar CCR, los resultados tendrían una gran implicación clínica, ya que permitirían identificar individuos en riesgo. Lo anterior no sólo podría alertarlos sobre el problema, sino también modificar su riesgo mediante cambios en sus hábitos alimentarios o la administración de ácido fólico.³¹ Más aún, debido a la alta frecuencia de la mutación en nuestra población, se podría estimular el consumo de folato en la población general para incidir en el riesgo a CCR.

Se requieren estudios posteriores para demostrar la interacción entre las mutaciones de la enzima MTHFR, la ingesta de folato y su relación con CCR en nuestra población.

REFERENCIAS

- Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000; 50: 7-33.
- Dirección general de Epidemiología, Secretaría de Salud. Compendio del Registro histopatológico de neoplasias en México. (1999) México, D.F.
- Ries L, Kosary C, Hankey B, et al. SEER Cancer Statistics, 1973-1995. National Cancer Institute, Bethesda, MD. 1995.
- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin* 1998; 48: 6-29.
- Tomeo CA, Colditz GA, Willett WC, Giovannucci E, Platz E, Rockhill B, Dart H, Hunter DJ. Harvard Report on Cancer Prevention. Volume 3: prevention of colon cancer in the United States. *Cancer Causes Control* 1999; 10: 167-180.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
- Slattery ML, Berry TD, Potter J, Caan B. Diet diversity, diet composition, and risk of colon cancer (United States). *Cancer Causes Control* 1997; 8: 872-882.
- Martínez ME, Giovannucci E, Spiegelman D, Hunter DJ, Willett WC, Colditz GA. Leisure-time physical activity, body size, and colon cancer in women. Nurses' Health Study Research Group. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 948-955.
- Giovannucci E, Willett WC. Dietary factors and risk of colon cancer. *Ann Med* 1994; 26: 443-452.
- Giovannucci E, Martínez ME. Tobacco, colorectal cancer, and adenomas: a review of the evidence. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1717-1730.
- Colditz GA, Cannuscio CC, Frazier AL. Physical activity and reduced risk of colon cancer: implications for prevention. *Cancer Causes Control* 1997; 8: 649-667.
- Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Fuchs C, Rosner BA, Speizer FE, Willett WC. Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in The Nurses' Health Study. *Ann Intern Med* 1998; 129: 517-524.
- Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Alcohol, low-methionine-low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 265-273.
- Stern LL, Mason JB, Selhub J, Choi SW. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 849-853.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-113.
- Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, Bostick R, Fosdick L, Beresford SA, Yasui Y, Potter JD. Lack of association between the C677T MTHFR polymorphism and colorectal hyperplastic polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 427-433.
- Marugame T, Tsuji E, Inoue H, Shinomiya S, Kiyohara C, Onuma K, Hamada H, Koga H, Handa K, Hayabuchi H, Kono S. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and risk of colorectal adenomas. *Cancer Lett* 2000; 151: 181-186.
- Chen J, Giovannucci E, Hankinson SE, Ma J, Willett WC, Spiegelman D, Kelsey KT, Hunter DJ. A prospective study of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase gene polymorphisms, and risk of colorectal adenoma. *Carcinogenesis* 1998; 19: 2129-2132.
- Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 513-518.
- Park KS, Mok JW, Kim JC. The 677C>T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and colorectal cancer risk. *Genet Test* 1999; 3: 233-236.
- Pereira P, Stanton V, Jothy S, Tomlinson IP, Foulkes WD, Rozen R. Loss of heterozygosity of methylenetetrahydrofolate reductase in colon carcinomas. *Oncol Rep* 1999; 6: 597-599.
- Kim YI. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: a paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutr Rev* 2000; 58: 205-209.
- González Medina G. Estudios de casos y controles o retrospectivos. En: *Epidemiología*. México: Addison-Wesley Iberoamericana; 1986: 101-110.
- 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.
- Kang S-S, Wong PWK, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 536-545.
- Engbersen AMT, Franken DG, Boers GHJ, Stevens FMB, Tribels FLM, Blom HJ. Thermolabile 5, 10-methyltetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 142-150.
- Cardo E, Monros E, Colome C, Artuch R, Campistol J, Pineda M, Vilaseca MA. Children with stroke: polymorphism of the MTHFR gene, mild hyperhomocysteinemia, and vitamin status. *J Child Neurol* 2000; 15: 295-298.
- Nathalie MJ, Regine PM, Steegers T, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995; 346: 1070-1071.
- Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, Morgan G. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12810-12815.
- Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, Bostick R, Fosdick L, Beresford SA, Yasui Y, Potter JD. Colorectal adenomas and the C677T MTHFR polymorphism: evidence for gene-environment interaction? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 659-668.
- Bailey LB, Gregory JF 3rd. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr* 1999; 129: 919-922.