

## ARTÍCULOS ORIGINALES

### Factores determinantes del estado nutricional del folato y el rol de la variante genética C677T de la enzima metileno tetrahydrofolato reductasa (MTHFR)

### Determinants of folate nutritional status and the role of the genetic variation of C677T methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) enzyme

#### ABSTRACT

Folate is an essential nutrient because mammals lack biological activity to synthesize. It different factors generate folate deficiency. Recent studies have identified that the C677T variant of the enzyme methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR), can play a role in serum folate concentrations (SFC) and red cell folate (RCF). The aim of this review was to actualize some generalities of folate metabolism, factors related to its deficiency, biochemical indicators used to assess the nutritional status of folate and role of the C677T polymorphism of the MTHFR enzyme on the cycle of folate and methionine. It is necessary to design studies with representative samples corroborating the effect of polymorphisms on biochemical indicators of nutritional status of folate and determine the dose-response effect and contribute to modify the nutritional recommendations with the necessary scientific evidence.

**Keywords:** Methylene tetrahydrofolate reductase, serum folate, red cell folate, folate blood

Julián Herrera M.  
Angélica M. Muñoz  
Beatriz E. Parra S.

Grupo de investigación en Alimentación y Nutrición Humana (GIANH)  
Universidad de Antioquia UdeA. Medellín-Colombia.

Dirigir la correspondencia a:  
Profesor  
Julián Herrera Mejía  
Calle 62 # 52 – 59, Sede de Investigación Universitaria,  
Laboratorio 413, Alimentación y Nutrición Humana,  
Universidad de Antioquia,  
Medellín, Colombia.  
Teléfono: 2196498  
e-mail: julian.nutricion@gmail.com

Este trabajo fue recibido el 5 de Marzo de 2016  
y aceptado para ser publicado el 5 de Septiembre de 2016.

#### INTRODUCCIÓN

El folato es un nutriente esencial debido a que los mamíferos carecen de actividad biológica para sintetizarlo (1), por lo cual es necesario obtenerlo a partir de la dieta. Bajas ingestas de alimentos fuente pueden condicionar la aparición de su deficiencia, sin embargo, factores ambientales y genéticos juegan un papel importante en la regulación de esta vitamina y sus coenzimas (2). El folato participa en la formación de bases nitrogenadas del ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN) (3–5), la metilación de genes y la síntesis de proteínas (6), por lo que se convierte en un nutriente de interés para promover la salud y prevenir enfermedades. A las mujeres en edad reproductiva y gestantes, se les recomienda una dosis suplemental de esta vitamina para prevenir los defectos del

tubo neural (DTN) (3–6), malformaciones congénitas y espina bífida en el neonato (7) y para disminuir los déficits cognitivos y trastornos conductuales durante la infancia. La deficiencia de folato genera disminución en las concentraciones sérica e intraeritrocitaria de este micronutriente y un aumento en los niveles de homocisteína (4,5), un aminoácido azufrado que se asocia con enfermedad cardiovascular, la cual se constituye como la principal causa de mortalidad en el mundo según lo declara la Organización Mundial de la Salud (OMS) (8).

Existe evidencia científica que demuestra que la presencia de polimorfismos en genes que codifican proteínas y enzimas del metabolismo del folato, pueden afectar los indicadores bioquímicos del estado nutritivo de esta vitamina en humanos. La metileno tetrahydrofolato reductasa (MTHFR), es una enzima

que ha sido ampliamente estudiada por su asociación con los niveles de homocisteína y de folato en sangre (folato sérico/plasmático y eritrocitario) (9).

En esta revisión se detallan algunas generalidades del folato y su metabolismo, los factores relacionados con la deficiencia de esta vitamina y los indicadores bioquímicos útiles, en la evaluación del estado nutricional del folato. Además, de la enzima MTHFR, y su papel en el ciclo del folato y de la metionina, las características del gen que codifica esta enzima y los efectos del polimorfismo C677T sobre el folato sanguíneo.

La búsqueda bibliográfica se realizó en las bases de datos de Pubmed y ScienceDirect, utilizando los términos: "folate metabolism", "folate nutritional status", "risk factors of folate deficiency", "reference values of folate nutritional status", "methylene tetrahydrofolate reductase and serum folate", "MTHFR and serum folate", "methylene tetrahydrofolate reductase and red blood cell folate (RBCF)", "MTHFR and red blood cell folate (RBCF)". Se seleccionaron artículos originales o revisiones de tema, publicados entre los años 2005 y 2015, que abordaran las temáticas de interés. Artículos de mayor antigüedad, fueron citados por su relevancia científica.

#### FOLATO: ESTRUCTURA QUÍMICA Y GENERALIDADES

Folacina es un término empleado para referirse a compuestos con estructura química y funciones biológicas similares a las del folato, conocido como la vitamina B9. Tres compuestos fundamentales integran esta vitamina, a saber: 2-amino

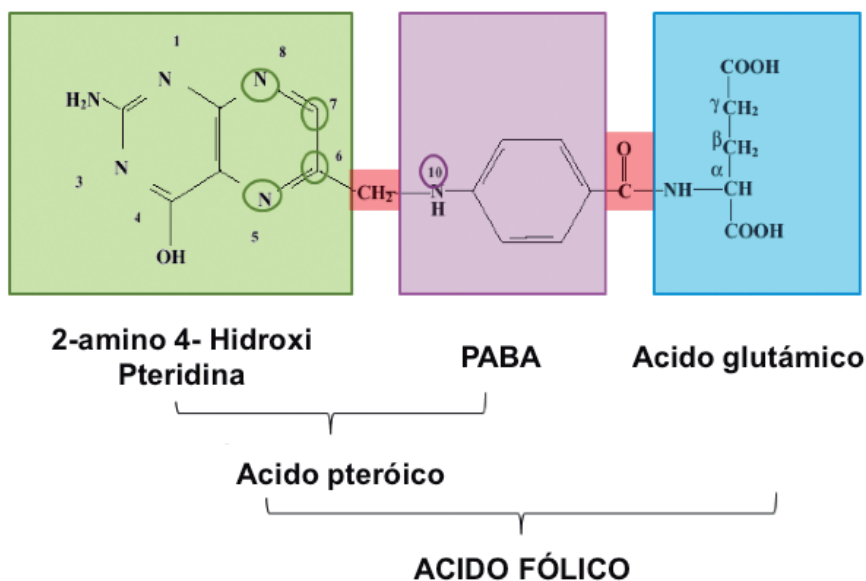
4-hidroxipteridina (pteridina o pterina), el ácido para-amino benzoico (PABA, por sus iniciales en inglés) y una terminación conformada por uno o varios residuos de glutamato. La unión entre el anillo de pteridina y el PABA, por medio de un puente metileno, forma el ácido pteróico y la unión de éste con el glutamato, mediante un enlace peptídico, forman el ácido fólico (5) (figura 1).

Es importante resaltar que los humanos carecen de la enzima dihidropteroato sintetasa que cataliza la unión entre el anillo pteridina y el PABA. El estado de oxidación, el número de residuos de glutamato constitutivos de la estructura y su procedencia, son elementos clave para identificar las diferencias específicas entre el folato dietario y el ácido fólico.

El término "folato dietario" se refiere a la forma reducida de la vitamina con presencia de dos a cuatro átomos de hidrógeno en los nitrógenos de las posiciones 5 y 8 y los carbonos de las posiciones 6 y 7 del anillo pteridina, formando dihidrofolato o tetrahydrofolato, respectivamente. Además, una larga cadena de residuos del aminoácido glutamato (poliglutamatos), siendo la forma como se encuentra en los alimentos naturales. En contraste, el término "ácido fólico" alude a la forma sintética de la vitamina, empleada para fortificación de alimentos y elaboración de suplementos. Es la forma más oxidada de la vitamina, carece de la presencia de átomos de hidrógeno y posee únicamente un glutamato terminal (monoglutamato) (1); estas características le confieren a la vitamina mayor estabilidad químico-estructural

FIGURA 1

Ácido fólico, conformado por el anillo de pteridina o 2-amino,4-hidroxi pteridina (recuadro verde), el ácido para-amino benzoico- PABA- (recuadro lila) y el ácido glutámico o aminoácido glutamato (recuadro azul).



La unión entre los dos primeros componentes por medio de un puente metileno forman el ácido pteróico y la unión del ácido pteróico con un residuo de glutamato por un enlace peptídico, forman el ácido fólico. Los nitrógenos en las posiciones 5 y 10 son los aceptores y donadores de los compuestos monocarbonados. Los nitrógenos en las posiciones 5 y 8 y los carbonos en las posiciones 6 y 7, sirven para la incorporación de átomos de hidrógeno y la reducción a las formas dihidrofolato y tetrahydrofolato. Modificado de (46).

por lo que posee una biodisponibilidad dos veces mayor, en comparación con el folato dietario (3).

**Metabolismo del folato:** digestión, absorción, transporte, funciones bioquímicas y almacenamiento.

Para que los poliglutamatos provenientes de las fuentes naturales (folatos dietarios), puedan ser absorbidos deben ser previamente hidrolizados en el lumen intestinal hasta convertirse en monoglutamatos mediante las enzimas folilpoli-glutamylcarboxipeptidasas, (también llamadas pteroilpoli-glutamato hidrolasas) provenientes de los jugos pancreáticos y de la sales biliares y las conjugasas dependientes de zinc se encuentran ancladas en la membrana apical de los enterocitos yeyunales (1).

Tras la hidrólisis, los monoglutamatos son captados por el enterocito mediante diversos mecanismos: uno saturable, dependiente de sodio (Na) y energía, que requiere de proteínas transportadoras localizadas en la membrana apical, denominadas proteínas de unión al folato (FBP) o receptores de folato, los cuales permiten el ingreso de los monoglutamatos en su forma reducida; otro mecanismo requiere de una proteína llamada "transportador de folato reducido" (RFT, RFC o FOLC) (1,3), que participa también en la captación de folatos por los enterocitos y células inmunológicas. Además, se ha descrito un sistema absorción por difusión tras la ingesta de dosis farmacológicas (10). Al interior del enterocito las formas oxidadas de folato son reducidas mediante la incorporación de átomos de hidrógeno en el anillo pteridina para obtener el tetrahidrofolato (THF), se transfieren grupos de un carbono en las posiciones 5 y 10 del ácido pterídico, formando diferentes coenzimas necesarias para procesos metabólicos específicos (1). El transporte de folatos desde el enterocito hacia el torrente sanguíneo, requiere de proteínas transportadoras ubicadas en la membrana basolateral, que permiten la salida de diferentes coenzimas siendo la 5-metiltetrahidrofolato (5m-THF) la más abundante. El transporte sanguíneo se lleva a cabo mediante proteínas de unión al folato y en menor medida por la prealbúmina, albúmina y  $\beta$ -2 macroglobulina (1), las cuales dirigen las coenzimas hacia los tejidos hepático y extrahepáticos para su ingreso por medio de receptores de folato y sistemas de difusión. Al interior de las células, los dihidrofolatos son hidrogenados para formar tetrahidrofolatos y estos a su vez son conjugados con residuos de glutamato (1,11). La formación de poliglutamatos es necesaria para el almacenamiento intracelular y aumentar la afinidad por las enzimas que participan en el ciclo del folato y la metionina. En el espacio intracelular, el folato se encuentra tanto en el citoplasma como en la mitocondria donando o recibiendo unidades monocarbonadas. La disponibilidad del folato es particularmente indispensable en tejidos que experimentan intercambio celular continuo, dado que a partir de él se obtienen bases nitrogenadas, aminoácidos y S-adenosin metionina (SAM), identificado como el principal compuesto que dona grupos metilo para el ADN.

**Evaluación del estado nutricional del folato:** factores determinantes, indicadores bioquímicos y puntos de corte.

Según la OMS (12), la deficiencia de folato incrementa el riesgo de diferentes enfermedades y se asocia con efectos negativos para la salud humana en todos los grupos etarios. Además, es una de las principales causas de anemia macrocítica en el mundo (13).

Las bajas ingestas de folato en la dieta, constituyen la principal causa de deficiencia lo cual limita a las células para

el mantenimiento de las funciones biológicas que requieren de este nutriente (14). Sin embargo, conocer con precisión la ingesta de folatos es difícil, dado que las prácticas de cocción disminuyen sustancialmente la cantidad de folatos en los alimentos. Junto a ello, las herramientas metodológicas enfocadas a la evaluación de ingesta dietaria más utilizadas, dependen estrictamente de la memoria de los individuos, lo cual genera un sesgo importante en la determinación exacta del consumo de nutrientes.

Existen otros factores relacionados con el balance negativo del folato. Se ha demostrado que el consumo de tabaco (15) y de bebidas alcohólicas (14), disminuye las concentraciones de folato en sangre y aumenta los niveles de homocisteína en comparación con quienes no consumen estas sustancias. Entre los consumidores, estos efectos pueden estar relacionados con las prácticas alimentarias inadecuadas reportadas por algunos investigadores (14,15). Existe evidencia que demuestra que el alcohol afecta la conversión de poliglutamatos a monoglutamatos en el lumen intestinal y su captación por el enterocito (16). Además, los problemas de malabsorción pueden generar disminución en las concentraciones séricas de esta vitamina (17).

Se conoce que ciertos medicamentos pueden afectar los niveles circulantes de folato. Se ha demostrado que los anticonceptivos orales puede ocasionar deficiencias de la vitamina (18). La utilización del metotrexato, medicamento inmunomodulador utilizado para el manejo sintomático de diversas patologías, disminuye la captación de folatos debido a la inhibición competitiva por similitud en su estructura química (3).

En una investigación derivada del Inter99 study, llevada a cabo en 6784 hombres y mujeres entre los 30 y 60 años pertenecientes al suroeste de Copenhague, se determinaron los factores genéticos y de estilo de vida relacionados con los niveles de folato. Los resultados mostraron que un tercio de la muestra (31,4%) presentó bajas concentraciones de folato sérico (FS) (<6,8nmol/L) y 5,1% presentó deficiencia (FS<4nmol/L). Además, se encontró una asociación positiva entre la edad de los participantes y la deficiencia de folato. El modelo de regresión demostró que las bajas concentraciones de FS y la deficiencia de folato se asociaron significativamente con dietas no saludables, exceso de peso corporal (sobrepeso y obesidad medido por IMC), bajos niveles de actividad física, ingesta de alcohol y el consumo diario de café/cigarrillo y variantes genéticas de la enzima MTHFR (2)

Por lo anterior, es necesario fortalecer los sistemas de monitoreo y evaluación para identificar los grupos poblacionales que presentan riesgos potenciales para desarrollar déficit de folato, mediante la utilización de biomarcadores que permitan evaluar oportunamente el estado nutricional de esta vitamina. Los indicadores bioquímicos empleados hasta la fecha, incluyen medición directa del folato en orina, suero, plasma o células rojas y se utilizan gran variedad de técnicas que incluyen métodos microbiológicos (19), radioisótopos de unión competitiva y ensayos de quimioluminiscencia (12); sin embargo, existen divergencias en la sensibilidad y especificidad entre las técnicas utilizadas. A la fecha se ha podido establecer que los ensayos microbiológicos, son los más recomendados para obtener resultados comparables entre diferentes países (20).

En el suero/plasma, el folato se encuentra principalmente en forma de 5m-THF y monoglutamato; mientras que en los glóbulos rojos se encuentra predominantemente, en forma de poliglutamatos (19). El FS es un indicador altamente sensible a la ingesta reciente de folato (21). Por tal motivo, una me-

dición aislada de este parámetro es insuficiente para evaluar las reservas de folato; sin embargo, mediciones repetidas en el tiempo en un individuo podrían reflejar apropiadamente las tendencias del estado nutricional de este nutriente (21).

La vida media de un eritrocito es equivalente al periodo de tiempo en el cual los depósitos de folato son mantenidos en el hígado, por tal motivo, una disminución de folato hepático genera paralelamente una disminución en los niveles del folato eritrocitario (FE), el cual es considerado como el biomarcador más preciso y adecuado para evaluar el estado nutricional de esta vitamina (14). También se utilizan indicadores indirectos del estado del folato a través de la determinación de metabolitos generados en las vías metabólicas previamente mencionadas, siendo la homocisteína la de mayor utilización en la clínica.

Los puntos de corte para la evaluación del folato sérico y eritrocitario fueron propuestos inicialmente el año 1968, basados en las concentraciones en las cuales se hacía manifiesta la anemia macrocítica. Sin embargo, tras identificar débiles correlaciones entre las concentraciones de folato y la presencia de anemia macrocítica, se hizo necesario modificar los puntos de corte (12). Desde el año 2005 se han aceptado los propuestos por el estudio NHANES III; encontrando una asociación inversa entre los niveles de folato (sérico y eritrocitario) y los niveles de homocisteína (12,19). Recientemente, la OMS emitió los lineamientos en relación a las concentraciones óptimas de FE para mujeres en edad reproductiva con el fin de prevenir los defectos del tubo neural (20). Esta guía establece que el FE superior a 906 nmol/L sería el punto de corte en el cual se alcanza el menor riesgo de padecer DTN a nivel poblacional; por lo tanto es importante resaltar que los valores de FE sugeridos por la OMS hasta la fecha, no han sido evaluados en intervenciones individuales y que este valor no

se debe utilizar para predecir el riesgo individual, dado que no todos los casos de embarazos afectados por DTN pueden ser explicados por las bajas concentraciones de esta vitamina en las células rojas. Algunas desventajas del punto de corte definido por la OMS para prevenir DTN, son: no incluye a la población masculina, no permite predecir riesgos individuales, y sólo es útil a nivel poblacional, a la vez no existe un valor de folato en suero/plasma relacionado con la disminución de este fenómeno. Por lo que, la OMS recomienda conducir estudios que permitan asociar los niveles de FS y FE requeridos para minimizar los embarazos afectados por DTN en los diferentes países (12,20), para definir con mayor precisión los puntos de corte de estos biomarcadores y que estos a su vez, se relacionen con disminución de la anemia macrocítica y la hiperhomocisteinemia. Los puntos de corte del folato sérico y eritrocitario basados en las concentraciones de homocisteína, anemia macrocítica y prevención de defectos del tubo neural, se resumen en la tabla 1.

La hiperhomocisteinemia es la condición clínica caracterizada por un incremento de los niveles de homocisteína por encima de los rangos de adecuación para este metabolito. Sus concentraciones en plasma están determinadas por el estado nutricional de folato, la vitamina B12 y la vitamina B6. La asociación americana del corazón (American Heart Association) (22) define que los rangos de homocisteína en suero, deben estar entre 5-15  $\mu\text{mol/L}$ ; concentraciones entre 16-30  $\mu\text{mol/L}$  indican hiperhomocisteinemia moderada; entre 31-100  $\mu\text{mol/L}$  indican hiperhomocisteinemia intermedia y >100  $\mu\text{mol/L}$ , hiperhomocisteinemia severa. Por otra parte, la anemia macrocítica obedece a la condición en la cual los glóbulos rojos presentan un tamaño más elevado de lo normal y se determina en términos del volumen corpuscular medio (VCM) (23). El rango de adecuación para este índice eritrocitario oscila

TABLA 1

Puntos de corte para identificar deficiencia de folato en todos los grupos según niveles de homocisteína (A) y anemia macrocítica (B) y defectos del tubo neural (C).

A. Puntos corte para determinar deficiencia de folato en todos los grupos de edad utilizando la homocisteína como indicador metabólico (36)

| Indicador del folato     | Punto de corte que indica deficiencia de folato ng/mL (nmol/L**) |
|--------------------------|--|
| Folato sérico/plasmático | <4 (<10)   |
| Folato eritrocitario     | <151 (<340)  |

B. Puntos corte para determinar deficiencia de folato en todos los grupos de edad utilizando la anemia macrocítica como indicador hematológico (36)

| Folato sérico ng/mL (nmol/L) | Folato eritrocitario ng/mL (nmol/L**) | Interpretación      |
|------------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| >20 (>45,3)                  | ND†                                   | Elevado             |
| 6 - 20 (13,5 - 45,3)         | ND†                                   | Normal              |
| 3 - 5,9 (6,8 - 13,4)         | ND†                                   | Posible deficiencia |
| <3 (<6,8)                    | < 100 (<226,5)                        | Deficiencia         |

C. Puntos corte para determinar riesgo en los defectos del tubo neural (DTN) en mujeres en edad reproductiva (20)

| Indicador del folato     | Punto de corte que indica insuficiencia de folato ng/mL (nmol/L**) |
|--------------------------|--|
| Folato sérico/plasmático | No determinado   |
| Folato eritrocitario     | $\leq 400$ ( $\leq 906$ )  |

\*\* Factor de conversión: 1ng/mL = 2,265 nmol/L

† ND: No determinado

Tabla modificada de: World Health Organization. Serum and red blood cell folate concentrations for assessing folate status in populations. 2012.

entre 80 y 100 fL. Todo valor por encima del mismo indica la presencia de macrocitosis. Tanto la deficiencia de folato como de vitamina B12 pueden generar cambios morfológicos y funcionales en los eritrocitos generando células inmaduras de mayor tamaño. Por todo lo anterior, la hiperhomocisteinemia y la anemia macrocítica se denominan indicadores indirectos del estado del folato. Su interpretación debería ir acompañada de otros indicadores bioquímicos, como el FS medido repetidamente o el FE, dado que otros déficits nutricionales específicos pueden afectar el comportamiento biológico de estos parámetros.

La enzima metileno tetrahidrofolato reductasa y su importancia en el ciclo del folato y la metionina:

El gen de la MTHFR, codifica una proteína de 656 aminoácidos con una masa molecular estimada de 74,5 kDa (24), localizado en la región p36.3 del cromosoma 1 cuya secuencia complementaria del ADN cuenta con una longitud de 22 kb y 11 exones (7).

Hablar de la enzima MTHFR, implica conocer el ciclo del folato y su integración con el ciclo de la metionina; (figura 2). En el ciclo del folato, esta vitamina transfiere y recibe compuestos químicos de solo un carbono (25) a través de los cuales se obtienen diferentes coenzimas requeridas para la obtención de compuestos que funcionan como sustratos para otras reacciones enzimáticas de gran importancia en la biología celular. Del folato proveniente de fuentes dietarias se obtiene

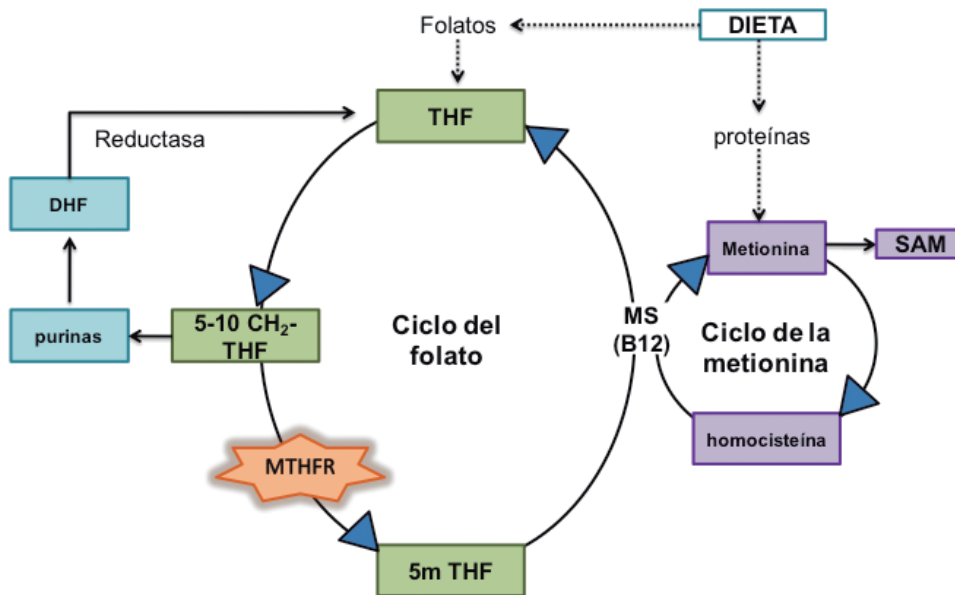
el THF al interior del hepatocito y células extrahepáticas. Este compuesto es convertido en 5,10 metileno tetrahidrofolato (5,10 CH<sub>2</sub>-THF) (4,6) tras diferentes modificaciones enzimáticas. Posteriormente, gracias a la actividad reductasa de la Metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR), el 5,10 CH<sub>2</sub>-THF es convertido en 5-metil tetrahidrofolato (5m-THF) (3,6,25), siendo la única vía al interior del ciclo que permite obtener esta coenzima. En una reacción posterior, el 5m-THF es desmetilado y convertido nuevamente en THF, cuya reacción es catalizada por la enzima metionina sintasa. Es importante resaltar que el 5m-THF es un sustrato fundamental para reabastecer a la célula de THF y dar origen a un nuevo ciclo; esto permite el reciclaje y optimización de la vitamina por parte de las células. En integración con el ciclo de la metionina, el 5m-THF dona su grupo metilo a la cobalamina la cual actúa como cofactor de la metionina sintasa para permitir finalmente, la remetilación de la homocisteína a metionina (4), el cual es sustrato para obtener S-adenosil metionina (SAM) (6,25) un compuesto identificado como el metilador por excelencia del ADN (4,25), que posee la capacidad de transferir grupos metilo (CH<sub>3</sub>) a las islas CpG (citocinas precedidas de guanina) (25) e histonas para regular la expresión génica (6).

Variantes de la MTHFR y su asociación con el estado nutricional del folato:

Como se mencionó previamente, la enzima MTHFR participa en la conversión del 5,10 CH<sub>2</sub>-THF en 5m-THF, por medio

FIGURA 2

Ciclos del folato y de la metionina: integración de coenzimas del folato, vitaminas y enzimas.



El esquema central, identificado con recuadros verdes, resume el ciclo del folato; la enzima Metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR), cataliza la reacción que convierte 5,10 CH<sub>2</sub>-THF en 5-mTHF. Los recuadros azules, de la izquierda, representan la síntesis de purinas a partir de 5,10 CH<sub>2</sub>-tetrahidrofolato (THF) y la posterior obtención de THF a partir de los dihidrofolatos (DHF). Los recuadros lila, de la derecha, representan el ciclo de la metionina y su importancia en la formación del S-adenosil metionina (SAM).

de una reacción unidireccional e irreversible (4,25). Aunque son muchas las moléculas implicadas en los ciclos del folato y la metionina, los polimorfismos del gen de la MTHFR han sido de gran interés por las asociaciones encontradas con indicadores bioquímicos del estado del folato y la homocisteína (26–31).

En el año 1991 Kang y cols (32), reportaron por primera vez la presencia de un polimorfismo que daba origen a una enzima "termolábil" capaz de aumentar el riesgo de enfermedad coronaria asociada al incremento en las concentraciones de homocisteína. Desde entonces se han demostrado asociaciones estadísticas entre los polimorfismos de esta enzima y las concentraciones de folato y homocisteína. A la fecha, la variante más estudiada es la 677 C→T, que consiste en la sustitución del aminoácido alanina por valina. La combinación alélica homocigótica C/C representa el genotipo silvestre, la combinación heterocigótica C/T y la homocigótica T/T, representan genotipos que originan enzimas con disminución de su actividad reductasa en 30 y 60% respectivamente (3). En síntesis, la condición homocigótica T/T produce una enzima con alto grado de termolabilidad (6). Llama la atención que las frecuencias genotípicas asociadas a la disminución de la actividad reductasa de la enzima MTHFR, alcanzan porcentajes poblacionales elevados. En la tabla 2 se observan las frecuencias alélicas y genotípicas reportadas por diversos investigadores en diferentes grupos poblacionales evaluados.

Datos obtenidos del Inter99 study, demostraron que la variante génica C677T de la MTHFR se asoció significativamente con el FS y que particularmente el genotipo homocigótico T/T, aumentó en 2,24 veces la probabilidad de presentar bajas concentraciones de folato (IC95%=1,85 – 2,70, p<0,001) (2).

Un meta-análisis evaluó la asociación entre este polimor-

fismo y las concentraciones de folato sanguíneo, encontrando diferencias significativas en las concentraciones de folato entre los genotipos (CC>CT>TT) (33). Algunos investigadores han mostrado que a pesar de las diferencias en las concentraciones de folato sanguíneo entre los genotipos (34,35), las medias de este indicador no estuvieron por debajo de los valores de referencia (33), indicativos de riesgo clínico para hiperhomocisteína y/o anemia macrocítica según los criterios de la OMS y NANHESIII (20,36). Otros estudios analizados en el meta-análisis (33) mostraron que independiente del genotipo, las concentraciones de FE estuvieron por debajo del punto de corte recomendado para la prevención de los DTN, según los últimos lineamientos de la OMS (20), siendo significativamente más bajas en aquellas mujeres con genotipo TT, lo cual podría implicar un riesgo mayor de desarrollar alteraciones de salud y posiblemente requerir más cantidad de folatos. Yakub y cols (2012), mostraron que las combinaciones C/T+T/T pueden aumentar la probabilidad de deficiencia de folato (OR; IC 95%: 4,84; 2,80–8,37) en comparación con el genotipo silvestre (35).

Otros estudios han sido diseñados para evaluar el efecto de la ingesta de folato sobre los indicadores bioquímicos del estado nutricional de esta vitamina, en el contexto de los polimorfismos de la enzima MTHFR. Nishio y cols (37), publicaron un estudio en el cual se exploró la asociación entre la ingesta de folato ajustado por energía y los niveles de FS y FE de acuerdo al genotipo de la MTHFR C677T en 170 japoneses sanos entre los 20 y 75 años. Los análisis de regresión lineal mostraron asociación positiva (p<0,05) entre la ingesta de folato y sus concentraciones plasmáticas en individuos con genotipos CC y CT. En los portadores del genotipo TT esta asociación no

TABLA 2

Frecuencias genotípicas de la variante C677T de la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa, en diferentes grupos poblacionales.

| Nacionalidad      | n               | Año  | Prevalencias genotípicas del polimorfismo C677T (%) |       |                  |          |
|-------------------|-----------------|------|---|-------|------------------|----------|
|                   |                 |      | C/C (Silvestre)                                     | C/T   | T/T (termolábil) | C/T + TT |
| Japonesa (34)     | 192             | 2012 | 37,6  | 46,4  | 16,1             | 62,5     |
| India (47)        | 199 casos       | 2012 | 66,3  | 32,2  | 1,5              | 33,7     |
|                   | 200 controles   |      | 77,5  | 22,0  | 0,5              | 22,5     |
| Libanesa (48)     | 233             | 2012 | 45,1  | 43,3  | 11,6             | 54,9     |
| Pakistaní (35)    | 872             | 2012 | 71,3  | 26,2  | 2,5              | 28,7     |
| Singapurense (28) | 273 (chinas)    | 2010 | 51,3  | 42,5  | 6,2              | 48,7     |
|                   | 127 (indias)    |      | 75,6  | 24,4  | 0,0              | 24,4     |
|                   | 156 (malayas)   |      | 80,1  | 18,6  | 1,3              | 19,9     |
| Colombiana (7)    | 206             | 2010 | 26,7  | 62,1  | 11,2             | 73,3     |
| Argelina (49)     | 100             | 2008 | 45,0  | 49,0  | 6,0              | 55,0     |
| Europea (39)      | 614             | 2008 | 45,0  | 43,6  | 11,4             | 55,0     |
| Colombiana (50)   | 93 casos        | 2008 | 40,8  | 46,24 | 12,9             | 59,14    |
|                   | 206 controles   |      | 45,1  | 40,3  | 14,6             | 54,9     |
| Japonesa (37)     | 170             | 2008 | 35,3  | 52,9  | 11,8             | 64,7     |
| Checa (51)        | 591             | 2005 | 42,1  | 48,6  | 9,3              | 57,9     |
| Brasileña (52)    | 87 (Caucásicos) | 2004 | 42,3  | 45,9  | 11,8             | 57,7     |
|                   | 82 (Mulatos)    |      | 57,0  | 39,2  | 3,8              | 43,0     |
|                   | 40 (negros)     |      | 75,0  | 25,0  | 0,0              | 25,0     |
| Española (53)     | 83              | 2004 | 42,2  | 41,0  | 16,8             | 57,8     |

fue significativa ( $p=0,07$  y  $0,78$  antes y después del ajuste por energía, respectivamente) (37). Hung y cols, evaluaron el efecto de dos dietas controladas que contenían  $400$  y  $800 \mu\text{g}$  de folato derivados exclusivamente de fuentes naturales, en  $32$  mujeres sanas con el genotipo silvestre (C/C) y el termolábil (T/T) para la MTHFR C677T. Después de doce semanas de tratamiento con estas dietas, quienes consumieron  $800 \mu\text{g}$  presentaron  $67\%$  más FS y  $33\%$  más FE que aquellos quienes consumieron  $400 \mu\text{g}$  de folatos en la dieta ( $p=0,005$  para FS y  $p=0,001$  para FE respectivamente). La comparación según polimorfismos mostró que en las mujeres portadoras del genotipo TT que consumieron  $800 \mu\text{g}$  presentaron la concentración media de FE más baja en comparación con las portadoras del genotipo silvestre. Estos resultados sugieren que los individuos que presentan la condición homocigótica TT, quienes expresan la enzima MTHFR termolábil, tienen mayor susceptibilidad de presentar deficiencia de folato y posiblemente requieren una dosis superior de este nutriente para mejorar los indicadores bioquímicos de esta vitamina (38).

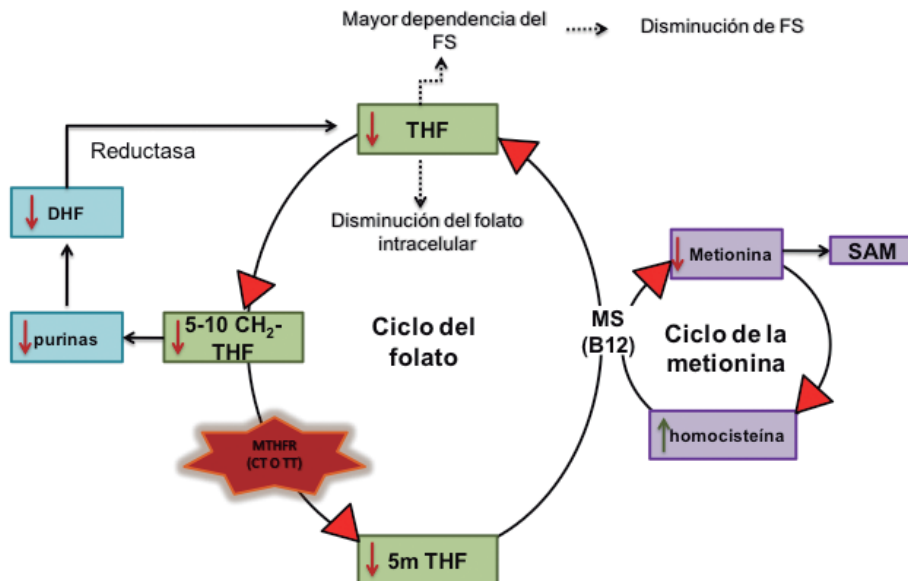
Existe evidencia científica que demuestra que las interacciones genéticas entre polimorfismos de diferentes genes implicados en el metabolismo del folato/metionina, son clave para identificar cambios en las concentraciones de FS y FE. Al respecto, Summers y cols (2008) evaluaron el efecto del polimorfismo de la enzima cistationina  $\beta$  sintasa (CBS) 844ins68 sobre el FS y homocisteína en  $614$  individuos sanos, teniendo en cuenta los genotipos de la MTHFR C677T. El polimorfismo

en el gen de la CBS, consiste en una inserción de  $68$  pares de bases (pb), que genera una duplicación en los límites exón-intrón en la región codificante del exón 8 (40). Estos investigadores concluyeron que no hubo diferencias en los niveles de FS ( $p=0,23$ ) entre los portadores (W/I-I/I) y no portadores de la inserción (W/W). Sin embargo cuando se analizó el polimorfismo de la CBS en el contexto de la MTHFR C677T, observaron que los individuos portadores de la inserción y que además presentaban el polimorfismo termolábil (TT) de la MTHFR, tuvieron concentraciones de FS más altas en comparación con aquellos individuos no portadores ( $p=0,045$ ). Estos resultados en conjunto sugieren que las interacciones entre polimorfismos de las enzimas del ciclo del folato/metionina, podrían jugar un papel importante en la regulación de los indicadores bioquímicos del estado nutricional de esta vitamina y que portar la inserción en el gen de la CBS podría ser un factor protector en quienes expresan la enzima MTHFR termolábil (37).

No existe información sobre los efectos bioquímicos que expliquen cómo la enzima MTHFR termolábil genera disminución en las concentraciones de FS y FE. Hipotetizamos que una disminución en la actividad enzimática de la MTHFR, genera una reducción en las concentraciones intracelulares de la coenzima 5m-THF; uno de los sustratos que reabastece a la célula de THF lo cual podría explicar los bajos niveles de FE referidos en la literatura. Las bajas concentraciones de THF pueden reducir la generación de 5,10  $\text{CH}_2$ -THF y afectar la síntesis de purinas

FIGURA 3

Efectos de la enzima metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) termolábil, sobre indicadores bioquímicos del estado del folato: metabolismo hepático o eritrocitario.



La enzima MTHFR termolábil (<30-60% actividad), se representa con una estrella roja. Las flechas de punta roja representan las vías posiblemente afectadas. Las flechas negras intermitentes, son utilizadas para explicar los efectos sobre las concentraciones de folato sérico (FS) y Folato eritrocitario (FE).

y por consiguiente, la formación de THF a partir de DHF por medio de esta vía. Aunque a partir de la síntesis de purinas se puede obtener THF, es importante considerar que esta vía ocurre principalmente en células o tejidos que experimentan recambio celular permanente. El hígado deposita y distribuye el folato a tejidos extrahepáticos, no posee esta característica de recambio, por lo tanto en los hepatocitos (y eritrocitos), esta vía se activa sólo ante la necesidad de aumentar la producción de nucleótidos para la síntesis de proteínas. Es poco probable que mediante estas vías alternas de obtención de THF, se logre normalizar la concentración de folato intracelular en individuos que presenten el genotipo T/T de la variante 677 C→T de la enzima MTHFR. Las bajas concentraciones de folato al interior de las células, podría aumentar su dependencia por el folato disponible en suero favoreciendo la rápida captación del mismo, lo cual podría explicar los bajos niveles de FS consistentemente identificados por diferentes investigadores. Respecto a las concentraciones de homocisteína, es biológicamente plausible considerar que la insuficiente concentración de la coenzima 5m-THF enlentece la remetilación de homocisteína a metionina, incrementando las concentraciones intracelulares de homocisteína y en consecuencia, las del plasma sanguíneo. La representación de los efectos de la enzima MTHFR termolábil en el hígado o eritrocitos sobre los niveles de FS, FE y homocisteína se resumen en la figura 3.

#### SITUACIÓN ACTUAL EN COLOMBIA

En Colombia, no se cuenta con estudios que describan la prevalencia de deficiencia de folatos en la población, siendo necesario para planificar, desarrollar, ejecutar y evaluar políticas públicas enfocadas hacia el mejoramiento del estado nutricional, la prevención y el control de la deficiencia de este micronutriente. Pese a la falta de información, el país cuenta con una política de fortificación de la harina de trigo con ácido fólico desde finales de la década de los 90, la cual establece la adición de 1500 µg de ácido fólico por cada Kg de producto (41). Se desconoce el efecto de dicha fortificación en el perfil epidemiológico asociado a la deficiencia de esta vitamina, como la anemia macrocítica, hiperhomocisteinemia, DTN, cáncer, entre otras. El año 2013 se publicaron las nuevas guías de práctica clínica para la prevención, detección temprana y tratamiento de las complicaciones del embarazo, parto o puerperio (42), las cuales recomiendan una suplementación diaria con 400 µg de ácido fólico tres meses previos a la concepción para prevenir los defectos del tubo neural, basada en estándares científicos. Sin embargo, se desconocen las concentraciones de FE en la etapa preconcepcional de las mujeres colombianas antes y después de la suplementación con estas dosis adoptadas por el ministerio de salud del país y sus beneficios en la población.

De acuerdo con las últimas encuestas de la situación nutricional del país (ENSIN 2005 – 2010)(43,44), los colombianos presentan bajas ingestas de folato en sus dietas. En el año 2005 se determinó que 75% de las mujeres entre 19 y 50 años consumió como máximo 308 µg de folatos por día (43). El año 2010, se demostró que sólo 50,5% de la población consumió frutas, 15,9% leguminosas y 9,6% verduras diariamente, alimentos considerados como principales fuentes de folato (44).

La prevalencia de los alelos de riesgo de la variante 677C→T de la enzima MTHFR (CT/TT), es alta en sujetos colombianos. Un estudio que incluyó a 152 personas mayores de 18 años, de diferentes ciudades del país, mostró que 65,8% de los individuos, portaban la enzima termolábil (TT=13,2% y

CT=52,6%) (45). Las bajas ingestas de folatos, la alta prevalencia de estos polimorfismos y la práctica de hábitos y estilos de vida no saludables, como el consumo de alcohol y cigarrillo, podrían generar un balance negativo de folato y aumentar el riesgo de hiperhomocisteinemia en nuestra población y los casos de morbi-mortalidad asociados.

#### CONCLUSIONES

El folato es un nutriente esencial dado que los humanos carecen la actividad enzimática para sintetizarlo; con funciones biológicas muy importantes como la regulación de la expresión génica, proliferación y supervivencia celular.

Diferentes indicadores bioquímicos son útiles para medir el estado nutricional del folato; el FS permite identificar las ingestas recientes de folato, mientras que el FE es utilizado para evaluar las reservas corporales de la vitamina. Los puntos de corte aceptados actualmente son definidos para evitar la hiperhomocisteinemia y en el caso de las mujeres los embarazos afectados por DTN, sin embargo los valores no son coincidentes.

Factores ambientales modificables como la dieta, el peso corporal, la actividad física, el consumo de sustancias psicoactivas, la ingesta de medicamentos y problemas de malabsorción afectan los biomarcadores del estado nutricional del folato. La susceptibilidad genética juega un papel determinante en la regulación del FS y FE. Varios polimorfismos se han asociado con las concentraciones de folato y homocisteína, siendo la variante C677T de la enzima MTHFR la más estudiada. La combinación homocigótica T/T, la cual genera una enzima termolábil, se ha asociado con bajos niveles de FS y FE y altas concentraciones de homocisteína. Las frecuencias alélicas de la variante y los factores de riesgo difieren entre regiones, por lo cual es necesario diseñar estudios con muestras representativas que corroboren el efecto de los polimorfismos sobre los indicadores bioquímicos del estado nutricional del folato y determinar el efecto dosis-respuesta y así contribuir con la evidencia científica necesaria para modificar las recomendaciones nutricionales.

#### RESUMEN

El folato es un nutriente esencial porque los mamíferos carecen de actividad biológica para sintetizarlo. Diferentes factores generar deficiencia de folato. Estudios recientes han identificado que la variante C677T de la enzima metileno tetrahydrofolato reductasa (MTHFR), puede jugar un papel en las concentraciones de folato sérico (FS) y eritrocitario (FE). El objetivo de este trabajo fue revisar algunas generalidades del folato, su metabolismo, los factores relacionados con su deficiencia, los indicadores bioquímicos utilizados para evaluar el estado nutricional del folato y el papel del polimorfismo C677T de la enzima MTHFR sobre el ciclo del folato y de la metionina. Es necesario diseñar estudios con muestras representativas que corroboren el efecto de los polimorfismos sobre los indicadores bioquímicos del estado nutricional del folato y determinar el efecto dosis-respuesta y así contribuir con la evidencia científica necesaria para modificar las recomendaciones nutricionales.

Palabras clave: Metileno tetrahydrofolato reductasa, folato sérico, folato eritrocitario, folato sanguíneo.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. *Screen G, Smith J, Groff J. Folate. In: advanced nutrition and human metabolism. Fifth. Canadá; 2010. p. 348–57.*
2. *Thuesen BH, Husemoen LL, Ovesen L, Jørgensen T, Fenger*



- M, Linneberg A. Lifestyle and genetic determinants of folate and vitamin B12 levels in a general adult population. *Br J Nutr*. 2010;103:1195–204.
3. Meshkin B, Blum K. Folate nutrigenetics: a convergence of dietary folate metabolism, folic acid supplementation, and folate antagonist pharmacogenetics. *Drug Metab Lett*. 2007;1(1):55–60.
  4. Bailey LB, Gregory JF. Folate Metabolism and Requirements. *J Nutr*. 1999;129:779–82.
  5. McNulty H, Pentieva K, Hoey L, Strain J, Ward M. Nutrition throughout life: folate. *Int J Vitam Nutr Res*. 2012;82(5):348–54.
  6. 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.
  7. Gonzáles-Galofre Z, Villegas V, Martínez-Agüero M. Preliminary population study of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T polymorphism determination in a pilot group of students from the University of Rosario. *Rev Cienc Salud*. 2010;8(1):7–21.
  8. Department of Health Statistics and Informatics, World Health Organization. Causes of death 2008: data sources and methods [Internet]. 2011. 1 - 28 p. Available from: [www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/cod\\_2008\\_sources\\_methods.pdf?ua=1](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/cod_2008_sources_methods.pdf?ua=1)
  9. Tsang BL, Devine OJ, Cordero AM, Marchetta CM, Mulinare J, Mersereau P, et al. Assessing the association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T polymorphism and blood folate concentrations: a systematic review and meta-analysis of trials and observational studies. *Am J Clin Nutr*. 2015;101(6):1286–94.
  10. Strum W, Nixon PF, Bertino JB, Binder HJ. Intestinal Folate Absorption. *J Clin Invest* Vol. 1971;50:1910–6.
  11. Oppenner S, Ross J, Koh W, Yuan J, Robien K. Genetic variation in folylpolyglutamate synthase and gamma-glutamyl hydrolase and plasma homocysteine levels in the Singapore Chinese Health Study. *Mol Genet Metab*. 2012;105(1):73–8.
  12. World Health Organization. Serum and red blood cell folate concentrations for assessing folate status in populations [Internet]. 2012. 1 - 6 p. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75584/1/WHO\\_NMH\\_NHD\\_EPG\\_12.1\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75584/1/WHO_NMH_NHD_EPG_12.1_eng.pdf)
  13. Joyce K, Cheryle S. Evaluation of Macrocytosis. *Am Fam Physician*. 2009;79:203–8.
  14. Bailey LB. Folate Status Assessment. *J Nutrition*. 1990;120:1508–11.
  15. Okumura K, Tsukamoto H. Folate in smokers. *Clin Chim Acta*. 2011;412:521–6.
  16. Halsted CH, Villanueva JA, Devlin AM, Chandler CJ. Metabolic Interactions of Alcohol and Folate. *J Nutr*. 2002;132:2367S – 72S.
  17. Valente FX, Campos TN, Moraes LF, Hermsdorff HH, Cardoso L de M, Pinheiro-Sant'Ana HM, et al. B vitamins related to homocysteine metabolism in adults celiac disease patients: a cross-sectional study. *Nutr J*. 2015;14:110.
  18. Mountifield J. effects of oral contraceptive usage on B12 and Folate Levels. *Can Fam Physician*. 1985;31:1523–5.
  19. Shane B. Folate status assessment history : implications for measurement of biomarkers in NHANES. *Am J Clin Nutr*. 2011;94(1):337S – 342S.
  20. World Health Organization. WHO. Guideline: optimal serum and red cell folate concentrations in women of reproductive age for prevention of neural defects. 2015. p 1 - 38.
  21. Green R. Indicators for assessing folate and vitamin B-12 status and for monitoring the efficacy of intervention strategies. *Am J Clin Nutr*. 2011;94:666S – 672S.
  22. Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM. Homocyst(e)ine, Diet, and Cardiovascular Diseases : A Statement for Healthcare Professionals From the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation*. 1999;99(1):178–82.
  23. Aslinia F, Mazza JJ, Yale SH. Megaloblastic anemia and other causes of macrocytosis. *Clin Med Res*. 2006;4(3):236–41.
  24. Shahzad K, Hai A, Ahmed A, Kizilbash N, Alruwaili J. A Structured-based Model for the Decreased Activity of Ala222Val and Glu429Ala Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Mutants. *Bioinformatics*. 2013;9(18):929–36.
  25. Zeisel SH. Epigenetic mechanisms for nutrition determinants of later health. *Am J Clin Nutr*. 2009;89:1488–93.
  26. Bermúdez M, Briceño I, Gil F, Bernal J. Homocysteine and polymorphisms of cystathionine synthase and methylenetetrahydrofolate reductase in a healthy population from Colombia. *Colomb Med*. 2006;37:46–52.
  27. Devlin AM, Clarke R, Birks J, Evans JG, Halsted CH. Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine concentrations in a healthy elderly population. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(3):708–13.
  28. Chen C, Gan YY. The allele frequencies of three polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism in a group of unrelated healthy Singaporeans. *Dis Markers*. 2010;29(2):111–9.
  29. Ho V, Massey TE, King WD. Effects of methionine synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on markers of one-carbon metabolism. *Genes Nutr*. 2013;8(6):571–80.
  30. Clifford AJ, Chen K, Mcwade L, Rincon G, Kim S, Holstege DM, et al. Gender and SingleNucleotide Polymorphisms in MTHFR, BHMT, SPTLC1, CRBP2, CETP, and SCARB1 Are Significant Predictors of Plasma Homocysteine Normalized by RBC Folate in Healthy Adults. *J Nutr*. 2012;142:1764–71.
  31. Semmler A, Moskau S, Stoffel-Wagner B, Weller M, Linnebank M. The effect of MTHFR c.677C>T on plasma homocysteine levels depends on health, age and smoking. *Clin Invest Med*. 2009;32(6):E310–4.
  32. Kang SS, Wong PW, 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(3):536–45.
  33. Tsang BL, Devine OJ, Cordero AM, Marchetta CM, Mulinare J, Mersereau P, et al. Assessing the association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T polymorphism and blood folate concentrations : a systematic review and meta-analysis of trials and observational studies. *Am J Clin Nutr*. 2015;101(6):1186–94.
  34. Taguchi T, Mori H, Hamada A, Yamori Y, Mori M. Serum folate, total homocysteine levels and methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphism in young healthy female Japanese. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2012;21(2):291–5.
  35. Yakub M, Moti N, Parveen S, Chaudhry B, Azam I, Iqbal MP. Polymorphisms in MTHFR, MS and CBS genes and homocysteine levels in a Pakistani population. *PLoS One*. 2012;7(3):e33222.
  36. de Benoist B. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B 12 deficiencies. *Food Nutr Bull*. 2008;29(2):S238–44.
  37. Nishio K, Goto Y, Kondo T, Ito S, Ishida Y, Kawai S, et al.

- Serum Folate and Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T Polymorphism Adjusted for Folate Intake. *J Epidemiol.* 2008;18(3):125–31.
38. Hung J, Yang TL, Urrutia TF, Li R, Perry CA, Hata H, et al. Additional food folate derived exclusively from natural sources improves folate status in young women with the MTHFR 677 CC or TT genotype. *J Nutr Biochem.* 2006;17(11):728–34.
  39. Summers CM, Hammons AL, Mitchell LE, Woodside J V, Yarnell JWG, Young IS, et al. Influence of the cystathionine beta-synthase 844ins68 and methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphisms on folate and homocysteine concentrations. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(8):1010–3.
  40. Tsai MY, Bignell M, Schwichtenberg K, Hanson NQ. High prevalence of a mutation in the cystathionine beta-synthase gene. *Am J Hum Genet.* 1996;59(6):1262–7.
  41. Decreto por el cual se reglamenta la fortificación de la harina de trigo y se establecen las condiciones de comercialización, rotulado, vigilancia y control. Decreto 1944 de 1996. Diario oficial número 42.909, de 30 de octubre 1996 [Internet]. 1996. Available from: [https://www.invima.gov.co/images/stories/aliamentos/decreto\\_1944\\_1996.pdf](https://www.invima.gov.co/images/stories/aliamentos/decreto_1944_1996.pdf)
  42. Ministerio de Salud y Protección Social-Colciencias. Guías de Práctica Clínica para la prevención, detección temprana y tratamiento de las complicaciones del embarazo, parto o puerperio [Internet]. Bogotá; 2013. 1-83 p. Available from: [http://gpc.minsalud.gov.co/Documents/Guias-PDF-Recursos/Embarazo/GPC\\_Comple\\_Embarazo.pdf](http://gpc.minsalud.gov.co/Documents/Guias-PDF-Recursos/Embarazo/GPC_Comple_Embarazo.pdf)
  43. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, Profamilia, Instituto Nacional de Salud, Universidad de Antioquia, OPS. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional de Colombia-ENSIN-, 2005. 1st ed. Borda C, editor. Bogotá: Panamericana Firms e Impresos, S. A; 2006.p 229 - 261.
  44. Ministerio de la Protección Social, Profamilia, Instituto Nacional de Salud, Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. Encuesta de la situación Nutricional en Colombia 2010. 2nd ed. Matallana Torres H, editor. Bogotá: Da Vinci Editor & CÍA; 2010. p 268 -337.
  45. Romero C, Gomez A, Gómez P, Casas MC, Briceño I. C677T (RS1801133 ) MTHFR gene polymorphism frequency in a colombian population. *Colomb Med.* 2015;46:75–9.
  46. Pölönen I. Silage for Fur Animals: Preservation Efficiency of Formic Acid and Benzoic Acid in the Ensiling of Slaughterhouse By Products and their Subsequent Metabolism in Farmed Fur Animals. University of Helsinki; 2000.
  47. Gupta SK, Kotwal J, Kotwal A, Dhall A, Garg S. Role of homocysteine & MTHFR C677T gene polymorphism as risk factors for coronary artery disease in young Indians. *Indian J Med Res.* 2012;135(4):506–12.
  48. Mahfouz RA, Cortas NK, Charafeddine KM, Abdul RN, Saredidine DS, Kadi RH, et al. Correlation of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms with homocysteine metabolism in healthy Lebanese adults. *Gene.* 2012;504:175–80.
  49. Hambaba L, Abdessemed S, Yahia M, Laroui S, Rouabah F. Relationship between hyperhomocysteinemia and C677T polymorphism of methylene tetrahydrofolate reductase gene in a healthy Algerian population. *Ann Biol Clin.* 2008;66(6):637–41.
  50. Cardona H, Cardona-Maya W, Gómez JG, Castañeda S, Gómez JM, Bedoya G, et al. Relationship between Methylenetetrahydrofolate Reductase polymorphism and homocysteine levels in women with recurrent pregnancy loss: A nutigenetic perspective. *Nutr Hosp.* 2008;23(3):277–82.
  51. Veselá K, Pavlíková M, Janosíková B, Anđel M, Zvárová J, Hyánek J, et al. Genetic determinants of folate status in Central Bohemia. *Physiol Res.* 2005;54(3):295–303.
  52. Pereira AC, Schettert IT, Morandini Filho AA, Guerra-Shinohara EM, Krieger JE. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c677t gene variant modulates the homocysteine folate correlation in a mild folate-deficient population. *Clin Chim Acta.* 2004;340(1-2):99–105.
  53. Gutierrez Revilla JI, Pérez Hernandez F, Tamparillas Salvador M, Calvo Martín MT. Influence of biochemical and genetic factors on homocysteine concentrations. *An Pediatr.* 2004;60(3):215–21.