

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD XOCHIMILCO**

---

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL:

**“ESTUDIO DEL POLIMORFISMO C677T DEL GEN  
METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (*MTHFR*)  
EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE”**

PERTENECIENTE AL PROYECTO GENÉRICO:

“Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y  
productos biológicos”

ALUMNO: **Mariana Salgado Díaz**

MATRÍCULA: 2173028336

ASESORES: **Dr. Aurelio Jara Prado**

**Dr. José Francisco Miranda Hernández**

LUGAR DE REALIZACIÓN: Departamento de genética del Instituto Nacional  
de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”

FECHA DE INICIO Y TERMINACIÓN: Inicio 10 de Enero del 2022,  
Terminación 10 de Enero del 2023.

Marzo, 2023.



**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA “Dr. Manuel Velazco Suarez”**

**La presente investigación: “Estudio del polimorfismo C677T del gen metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) en pacientes con Esclerosis Múltiple”**

**Se desarrolló en el laboratorio de Genética, perteneciente al Departamento de Neurogenética del INNN bajo la dirección del Dr. Aurelio Jara Prado.**

## Contenido

I.	ABREVIATURAS.....	5
II.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
III.	ÍNDICE DE TABLAS.....	8
IV.	RESUMEN.....	9
1.	INTRODUCCIÓN.....	10
2.	MARCO TEÓRICO.....	11
2.1	<b>Esclerosis Múltiple (EM)</b> .....	11
2.1.1	<b>Epidemiología</b> .....	11
2.1.2	<b>Etiología</b> .....	12
2.1.3	<b>Inmunopatogénesis</b> .....	14
2.1.4	<b>Características clínicas</b> .....	15
2.1.5	<b>Clasificación</b> .....	16
2.1.6	<b>Diagnóstico</b> .....	17
2.1.7	<b>Tratamiento</b> .....	17
3.	Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).....	18
3.1	<b>Gen metilentetrahidrofolato reductasa (<i>MTHFR</i>)</b> .....	18
3.1.1	<b>Enzima metilentetrahidrofolato reductasa</b> .....	19
3.1.2	<b>Metabolismo en el que interviene</b> .....	19
3.1.3	<b>Polimorfismos de MTHFR</b> .....	21
3.1.4	<b>Prevalencia de C677T</b> .....	21
4.	JUSTIFICACIÓN.....	23
5.	OBJETIVOS.....	23
5.1	<b>Objetivo general</b> .....	23
5.1.1	<b>Objetivos específicos</b> .....	23
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1	<b>Selección de pacientes</b> .....	23
6.2	<b>Toma de muestra</b> .....	24
6.3	<b>Lisis celular y extracción de ADN</b> .....	24
6.3.1	<b>Cuantificación de ADN genómico (ADNg)</b> .....	25
6.4	<b>Electroforesis en gel de agarosa</b> .....	25
6.5	<b>Reacción en cadena de la polimerasa</b> .....	26
6.5.1	<b>Primers para amplificar el gen <i>MTHFR</i></b> .....	27

6.5.2	Mezcla de reacción para la PCR de punto final .....	27
6.5.3	Condiciones para PCR del gen <i>MTHFR</i> .....	28
6.6	Genotipificación por RFLP .....	28
6.6.1	Electroforesis de los productos de digestión.....	29
7.	RESULTADOS .....	30
7.1	Análisis electroforético de ADN genómico .....	30
7.2	Análisis espectrofotométrico del ADN genómico .....	30
7.3	Reacción en cadena polimerasa .....	30
7.4	Digestión enzimática .....	31
8.	DISCUSIÓN .....	34
9.	CONCLUSIÓN .....	36
10.	REFERENCIAS.....	37

## I. ABREVIATURAS

ABREVIATURA	
1-CC	Ciclo de un carbono
5- MTHF	5-metiltetrahidrofolato
5,10-MTHFR	5,10-metiltetrahidrofolato reductasa
ACD	Ácido cítrico / Citrato /Dextrosa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNg	Ácido Desoxirribonucleico genómico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido Ribonucleico
APC	Células presentadoras de antígenos
BBB	Barrera hematoencefálica
CBS	Cistationina $\beta$ -sintasa
CMN	Células mononucleares
CI	Comité de Investigación
CEI	Comité de Ética en Investigación
CTH	Cistationina $\gamma$ -liasa
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daños
DC	Células dendríticas
ddNTP's	Dideoxinucleótidos trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EM	Esclerosis múltiple
EMRR	EM remitente-recurrente
EMSP	EM secundaria progresiva
EMPP	EM progresiva primaria
FAD	Dinucleótido de flavina adenina
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GWAS	Estudios de asociación del genoma completo
HLA	Antígeno leucocitario humano
Hcy	Homocisteína
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
kDa	KiloDaltons
LFA-1	Antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos
Mab	Anticuerpo monoclonal
MAT	Metionina adenosil-transferasa
MBP	Proteína básica de mielina
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MR1	Molécula relacionada con MHC 1
MAIT	Invariante T asociado a la mucosa
MI	Mononucleosis infecciosa
MS	Metionina sintasa
MTHFD1	Metilentetrahidrofolato deshidrogenasa-1
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NETs	Trampas extracelulares de neutrófilos
NLRs	Receptores tipo NOD
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción de reacción en cadena de polimerasa
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
RPM	Revoluciones por minuto
SAM	S- Adenosil metionina
SAH	S -adenosil-homocisteína
SI	Sistema inmune
SNC	Sistema nervioso central
SCA	Síndrome clínicamente aislado
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TCR	Receptor de células T
Th	Célula T auxiliar
THF	Tetrahidrofolato
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tregs	Células T reguladora
TBE	Tris-borato-EDTA
TTS	Tris-tritón-sacarosa
UTR	Regiones variables no traducidas
UV	Ultravioleta

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Prevalencia global de EM .....	11
<b>Figura 2.</b> La patogénesis de la EM está influenciada por factores genéticos, epigenéticos y ambientales.....	12
<b>Figura 3.</b> Procesos inmunológicos en la patogenia de la EM. En ella, participan las células del SI incluidos los macrófagos, los neutrófilos, las células NK, NKT, $\gamma\delta$ T y MAIT, así como el sistema del complemento en los procesos inflamatorios asociados con la EM .....	15
<b>Figura 4.</b> Localización y estructura del gen <i>MTHFR</i> .....	18
<b>Figura 5.</b> Representación del gen <i>MTHFR</i> . A. Se muestran los exones como regiones azules y los números indican la ubicación de los polimorfismos , que corresponde al número rs del gen 1. Rs4846080(A > G); 2. rs1476413(G > A); 3. Rs1801131(A > C); 4. rs1801133(C > T); 5. rs17421511(G > A); 6. rs17037396(C > T); 7.rs9651118(T > C); 8. rs17367504(A > G). B. Disminución de la actividad enzimática (% de lo normal) con la presencia de variantes de <i>MTHFR</i> .....	18
<b>Figura 6.</b> Estructura de la proteína MTHFR. a) Topología de un monómero MTHFR y b) Proteína homodímero que muestra un dominio catalítico, el enlazador y un dominio regulador.....	19
<b>Figura 7.</b> Vías metabólicas en las que está implicada la actividad de la MTHFR. Los metabolitos producidos son precursores para procesos como la biosíntesis celular, la metilación, la regulación del estado redox, la regulación epigenética y la homeostasis de aminoácidos en la desintoxicación de compuestos como la Hcy.....	20
<b>Figura 8.</b> Frecuencia del alelo menor de <i>MTHFR</i> C677T en seis grupos de mestizos mexicanos .....	22
<b>Figura 9.</b> Etapas de la PCR. Cada ciclo está compuesto por tres temperaturas: desnaturalización, alineación y extensión (Tomado de Britannica, 2023).....	26
<b>Figura 10.</b> Patrones de restricción enzimática de la enzima HinfI en <i>MTHFR</i> .....	29
<b>Figura 11.</b> Integridad del ADN en gel de agarosa al 0.8%. En los carriles 1 ,2, 5 y 7 se observa ADN íntegro, en el carril 3,6,8 se observa ADN muy degradado, en el 4 no se observa muestra ADNg. La intensidad de las bandas está directamente relacionada con la cantidad de DNA presente en la muestra .....	30
<b>Figura 12.</b> Gel de agarosa al 1%. Se observan 5 muestras del fragmento amplificado de 198 pb. En el primer carril se colocó un marcador de peso molecular de 100 pb.....	31
<b>Figura 13.</b> Gel de agarosa al 2.5%. En los carriles 1,2,3 y 4 se observan 4 muestras con genotipo CC, en los carriles 4, 5, 6 y 7 se observan 4 muestras del genotipo CT, en los carriles 9, 10, 11 y 12 se observan 4 muestras del genotipo TT, en el carril 13 se observa un marcador de peso molecular de 100 pb .....	32

### III. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Síntomas de la esclerosis múltiple y su localización	16
<b>Tabla 2.</b> Tabla 2. Distribución del genotipo de <i>MTHFR</i> C677T (GUE: Guerrero, GUA: Guanajuato, SON: Sonora, VER: Veracruz, YUC: Yucatan, ZAC: Zacatecas, MEX: All Mexican Mestizos, NAH: Nahuas, ZAP: Zapotecos, TOT: Totonacas, AMI: Amerindios, MAF: Frecuencia del alelo menor)	22
<b>Tabla 3.</b> Primers utilizados para amplificar el fragmento deseado	27
<b>Tabla 4.</b> Mezcla de reacción para la PCR . Ejemplo de la mezcla de reacción de PCR para un producto de amplificación de 198 pb. Mezcla para 6 reacciones	27
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de temperatura para PCR	28
<b>Tabla 6.</b> Reactivos y condiciones para la digestión enzimática	29
<b>Tabla 7.</b> Concentración y pureza de los genotipos que se observan en el gel	32
<b>Tabla 8.</b> Genotipos del gen <i>MTHFR</i> obtenidos a partir de las muestras	33
<b>Tabla 9.</b> Frecuencias genotípica y alélica de los genotipos obtenidos	33
<b>Tabla 10.</b> Frecuencias alélicas de la variante 677C>T (rs1801133) en distintas poblaciones	36



#### IV. RESUMEN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune desmielinizante y neurodegenerativa del sistema nervioso central, y la principal causa de discapacidad neurológica no traumática en adultos jóvenes. Se sabe que su naturaleza es multifactorial, la cual no ha sido completamente esclarecida. En su desarrollo, está implícita la interacción de la susceptibilidad genética así como factores ambientales. Los enfoques terapéuticos actuales solo pueden mejorar los síntomas clínicos o reducir la frecuencia de recaídas en la EM. El polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) C677T (rs1801133) del gen *MTHFR* ha sido asociado con el inicio y la progresión de la EM debido a que produce una disminución en la actividad de la enzima MTHFR en la región catalítica aumentando los niveles de homocisteína en el plasma lo que conduce a daño neuronal. Por lo cuál, se realizó la determinación de polimorfismo en un grupo de 87 pacientes con EM, mediante la técnica RFLP-PCR y la enzima de restricción Hinf I para la identificación de este polimorfismo. Se identificaron 32 pacientes con el genotipo TT (37%), 31 pacientes con el genotipo CT (36%) y 24 pacientes con el genotipo CC (28%) y la frecuencia alélica de alélica de 0.54 para el alelo T y 0.46 para el alelo C.

## 1. INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad desmielinizante crónica más común del sistema nervioso central (SNC) y la causa más común de discapacidad permanente en adultos jóvenes. Los signos y síntomas se correlacionan con los sitios de la lesión dentro SNC que son causados por la infiltración de células inmunitarias a través barrera hematoencefálica que promueve la inflamación, gliosis y degeneración (Longo, 2018). Esta enfermedad se clasifica en 4 subtipos según los patrones clínicos que presentan los pacientes: síndrome clínicamente aislado, EM remitente-recurrente, EM secundaria progresiva y EM progresiva primaria (Lublin, 2014). El diagnóstico se resume en los criterios de McDonald, mediante resonancia magnética nuclear (RMN), examen del líquido cefalorraquídeo (LCR) y síntomas físicos (Macaron y Ontaneda, 2019). El tratamiento incluye la modificación de la enfermedad con fármacos inmunomoduladores y tratamiento dirigido a síntomas específicos (Hosseini et al., 2019; Dobson y Giovannoni, 2019). De acuerdo con Alfredsson y Olsson (2019) es una enfermedad heterogénea con determinantes genéticos y ambientales, las exposiciones ambientales asociadas con el riesgo de EM incluyen el tabaquismo, la deficiencia de vitamina B12, B6 y D, el aumento de la latitud y la mononucleosis infecciosa (MI) y por susceptibilidad genética que representa > 30% del riesgo general de la enfermedad. Por otra parte, la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) está codificada en humanos por el gen *MTHFR* y participa en el metabolismo de la homocisteína (Hcy) ya que cataliza la conversión de 5,10-metilentetrahidrofolato en 5-metiltetrahidrofolato, que sirve como donante de grupos metilo en la remetilación de la homocisteína en metionina (Kurniawan et al 2021). El polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) más estudiado en este gen es C677T el cual genera un cambio de aminoácido que disminuye la actividad catalítica de la enzima MTHFR y la falta de síntesis de metionina a partir de Hcy conduciendo a niveles elevados de Hcy (Petroni et al., 2021). Por lo tanto, C677T de MTHFR podría predisponer a la aparición y recurrencia de la EM (Reich, 2018). El objetivo de este estudio fue investigar el SNP del gen *MTHFR* y su riesgo de enfermedad con EM. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos. El análisis del gen se realizó mediante polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs), con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), digestión con la enzima Hinf I y electroforesis en gel agarosa al 2.5% para observar los fragmentos digeridos.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Esclerosis Múltiple (EM)

La EM es una enfermedad neurológica del sistema nervioso central caracterizada por destrucción de la mielina en el SNC posterior a la tríada de inflamación, desmielinización y gliosis (placas o cicatrices) junto con pérdida neuronal progresiva (Cree y Hauser, 2022). La evolución clínica puede variar desde una enfermedad benigna hasta una alteración de rápida evolución e incapacitante que requiere ajustes en el estilo de vida. En la actualidad, se considera un trastorno mediado por mecanismos autoinmunitarios influido por factores ambientales y hereditarios multifactoriales (Armao y Bouldin, 2021).

#### 2.1.1 Epidemiología

La EM suele manifestarse clínicamente entre los 15 y los 50 años; presenta una incidencia diferente según el sexo, la edad, la distribución geográfica y el origen étnico. La incidencia es dos o tres veces más alta en mujeres que en varones, en niños es muy baja con sólo 0.3 a 0.4% de los casos comienza en los primeros 10 años. Se estima que la EM afecta a 2.8 millones de personas en todo el mundo (35.9 por cada 100,000 habitantes) (Walton et al., 2020). En estudios recientes, se ha reportado que la incidencia y prevalencia varía entre distintas áreas geográficas desde más de 100 a 200 casos por 100,000 habitantes en latitudes altas hasta menos de 5 casos por 100,000 en las regiones cercanas al sur del ecuador (Figura 1). La prevalencia más alta de EM se encuentra en la población canadiense, con 291 por 100 000 habitantes, seguida de las Islas Orkney (287), Suecia (189), Hungría (176), Chipre (175), Reino Unido (164), República Checa (160), Noruega (160), Dinamarca (154), Alemania (149) y EE. UU. (90-100). La prevalencia más baja se ha notificado en África subsahariana (2.1), Asia oriental (2,2) y la región del ecuador (3). De acuerdo con el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS, 2017) en México existen cerca de 20,000 casos de los cuales solo 7,000 son tratados con una prevalencia de 15 a 18 casos de EM por cada 100,000 habitantes (Moreno-Torres et al., 2019; Ionescu et al., 2023; IMSS, 2017).

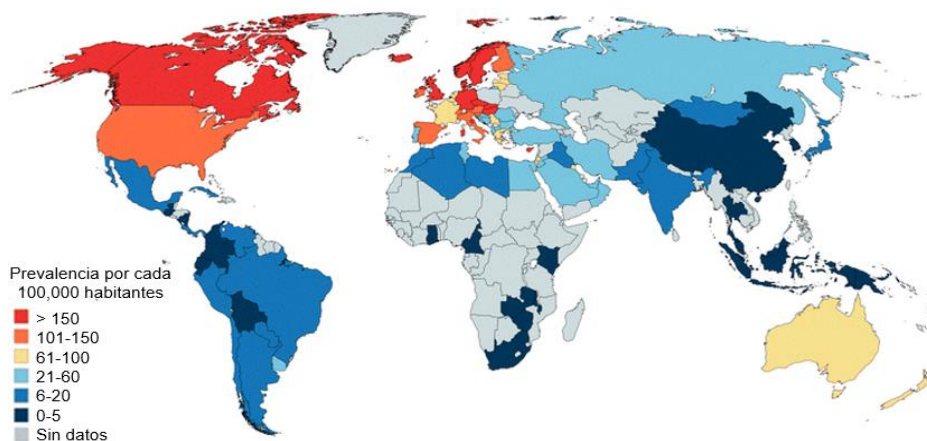
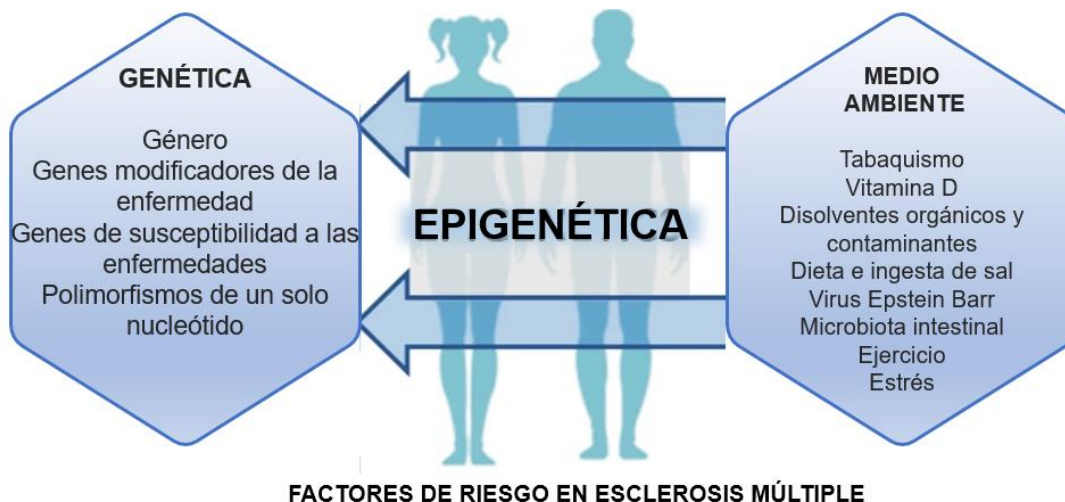


Figura 1. Prevalencia global de EM (Modificado de Moreno-Torres et al., 2019).

## 2.1.2 Etiología

La EM es una enfermedad genética multifactorial definida por un modo de herencia no mendeliano y no mitocondrial que está al menos parcialmente ligada al medio ambiente y factores estocásticos. De acuerdo con Fagnani *et. al* (2015) se estimó la contribución genética al riesgo de desarrollar EM en un 50%, un 21% para el ambiente y 29% para el control epigenético en el riesgo de la enfermedad (Figura 2).



**Figura 2.** La patogénesis de la EM está influenciada por factores genéticos, epigenéticos y ambientales (Modificado de Yuan et al., 2021).

### 2.1.2.1 Susceptibilidad genética

Muchos estudios han demostrado una alta concordancia entre gemelos, agregación familiar y mayor riesgo de enfermedad entre familiares de pacientes con EM (Cotsapas y Mitrovic, 2018). Un estudio de metaanálisis mostró que la prevalencia de la EM familiar en todo el mundo es del 12.6%. Los gemelos monocigóticos tienen una tasa de concordancia del 20 al 30% mientras que los gemelos dicigóticos tienen una tasa de concordancia del 5%; este riesgo disminuye con la distancia genética: 2% para hijos de pacientes afectados, 1% para familiares de segundo grado (tíos) y 0.8% para familiares de tercer grado (primos) (O’Gorman et al., 2013; Harirchian et al., 2018; Pizzorno y Murray, 2020).

#### a. Variantes genéticas comunes

Un estudio reciente, de GWAS ha llevado a la identificación de 200 loci autosómicos de la EM: 1 en el cromosoma X y 32 de la región HLA que son significativas en todo el genoma (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2019). La mayoría de las variantes comunes se localiza en o cerca de genes que tienen funciones inmunológicas centrales. Se sabe que la EM está asociada con la región de clase II del HLA especialmente, el alelo HLA-DRB1\*15:01, HLA-DRB1\*13:03, HLA-DRB1\*03:01, HLA-DRB1\*08 y HLA-DQB1\*03:02 que muestra la correlación más fuerte con la aparición de la enfermedad y con más lesiones e inflamación en el SNC, también se vincula con mayor exceso de riesgo en mujeres y modifica la influencia de algunos factores ambientales, mientras que el alelo HLA

clase I HLA-B\*38:01, HLA-A\*02:01, HLA-B\*44:02 y HLA-B\*55:01 tiene efectos protectores. Sin embargo, solo el 27% de la heredabilidad de la EM puede explicarse por las variantes genéticas del sistema HLA. (Tempest et al., 2022; Kim y Patsopoulos, 2022; Tizaoui, 2018).

#### b. Variantes genéticas raras y de baja frecuencia

Las variantes raras (frecuencia de alelos menores de <1 % en la población general) y las variantes de baja frecuencia (frecuencia de alelos menores de 1 a 5 % en la población general) también contribuyen a la heredabilidad de la EM. Se han identificado más de 200 SNP que contribuyen a la enfermedad, otros loci de susceptibilidad validados son *IL2RA*, *IL7R*, *CD58*, *IRF8*, *TNFRSF1A* y *TYK2* que tienen funciones en el desarrollo la activación y la regulación de las células T (Huizar et al., 2020; Goris et al., 2022). Los SNP en los genes *AHI1* (rs11154801), *LRP2* (rs12988804) y *MBP* (rs12959006) pueden contribuir a la progresión de la EM además a la susceptibilidad a la misma (Graves et al., 2018; Zhou et al., 2017). Además, se han descrito muchas variantes que participan en el metabolismo de la metionina, por ejemplo, el alelo A para el gen *SLC19A1* (rs1051266) se correlacionó con la edad de aparición tardía de la EM mientras que la inserción de c.844\_855ins68 en *CBS* (rs72058776) se vinculó con una edad más temprana al inicio de la EM (Webb y Guerau-de-Arellano, 2017). Dashti *et. al.* (2020) encontraron una asociación significativa del SNP C677T (rs1801133) del gen *MTHFR* con el riesgo de EM a través de una disminución de la función enzimática de MTHFR y la alteración del metabolismo del folato generando un aumento en los niveles de Hcy que generalmente ocurre en pacientes con EM.

### 2.1.2.2 Factores ambientales

#### a. Influencia geográfica, exposición solar y vitamina D

El descubrimiento del papel protector de la vitamina D en la EM puede explicar en parte su distribución geográfica. La luz UV cataliza la conversión de la vitamina D en su forma bioactiva y la prevalencia de la EM es mayor en regiones que están más alejadas del ecuador con una exposición anual relativamente baja a la luz solar (Hecker et al., 2021; Moreno-Torres et al., 2019). Los estudios de migración de la población indican que el riesgo geográfico de EM se establece antes de la adolescencia, los niños preadolescentes que pasan de un área de bajo riesgo a una de alto riesgo tienen mayor probabilidad de desarrollar EM (Waubant et al., 2019). Diversos estudios han sugerido que los niveles más altos de vitamina D tienen un posible papel protector en ciertas poblaciones de pacientes susceptibles (Niino y Miyazaki, 2017).

#### b. Infección por virus Epstein-Barr (EBV)

La infección por el EBV se ha asociado de manera más consistente con la EM ya que se ha descubierto que las personas que han tenido mononucleosis infecciosa (MI) clínicamente tienen más del doble de riesgo (~ 3.6) de desarrollar EM y ~ 15 veces cuando interactúa con variantes de riesgo HLA (Celarain y Tomas-Roig, 2020). Además, varios

estudios han demostrado una asociación temporal entre la MI y el inicio de la EM. La MI de inicio tardío (adolescencia y edad adulta temprana) se asocia con un mayor riesgo de EM que aquellos con MI en la primera infancia (Ascherio y Munger, 2015).

### c. Estilo de vida

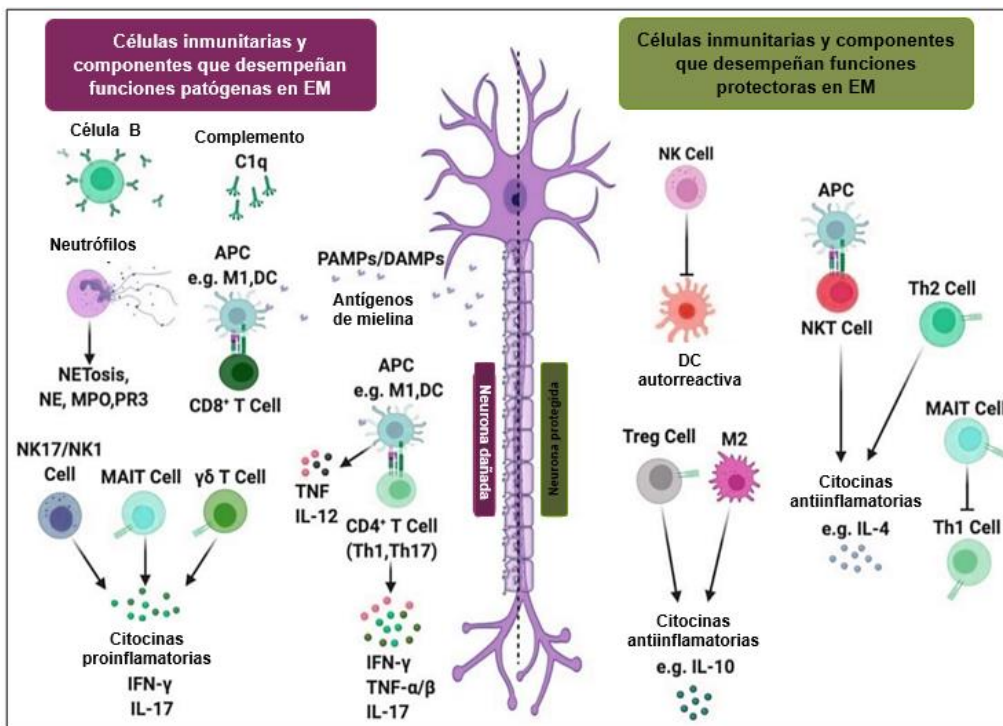
No existe una dieta específica asociada con un mayor riesgo de EM. Sin embargo, el papel de los factores dietéticos como el alto consumo de sal se ha asociado con la progresión de la enfermedad (Esposito et al., 2018). No obstante, estudios de metaanálisis han resaltado la importancia de la vitamina B<sub>12</sub> y B<sub>6</sub> ya que son necesarias para el correcto funcionamiento del SNC a través de la conversión de homocisteína en metionina mediada por la enzima metionina sintasa, que es esencial para la síntesis de ADN y ARN. Por otra parte, la deficiencia de cobalamina y folato puede conducir a un aumento del nivel de homocisteína relacionado con un efecto neurodegenerativo, una deficiencia grave de vitamina B<sub>12</sub> puede provocar la ruptura de la vaina de mielina. No obstante, se reportan resultados divergentes de la relación entre el folato, la vitamina B<sub>12</sub> y la homocisteína. Un metaanálisis mostró niveles más bajos de vitamina B<sub>12</sub> en pacientes con EM, niveles elevados de homocisteína y no se observaron diferencias significativas en el folato entre los controles y los grupos con EM (Dardiotis, 2017; Khosravi-Largani, 2018; Pan, 2019).

Por otra parte, existe una relación dosis-respuesta entre el tabaquismo y el riesgo de EM y la actividad de la enfermedad. El cociente de probabilidades de desarrollar EM es de aproximadamente 1.5 para los fumadores en comparación con los no fumadores (Moreno-Torres et al., 2019; Deeb et al., 2022). Degelman y Herman (2017) encontraron una asociación significativa entre la frecuencia de tabaquismo y la conversión de formas RRMS a SPMS. Asimismo, numerosos estudios han investigado la microbiota intestinal fecal en pacientes con EM, estos pacientes muestran disbiosis microbiana intestinal con aumento y disminución de poblaciones específicas de hongos y bacterias en comparación con individuos sanos (Jangi et al., 2016; Amini et al., 2020; Yadav et al., 2022) lo que sugiere que ciertos taxones podrían estar asociados con la patogénesis o la progresión de la enfermedad (Zhou et al., 2022).

### 2.1.3 Inmunopatogénesis

La EM se desarrolla a través de un proceso fisiopatológico complejo. Tanto el sistema inmune (SI) innato; como el adaptativo, desempeñan un papel importante la patogenia y en la remisión de la enfermedad como se observa en la Figura 3 (Dhaiban et al., 2021). Las células T CD4<sup>+</sup> infiltrantes se activan en la periferia mediante células presentadoras de antígenos como los macrófagos (M1), DC y linfocitos B que presentan, junto con moléculas MHC, autoantígenos de mielina liberados de la mielina dañada en el SNC (Sen et al., 2020). Esta interacción activa la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes en células T CD4<sup>+</sup> auxiliares (Th) como Th1 y Th17 que migran a través de la BBB al SNC donde se reactivan y secretan citocinas para ejercer sus funciones efectoras. Las células Th1 producen altos niveles de IL-2, TNF $\alpha$  e IFN- $\gamma$  mientras que las células TH17 secretan altos niveles de IL-17, IL-21, IL-22 e IL-24, además de los factores inflamatorios secretados por macrófagos y DC, incluidos TNF e IL-12. Otras células inmunitarias (NK17/NK1, células T  $\gamma\delta$  y células MAIT) liberan citocinas inflamatorias, mientras que las células B secretan

anticuerpos contra los autoantígenos de mielina, que se unen al complemento C1q, lo que resulta en la activación de la vía clásica del complemento. Los neutrófilos inician el proceso de “NETosis” y forman NET, liberando NE y MPO. Todos estos mediadores inflamatorios exacerbaban aún más las respuestas inflamatorias que resulta en desmielinización dentro del cerebro y la médula espinal lo que conduce al daño axonal (Dargahi et al., 2017; Kunkl, 2020). Por otro lado, las células del SI pueden tener efectos protectores a través de la secreción de citocinas antiinflamatorias (IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35) estos incluyen células Treg, M2, NKT y Th2, o través de la lisis de las DC autorreactivas por parte de las células NK, evitando así que actúen como APC e inhibiendo las respuestas inflamatorias, o mediante la inhibición de las respuestas de las células Th1 patógenas por parte de las células MAIT (Attfield, 2022; Milo, R. 2019).



**Figura 3.** Procesos inmunológicos en la patogénesis de la EM. En ella, participan las células del SI incluidos los macrófagos, los neutrófilos, las células NK, NKT,  $\gamma\delta$  T y MAIT, así como el sistema del complemento en los procesos inflamatorios asociados con la EM (Modificado de Dhaiban et al., 2021)

### 2.1.4 Características clínicas

Las manifestaciones clínicas y el curso de la EM varían mucho entre pacientes y dentro del mismo paciente a lo largo del tiempo, esta enfermedad puede causar una variedad de problemas neurológicos, dependiendo principalmente de la ubicación del SNC donde se encuentran las lesiones y la gravedad de las placas de EM. La Tabla 1 enumera los síntomas más comunes de la EM que pueden aparecer durante los diferentes cursos de la enfermedad (Ionescu et al., 2023).

**Tabla 1.** Síntomas de la esclerosis múltiple y su localización (Tomado y modificado de Douglas et al., 2022).

Sitio de la lesión	Síntomas clínicos
<b>Cerebro</b>	Debilidad y dolor hemifacial
	Deficiencias motoras
	Déficits cognitivos
	Características psiquiátricas (demencia, trastorno bipolar, depresión mayor, risa y llanto patológicos y psicosis)
<b>Corteza</b>	Discapacidad motora, sensorial y cognitiva
<b>Nervio óptico</b>	Neuritis óptica (visión borrosa aguda, pérdida visual monocular y alteración de la visión del color)
<b>Cerebelo</b>	Temblor postural y de acción
	Falta de coordinación de las extremidades
	Inestabilidad de la marcha, Ataxia
<b>Tronco encefálico</b>	Diplopía (visión doble)
	Vértigo
	Deterioro del habla y la deglución
	Síntomas paroxísticos
<b>Médula espinal</b>	Debilidad
	Destreza disminuida
	Parestesia (punzadas, comezón, hormigueo, ardor doloroso), temblores, discapacidad ambulatoria progresiva, rigidez
	Alteraciones autónomas (impotencia sexual, disfunción vesical, estreñimiento)
	Dolor
<b>Otro</b>	Fatiga y sensibilidad a la temperatura

### 2.1.5 Clasificación

En el 2013 el Comité Asesor Internacional sobre Ensayos Clínicos en Esclerosis Múltiple definió cuatro subtipos clínicos considerando la evolución del padecimiento, desde el inicio de los síntomas inespecíficos hasta la progresión a etapas más definidas, la frecuencia y la severidad de los ataques, discapacidad y déficit neurológico (Lublin et al., 2014).

1. Síndrome clínicamente aislado: Se reconoce como la primera presentación clínica de una enfermedad que muestra características de desmielinización inflamatoria que podría ser EM (Thompson, 2018).
2. EM remitente-recurrente: Comprende el 85% de los casos, se caracteriza por brotes claramente definidos con completa recuperación o efectos residuales; períodos libres de enfermedad sin progresión de la enfermedad; están separados por períodos de remisión durante los cuales la mayoría de los síntomas se resuelven espontáneamente (Sontheimer, 2021).
3. EM progresiva primaria: Afecta a hombres y mujeres por igual, alrededor del 15% de los pacientes nunca tienen brotes, sino un deterioro funcional constante desde que inicia la enfermedad (Cree y Hauser, 2022).



4. EM progresiva secundaria: Típicamente se desarrolla 10 a 15 años después del inicio de la EMRR con una evolución gradual desde recaídas discretas hasta una enfermedad lentamente progresiva (Cifu, 2020).

### **2.1.6 Diagnóstico**

El diagnóstico de EM se basa en la historia clínica y el examen neurológico utilizando técnicas de imagen, punciones lumbares para análisis de LCR, potenciales evocados, análisis de muestras de sangre y pruebas serológicas (Dobson y Giovannoni, 2019). De acuerdo con Cree y Hauser (2022) es importante obtener un historial clínico sobre la aparición de los primeros síntomas y cualquier trastorno neurológico, donde el algoritmo diagnóstico más actual y utilizado son los criterios de McDonald de 2017. La RMN puede identificar cualquier formación de tejido cicatricial y daño en el SNC. Los test de potenciales evocados (visuales, auditivos y somatosensoriales) ofrecen información sobre la desmielinización en el nervio óptico y el SNC. Además, el análisis del LCR identifica pleocitosis linfomonocitaria y mayor concentración de IgG sintetizada de forma intratecal. Asimismo, el análisis de muestras de sangre para detectar deficiencias vitamínicas puede ser útil para el diagnóstico (Ropper, 2020).

### **2.1.7 Tratamiento**

Actualmente no existe una cura definitiva para la EM, los enfoques terapéuticos pueden dividirse en tratamientos que son de naturaleza sintomática y/o de apoyo, así como tratamientos que están dirigidos a la fisiopatología reduciendo la inflamación del SNC y la degeneración axonal (Tafti, 2022). El tratamiento sintomático incluye corticosteroides (inhiben la proliferación de linfocitos y la secreción de citocinas proinflamatorias) como la metilprednisolona, mitoxantrona (inhiben la degradación de la mielina mediada por macrófagos y disminuyen la producción de citocinas proinflamatorias) metotrexato (reduce la inflamación) que se utilizan en la EMRR y la EMSP; los fármacos inmunomoduladores como el interferón- $\beta$ , ácido de glatirámico y fármacos basados en anticuerpos monoclonales (mab: Monoclonal AntiBodies) como Natalizumab, Rituximab y acetato de glatirámico, se utilizan en la EMRR y la EMSP asintomática y pueden disminuir algunos síntomas mediante la inhibición de la activación y proliferación de las células T y la modulación de citocinas proinflamatorias (Sontheimer, 2021 & Zarranz Imirizaldu, 2018).

### 3. Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

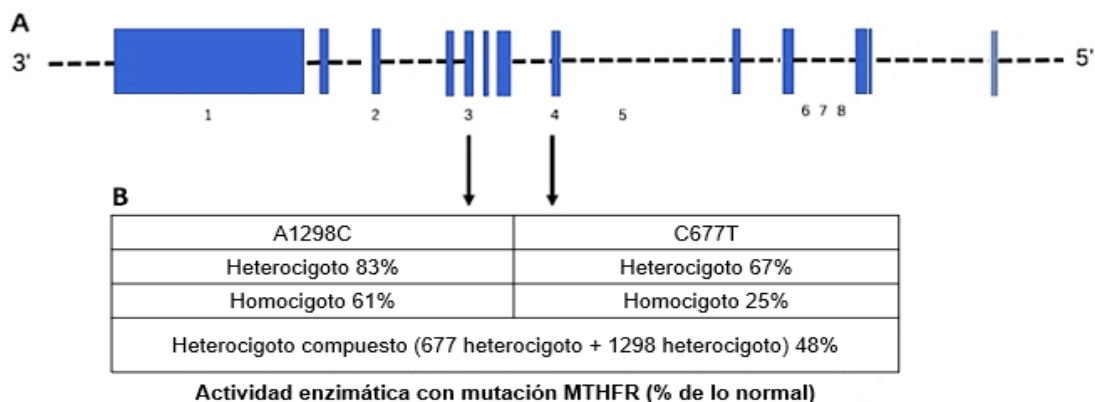
#### 3.1 Gen metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

El gen *MTHFR* (OMIM: 607093) tiene una longitud de 20,242 pb y se ha mapeado en la región cromosómica 1p36.22, va desde 11785723 pb hasta 11805964 pb (Figura 4). Consta de 13 exones y 11 intrones (Liew y Gupta, 2015; OMMIN). Se han identificado regiones variables no traducidas (UTR) 5' y 3' y variantes de corte y empalme lo que da como resultado isoformas de transcripción de 2.2 kb, 7.5 kb y 9.5 kb. El ADNc de la secuencia del fragmento de 2.2 kb codifica una proteína catalíticamente activa de 656 aminoácidos y 70 kDa, el ADNc de secuencia de 7.5 kb y 9.5 kb codifica una segunda isoforma de 77 kDa. El primer exón no es codificante. Tran *et al.*, (2002) identificaron UTR lo que conduce en heterogeneidad en la transcripción. Los extremos 5' y 3' del ADNc se superponen con el extremo 5' terminal de un gel de canal de iones de cloruro y el extremo 3' terminal de un gen no identificado (Goyette *et al.*, 1998).



**Figura 4.** Localización y estructura del gen *MTHFR* (Tomado de NCBI Chromosome 1 - NC\_000001.10).

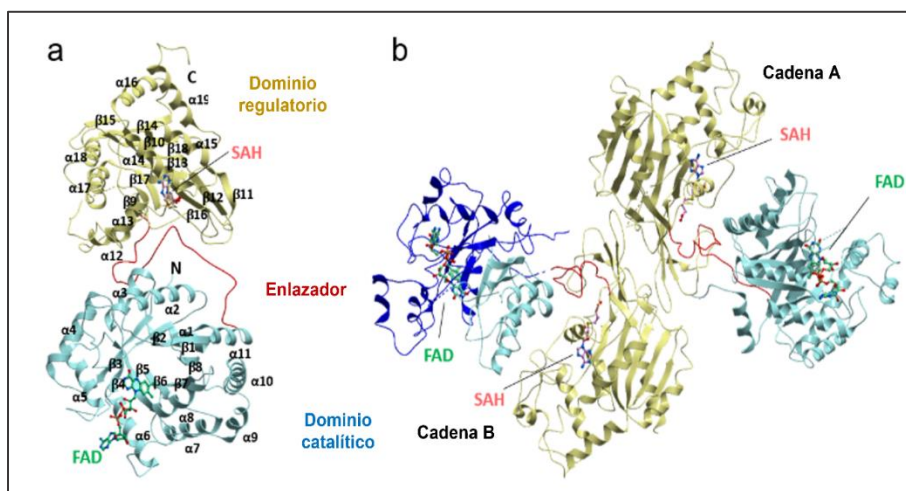
Se han descubierto numerosos SNP en el gen de los cuales 14 alteran o disminuyen la actividad de la MTHFR lo que lleva a un aumento de la homocisteína en la sangre. Entre ellos, 2 locus: C677T (rs1801133) y A1298C (rs1801131) asociados con actividad enzimática. Estas dos variantes se localizan a 2.1 kb de distancia una de la otra y son los polimorfismos más estudiados para este gen. Para C677T, la actividad enzimática de individuos con la variante heterocigotos y homocigotos es respectivamente 67 y 25% de los de tipo silvestre. Y para A1298C, la actividad enzimática de los individuos con la variante heterocigotos y homocigotos es respectivamente del 83 y el 61 % de los sujetos de tipo silvestre (Figura 5) (Wan *et al.*, 2018; Boccia *et al.*, 2007).



**Figura 5.** Representación del gen *MTHFR*. A. Se muestran los exones como regiones azules y los números indican la ubicación de los polimorfismos, que corresponde al número rs del gen 1. Rs4846080(A > G); 2. rs1476413(G > A); 3. Rs1801131(A > C); 4. rs1801133(C > T); 5. rs17421511(G > A); 6. rs17037396(C > T); 7. rs9651118(T > C); 8. rs17367504(A > G). B. Disminución de la actividad enzimática (% de lo normal) con la presencia de variantes de *MTHFR* (Modificado de Wan *et al.*, 2018).

### 3.1.1 Enzima metilentetrahidrofolato reductasa

La proteína MTHFR humana (MTHFR; OMIM 607093) es una enzima citoplasmática que cataliza la reducción de 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato del metabolismo de un carbono que incluye los ciclos esenciales de folato y metionina. Es un homodímero de 656 aminoácidos y cada subunidad (70–77 kDa) comprende un dominio catalítico N- terminal (aminoácidos 1-356) que contiene un sitio de unión a MTHF, NADPH y FAD. Asimismo, este tiene actividad reguladora por múltiples sitios fosforilados en una región de extensión N-terminal rica en serina y un dominio regulador C-terminal (aminoácidos 363-656) que está conectado al dominio catalítico mediante una secuencia enlazadora. Este dominio C-terminal es capaz de unirse a SAM lo que resulta en una inhibición alostérica de la actividad enzimática, un efecto que es muy lento y puede revertirse al unirse a S-adenosilhomocisteína (SAH), la forma desmetilada de SAM (Figura 6) (Froese et al., 2016; Froese et al., 2018; Strategy Growth Council, SGC, 2023).

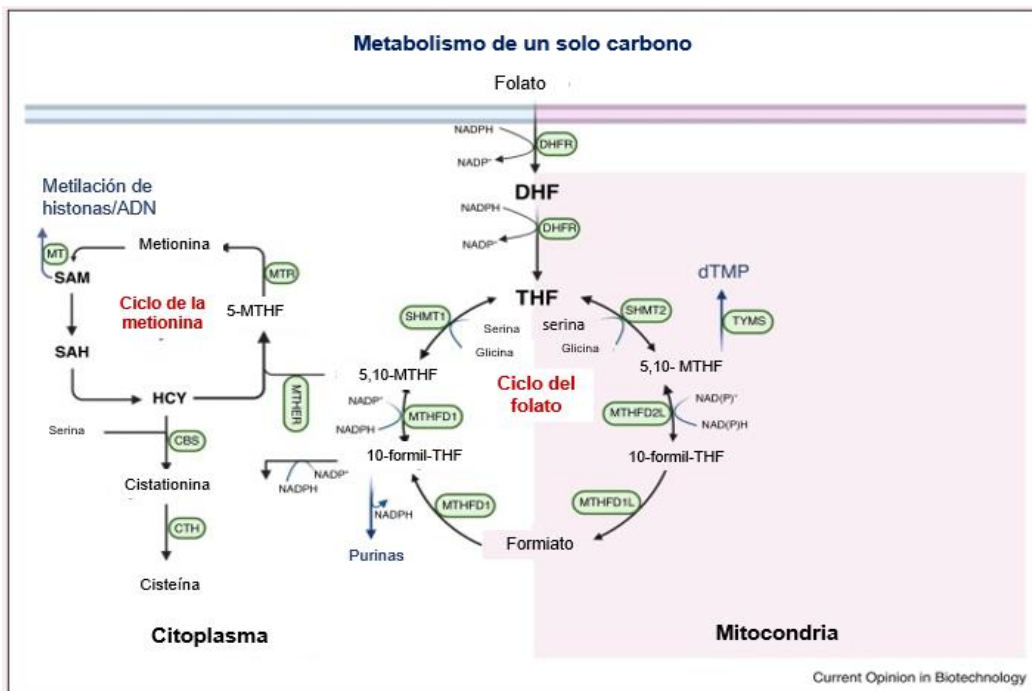


**Figura 6.** Estructura de la proteína MTHFR. a) Topología de un monómero MTHFR y b) Proteína homodímero que muestra un dominio catalítico, el enlazador y un dominio regulador (Tomado de Strategy Growth Council, SGC, 2023)

### 3.1.2 Metabolismo en el que interviene

El ciclo de un carbono (1-CC) y la enzima MTHFR juegan un papel fundamental en los procesos fisiológicos. Los nutrientes de entrada se procesan a través de una serie de reacciones químicas para ciclar unidades de carbono, estas reacciones ocurren en el citoplasma, núcleo y mitocondria (Laura et al., 2019). El THF y el 5,10 MTHF son intermediarios centrales en 1-CC y son los puntos de partida de varias vías metabólicas como el ciclo de folato y la metionina, la vía de la trans-sulfuración, la metilación del ADN y la biosíntesis de nucleótidos (Figura 7). Dentro del citoplasma el 5,10-MTHF producido a través del ciclo del folato es convertido por la MTHFR en 5- MTHF el cual dona su grupo metilo para regenerar la metionina a partir de la homocisteína (Hcy), que es catalizada por la metionina sintasa (MS) y requiere vitamina B12, en forma de metilcobalamina, como cofactor (Kurniawan et al 2021; Van der Windt et al., 2021).

La vía de la metionina es esencial para la provisión de grupos metilos después de la transmetilación en S-adenosilmetionina (SAM), por una enzima metionina adenosiltransferasa (MAT). Las metiltransferasas donan un grupo metilo a moléculas como los ácidos nucleicos y proteínas, SAM es un cofactor enzimático que juega un papel importante en el mantenimiento epigenético y el metabolismo del azufre. Tras la transferencia de metilo, SAM se convierte en S-adenosil-homocisteína (SAH) un sustrato de la remetilación de la homocisteína. Además, el ciclo de la metionina también se relaciona con la ruta de transulfuración, esta vía es iniciada por la enzima cistationina β-sintasa (CBS) que requiere vitamina B6 como cofactor y cataliza la condensación de serina y Hcy para producir cistationina. En segundo lugar, la cistationina γ-liasa (CTH) convierte la cistationina en cisteína. Por otra parte 5,10-MTHF participa en la biosíntesis de nucleótidos. En el citoplasma el 5,10-MTHF es convertido por la metilentetrahidrofolato deshidrogenasa-1 (MTHFD1) en 10-formil-THF, del que se derivan las purinas (Ducker, et al 2017; Lyon et al 2020).



**Figura 7.** Vías metabólicas en las que está implicada la actividad de la MTHFR. Los metabolitos producidos son precursores para procesos como la biosíntesis celular, la metilación, la regulación del estado redox, la regulación epigenética y la homeostasis de aminoácidos en la desintoxicación de compuestos como la Hcy (Tomado de Kurniawan et al 2021).

La deficiencia severa de MTHFR (MIM: 236250) es el trastorno más común en el metabolismo del folato (Weile et al., 2021). Un problema crítico en la regeneración de Hcy está relacionado con este ciclo, la presencia de SNP que afectan a la enzima MTHFR impide la formación de 5-MTHF, el compuesto activo, con un rendimiento óptimo. Esto se debe a una disminución significativa en la actividad enzimática de MTHFR, particularmente en presencia del SNP C677T.

Desde el punto de vista bioquímico, se relaciona con acumulación de Hcy en la sangre (hiperhomocisteinemia, MIM: 603174), es decir homocisteína plasmática elevada hasta 60 a 320  $\mu\text{M}$ ; rango de referencia típicamente 5–15  $\mu\text{M}$ ) junto con metionina plasmática baja o normal baja, así como SAH y SAM plasmática elevada, homocistinuria, cistationina plasmática elevada. Estos desequilibrios metabólicos resultan de la disminución del flujo a través de la metionina sintasa (Menezó et al., 2021; Jones et al., 2019) El nivel de metionina citoplasmática determina la proporción de SAM/SAH, que afecta la metilación de las histonas y del ADN y, por lo tanto, media el control epigenético (Kurniawan et al., 2021).

### 3.1.3 Polimorfismos de MTHFR

Frosst *et al* (1995) demostró por primera vez una variante genética C677T en la región codificante del gen *MTHFR* del exón 4 causando un cambio de marco de lectura, lo cual conduce a la sustitución del nucleótido de citosina por timina en esa posición. Esta mutación puntual provoca la sustitución de alanina por valina (p.Ala222Val) en el dominio catalítico N-terminal de la proteína MTHFR. Este polimorfismo es responsable de la síntesis de una forma termolábil de MTHFR con actividad enzimática reducida de aproximadamente un 60 % a 37°C con lo que disminuye la velocidad de conversión de homocisteína a metionina que conduce al aumento de los niveles de Hcy en plasma en sujetos con genotipo homocigoto (TT); en los heterocigotos, los niveles de homocisteína son altos en comparación con los individuos normales, pero más bajos que los homocigotos (Petroni et al., 2021).

Otro SNP que ocurre con frecuencia en el gen *MTHFR* A1298C descrito por Van der Put et al., 1998 está ubicado en el exón 7 ocasionando una mutación puntual (transversión). Lo que resulta en una mutación con cambio de sentido (p.Glu429Ala) en el codón 429 dentro del dominio regulador C-terminal de la proteína. Esto también disminuye la actividad enzimática pero no dan como resultado una proteína termolábil de tal forma que no provoca niveles elevados de homocisteína en individuos heterocigotos u homocigotos, pero la heterocigosis combinada de A1298C y C677T produce un resultado similar a individuos homocigotos TT (Wan, L. 2018; Dean, L. (2017).

Estos SNP son las dos mutaciones más comunes en el gen *MTHFR* y se han vinculado con diversas enfermedades neurológicas y cardiovasculares, defectos del tubo neural, complicaciones del embarazo y ciertos tipos de cáncer que han mostrado una asociación significativa con la reducción de la actividad enzimática y la metilación de MTHFR (Mabhida et al., 2022; Ostrajovitch y Tabibzadeh, 2019).

### 3.1.4 Prevalencia de C677T

La frecuencia de los polimorfismos varía en diferentes regiones geográficas del mundo y entre diferentes grupos étnicos. La frecuencia de distribución más baja oscila entre el 6 % y el 10 % en diferentes poblaciones africanas, seguidos del 11% en poblaciones japonesas. Se ha reportado hasta más del 17% en la población de América del Norte de origen caucásico. La frecuencia del genotipo C677T es alta en Europa, Asia, América central y del sur, en los países hispanos, específicamente en Latinoamérica y el Caribe, la frecuencia genotípica del polimorfismo varía del 30 al 59%.

En México, más del 50% de poblaciones mexicanas tienen una frecuencia más alta del alelo C677T (44–61 %) (Audiffred et al., 2016; Semmler et al., 2011; Contreras-Cubas et al., 2016). De acuerdo con Binia et al., (2016) en poblaciones mestizas y amerindias el genotipo de riesgo C677T fue altamente prevalente con una frecuencia de 25 y 57% respectivamente como se muestra en la tabla 2. La frecuencia de TT varió del 17 % en Sonora al 33 % en Guerrero (Figura 8).

**Tabla 2.** Distribución del genotipo de *MTHFR* C677T (GUE: Guerrero, GUA: Guanajuato, SON: Sonora, VER: Veracruz, YUC: Yucatan, ZAC: Zacatecas, MEX: All Mexican Mestizos, NAH: Nahuas, ZAP: Zapotecos, TOT: Totonacas, AMI: Amerindios, MAF: Frecuencia del alelo menor) (Tomado y modificado de Binia et al., 2016).

	<i>MTHFR</i> C677T				Frecuencia de <i>MTHFR</i> C677T (%)			MAF
	CC	TC	TT	Total	CC	TC	TT	T
GUE	34	87	60	181	19	48	33	57
GUA	41	98	45	184	22	53	24	51
SON	57	80	29	166	34	48	17	42
VER	33	95	54	182	18	52	30	56
YUC	46	95	33	174	26	55	19	46
ZAC	51	89	41	181	28	49	23	47
MEX	262	544	262	1068	25	51	25	50
NAH (AMI)	10	52	88	150	7	35	59	76
ZAP (AMI)	7	9	26	42	17	21	62	73
TOT (AMI)	2	14	9	25	8	56	36	64

**Frecuencia alélica de *MTHFR* C677T**

Guanajuato (51%T y 49% C)  
 Guerrero (57% T y 43% C)  
 Sonora (42% T y 58% C)  
 Veracruz (56% T y 44 %C)  
 Yucatán (46% T y 54% C)  
 Zacatecas (47% T y 53% C)



**Figura 8.** Frecuencia del alelo menor de *MTHFR* C677T en seis grupos de mestizos mexicanos (Tomado de Binia et al., 2016).

## 4. JUSTIFICACIÓN

La EM es una causa significativa de morbilidad neurológica en adultos jóvenes afectando alrededor de 20,000 pacientes registrados en México. En las últimas décadas su prevalencia ha ido en aumento globalmente, con un impacto socioeconómico significativo y una gran carga para los pacientes y sus familiares. Hasta la fecha no se conoce la etiología, sin embargo, estudios se han centrado en el papel de variantes genéticas de baja frecuencia que sugieren una asociación entre la aparición de esta patología y la presencia de los polimorfismos tal como el SNP C677T del gen *MTHFR* que codifica una enzima termolábil con actividad reducida y conduce a niveles elevados de Hcy que se asocian con el desarrollo de EM. No obstante, la mayoría de estos estudios han sido llevado a cabo en poblaciones europeas o asiáticas, por lo que la información sobre la susceptibilidad genética en población mexicana es limitada. Se ha reportado que la población mexicana tiene una alta prevalencia del alelo T y del genotipo TT en diversos grupos étnicos. Esto nos lleva a analizar las frecuencias alélicas en una cohorte de pacientes de diferentes estados de la República Mexicana y la posible asociación con la aparición y desarrollo de la enfermedad.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Determinar la presencia del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en un grupo de pacientes mexicanos con Esclerosis Múltiple mediante técnicas de biología molecular.

#### 5.1.1 Objetivos específicos

- Desarrollar la técnica PCR-RFLP en las muestras de pacientes con esclerosis múltiple.
- Determinar la frecuencia del polimorfismo C677T en población general mexicana con base a estudios ya reportados

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Selección de pacientes

Para el presente estudio se reclutó una cohorte de pacientes mexicanos de la Clínica de Esclerosis Múltiple del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” a los 87 pacientes participantes de este proyecto les fue entregada una carta de consentimiento informado donde aceptaban participar en este estudio. El protocolo fue previamente sometido a aprobación por el Comité de Investigación (CI) y el Comité de Ética en Investigación (CEI) del INNNMVS.

## 6.2 Toma de muestra

Se tomaron muestras de aproximadamente 20 mL de sangre venosa periférica por punción venosa en tubos de recolección de sangre al vacío tipo dispositivo Vacutainer® con ACD para impedir su coagulación. Las muestras de sangre se mezclaron mediante agitación suave y repetida, y posteriormente se almacenaron a 4 °C hasta la extracción de ADN.

## 6.3 Lisis celular y extracción de ADN

Para llevar a cabo la extracción se utilizó la técnica de Cuevas Covarrubias modificado de Buffone y Darligton (1985); Miller et al., (1988); Maniatis et al., (1982). Brevemente, 3 mL de cada muestra de sangre fue tratada con 3 volúmenes de una solución amortiguadora de lisis de eritrocitos TTS (Tris 10 mM- Tritón 1%, Sacarosa 0.32 M) en un tubo cónico de 15 mL que provoca la ruptura de los glóbulos rojos por choque osmótico y disuelve sus membranas (Tüzmen et al., 2018). Esta mezcla se agitó suavemente durante 10 minutos para homogeneizar y se centrifugó a 4,000 rpm durante 6 minutos. Después de la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se trabajó con el botón o pellet de las células mononucleares. El pellet se resuspendió con 1 mL de solución de TTS y se centrifugó a 3,000 rpm por 2 min. Este paso se repitió hasta obtener un botón blanco.

Para realizar la extracción de ADN se utilizó el método de *salting-out*, al botón limpio se añadió 570 µL de NaCl 5 mM y se agitó por 2 minutos provocando la ruptura de los linfocitos por choque osmótico. Después, se añadieron 30 µL de SDS al 10% y se agitó durante 5 minutos para la ruptura de membranas de la célula alterando la bicapa lipídica. La precipitación del ADN se consiguió con 200 µL de NaCl saturado, se agitó durante 10 minutos para la precipitación de proteínas nucleares y se centrifugó a 14,000 rpm por 20 min a 4°C para separar el ADN liberado de las proteínas precipitadas. Se decantó el sobrenadante que contiene el ADN en tubos eppendorf de 1.5 mL para realizar una partición orgánica donde la fase orgánica son 600 µL de una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1) se agitó y se centrifugó a 14000 rpm por 15 min, esto para separar del ADN los compuestos celulares no polares como lípidos, proteínas y otros contaminantes que no se hayan eliminado en el paso previo (Clarkn y Pazdernik, 2016).

Después de centrifugar, se retiró cuidadosamente la fase acuosa (que contiene el ADN) y esta se traspasó a un tubo cónico de 15 mL que contenía 3 mL de etanol absoluto frío (-20°C) para la precipitación del ADN y separación de las sales remanentes. Se agitó suavemente hasta que precipitó el ADN y se centrifugó a 11,000 rpm por 10min a 4°C. Se descartó el sobrenadante para quedarse con el botón de ADN para realizar un lavado del precipitado con etanol al 70% para la eliminación de sales y se volvió a centrifugar 11,000 rpm por 10 min a 4°C repitiendo el paso dos veces. Se decantó el etanol y el botón de ADN se secó al vacío con SpeedVac durante 30 min. Finalmente, se resuspendió en 200 µL de agua estéril para su rehidratación y se colocó en el termoblock a temperatura ambiente durante toda la noche para homogeneizar la solución (Chacon-Cortes y Griffiths, 2014).



### 6.3.1 Cuantificación de ADN genómico (ADNg)

La cuantificación de ADNg se realizó utilizando el espectrofotómetro de microvolumen Jenway™ Genova Nano. Para esto, se calibró utilizando 3  $\mu$ L de agua inyectable estéril como blanco antes cuantificar la primera muestra y después de aproximadamente 8 muestras cuantificadas. Para la medición de cada muestra, se colocaron 3  $\mu$ L de ADNg (muestra previamente homogeneizada en vórtex) en el cabezal de lectura realizando este paso por duplicado para sacar un promedio de los resultados obtenidos por el equipo.

El equipo proporcionó dos relaciones de lecturas a diferentes longitudes de onda: la primera mide la absorbancia del ADN debido a que las purinas y las pirimidinas presentes en las bases nitrogenadas del tienen una absorbancia máxima a 260 nm mientras que 280 nm es el máximo de absorción de las proteínas por la presencia de aminoácidos aromáticos (Clark et al., 2019). De este modo la pureza de los ácidos nucleicos con respecto a la contaminación con proteínas se puede evaluar con el índice de absorción 260/280 nm, una proporción de 1.8 y 2.0, se considera óptimo, ya que valores cercanos a 1.8 indican que la muestra contiene casi exclusivamente ADN, si es menor que 1.8 puede indicar la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes y un índice mayor que valores de 2.0 indica una rotura de las cadenas de los ácidos nucleicos, y se considera que es un ácido nucleico de calidad insuficiente. En la segunda medición, la relación 260/230 nm significa que la muestra está contaminada con algún compuesto orgánico como sales (iones fenolatos o tiocianatos), compuestos aromáticos u otras sustancias. Los valores esperados para muestras puras en relación con 260/230 nm se esperan en el rango 2.0-2.2 (Tüzmen et al., 2018).

Una vez obtenida la concentración de las muestras, se consideraron adecuadas las que tuvieran una concentración mayor a 50 ng/ $\mu$ L y se realizaron diluciones a una concentración de 100 ng/ $\mu$ L.

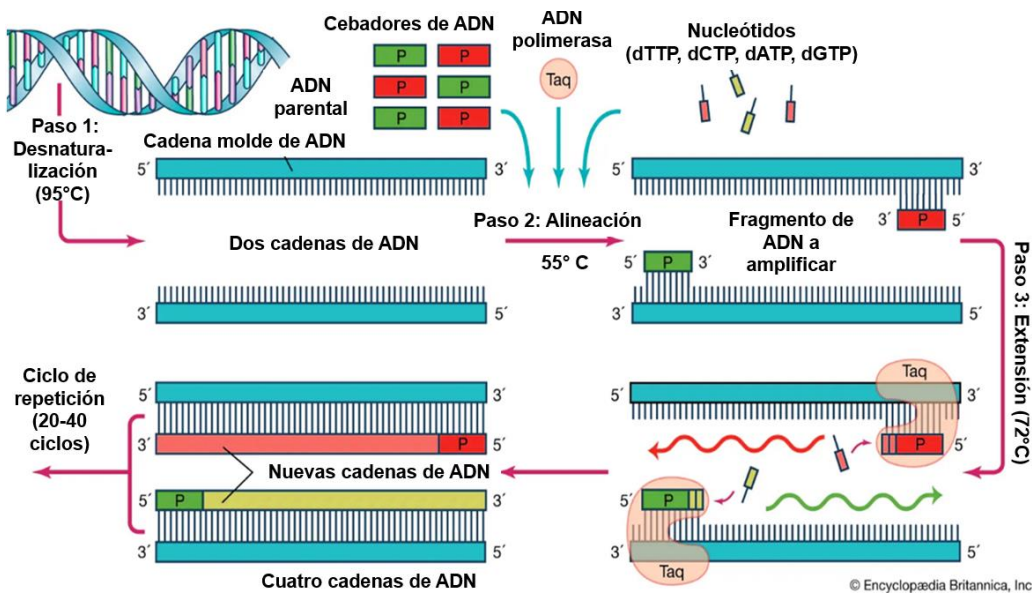
### 6.4 Electroforesis en gel de agarosa

La integridad del ADN fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa. Primero, se preparó una solución de agarosa al 0.8% con buffer TBE 1X y se calentó hasta estar completamente homogénea, después de 1 minuto se vertió al portagel previamente nivelado y se colocó el peine dejándose reposar hasta que polimerizó. Posteriormente, una vez solidificado el gel, se retiró el peine y se colocó el gel dentro de la cámara con buffer de corrimiento TBE 1X colocándose de manera que los pocillos queden en el extremo donde se localiza el polo negativo de la cámara de electroforesis, para permitir que la muestra migre a lo largo del gel hacia el polo positivo (debido a la carga negativa del ADN). Para cargar la muestra en el gel, se mezclaron 2  $\mu$ L de ADNg con 2  $\mu$ L de una mezcla 1:1 de GelRed™ como revelador y 1  $\mu$ L de Azul de bromofenol-Xileno cianol- Glicerol utilizado como buffer de carga se homogeneizó y cargó en un pozo del gel cuidadosamente para no perforar los pocillos del mismo. El buffer de carga contiene dos colorantes diferentes para

monitorear el corrimiento de la muestra en el gel y la presencia de glicerol garantiza el peso, densidad a la muestra, lo que facilita su depósito en el pocillo y evita su salida del gel (Salazar et al., 2013). El gel se corrió a un voltaje continuo de 100 V durante 30 minutos, pasado el tiempo se observó en el transiluminador de luz UV. El ADN íntegro se apreció por una banda bien definida sin dejar un barrido en su carril del gel y en las muestras en las que se observaron varias bandas o un escalonado de bandas se calificaron como degradadas.

## 6.5 Reacción en cadena de la polimerasa

Esta técnica se utilizó para analizar la variante C677T amplificando la región de interés del gen *MTHFR*. La PCR se basa en la amplificación exponencial *in vitro* de secuencias específicas de ADN flanqueadas por oligonucleótidos los cuales se alinean a sitios específicos de la región requerida de ADNg mediante una serie de ciclos repetitivos controlados (Clark et al., 2019). La amplificación se consigue mediante la repetición de tres pasos (Figura 9). El paso inicial es la desnaturalización del ADN a altas temperaturas (95°C) mediante la ruptura de los puentes de hidrógeno para dejar accesibles las dos hebras de la molécula, lo que permite el acceso de los primers a la cadena molde en sus secuencias complementarias. En el segundo paso, la temperatura se reduce a aproximadamente 55 °C favoreciendo la unión de los primers a sus cadenas complementarias de tal manera que se forman regiones de ADN de doble cadena con un extremo 3' OH libre, la temperatura de alineamiento varía dependiendo de la Tm de los oligonucleótidos. En el tercer paso, la temperatura se eleva a aproximadamente 72 °C y la ADN polimerasa comienza a agregar desoxinucleótidos a los extremos 3' OH. Al final del ciclo, que dura unos cinco minutos, se sube la temperatura y se reinicia el proceso. Cada ciclo duplica la cantidad de ADN (Britannica, 2023).



**Figura 9.** Etapas de la PCR. Cada ciclo está compuesto por tres temperaturas: desnaturalización, alineación y extensión (Tomado de Britannica, 2023).

### 6.5.1 Primers para amplificar el gen *MTHFR*

Las condiciones de reacción para la amplificación del gen *MTHFR* fueron modificadas en base a la técnica de Frosst y colaboradores (1995) quienes emplearon los oligonucleótidos específicos para el gen F4 (5'- ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC - 3') y F6 (5'-TGCTGGCACGGCTGTCCAAGGA -3'). Los primers utilizados para realizar la PCR se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 3.** Primers utilizados para amplificar el fragmento deseado.

Fragmento	Dirección	Longitud	Tamaño amplicón (pb)
C677T	F (forward, 5'>> 3'): TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA	23 pb	198
	R (reverse, 3'>> 5'): AGGACGGTGCGGTGAGAGTG	20 pb	

### 6.5.2 Mezcla de reacción para la PCR de punto final

Cada mezcla de reacción de PCR contiene una solución amortiguadora, MgCl<sub>2</sub> como cofactor, una ADN polimerasa termoestable y una mezcla desoxinucleósidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) todo estos componentes los encontramos en un reactivo llamado Taq PCR Master Mix Kit QIAGEN (2.5 U de Taq ADN polimerasa, amortiguador 1X QIAGEN PCR, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> y 200 μM de cada dNTP); 1–3μL de ADNg ajustando a una concentración de 300 ng/μL, DMSO al 7% ya que puede mejorar la separación del ADN de doble cadena durante el paso de desnaturalización y promover la especificidad y H<sub>2</sub>O inyectable hasta un volumen de 20 μL. Las cantidades de reactivos utilizadas se muestran a continuación:

**Tabla 4.** Mezcla de reacción para la PCR . Ejemplo de la mezcla de reacción de PCR para un producto de amplificación de 198 pb. Mezcla para 6 reacciones.

Reactivo	Concentración (ng/μL)	Volumen X1 (μL)	Volumen X6 +1 (control negativo) (μL)
ADN genómico	100	1-3	7
Primer Forward	100	1	7
Primer Reverse	100	1	7
Taq PCR Master Mix	-	10	70
DMSO	-	1.4	9.8
H <sub>2</sub> O	-	5.6	39.2
<b>Volumen total</b>		<b>20</b>	<b>140</b>

La reacción se realizó en tubos para PCR de 200 µL rotulados con el número de muestra además de un control negativo (sin muestra de ADN).

### 6.5.3 Condiciones para PCR del gen *MTHFR*

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en termociclador con función gradiente MultiGene™ OptiMax con las siguientes condiciones de reacción que se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 5.** Condiciones de temperatura para PCR

Número de ciclos	Paso de la PCR	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Desnaturalización inicial	95	5
35	Desnaturalización	93	1
	Alineación de primers	59	1
	Extensión	72	2
1	Extensión final	72	10
1	Incubación	4	∞

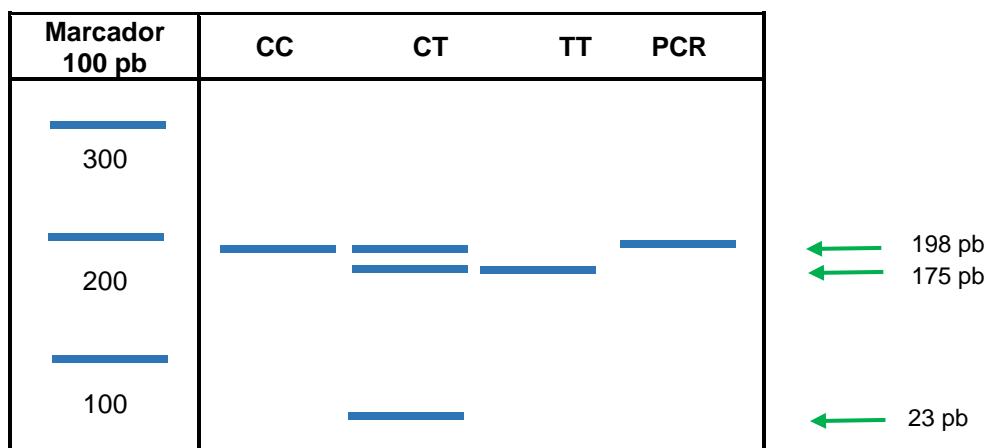
Se hizo un gel de agarosa al 1% con TBE 1X para comprobar la presencia de amplicones, cargando en cada pocillo 2 µL de producto de PCR con 2 µL del mix de colorante de carga y GelRed. Posteriormente, se observó en el transiluminador (luz UV) para comprobar presencia de amplicones.

### 6.6 Genotipificación por RFLP

La técnica de RFLP presenta la ventaja de la digestión del ADN con enzimas de restricción que reconocen y escinden hebras de ADN en sitios específicos, produciendo fragmentos de restricción de longitudes definidas (Hashim y Al-Shuhaib, 2019). Después de la amplificación se realizó una restricción enzimática del producto de PCR mediante la endonucleasa de restricción HinfI de tipo II extraído del *Haemophilus influenzae* RT la cuál presenta un tipo de corte de extremos cohesivos. Esta enzima reconoce la secuencia 5'-GG / CC-3' (N= A G C T).



Obteniendo un fragmento de 198 pb para el genotipo C677C (homocigoto silvestre), un fragmento de 198 pb, 175 pb y 23 pb para el genotipo C677T (heterocigoto) y un fragmento de 175 pb y 23 pb para el genotipo T677T (homocigoto mutante) como se observa en la Figura 10.



**Figura 10.** Patrones de restricción enzimática de la enzima de restricción *HinfI* en *MTHFR*

La reacción se realizó en tubos de 0.2 mL rotulados con el número de muestra y en ellos se agregó 10  $\mu$ L de producto de PCR y la mezcla de reacción. Posteriormente, se introdujeron en el termociclador a 37°C durante 2.5 h (Tabla 5).

**Tabla 6.** Reactivos y condiciones para la digestión enzimática

Reactivo (concentración)	Volumen X1 ( $\mu$ l)	Condiciones
Enzima (10 U/ $\mu$ L)	0.4	Incubación 37°C durante 2.5 h Mantenimiento 4°C
Buffer R con BSA 10X	2	
Producto de PCR	10	

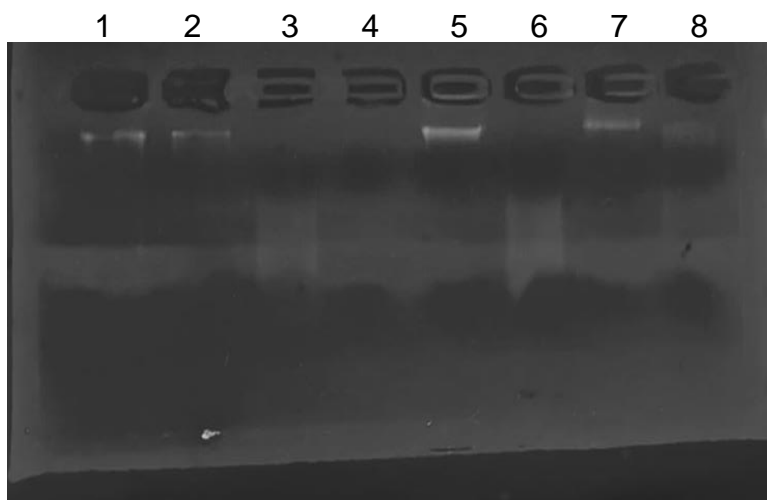
### 6.6.1 Electroforesis de los productos de digestión

Los productos digeridos se sometieron a electroforesis de gel de agarosa al 2.5% para observar los fragmentos obtenidos e identificarlos según su peso molecular. Cada muestra digerida se mezcló con 8  $\mu$ L de colorante de carga y se homogenizó con micropipeta. Posteriormente, se cargaron en cada uno de los pocillos del gel con un marcador de peso molecular de 100 pb (Bio-Rad Laboratories) para corroborar los fragmentos obtenidos en la digestión correspondan con el tamaño esperado en pares de bases. El gel se corrió a 100 V durante 2.5 horas y se observó en el transiluminador.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Análisis electroforético de ADN genómico

Se analizaron las muestras de los pacientes diagnosticados con esclerosis múltiple, que acuden a la Clínica de la Esclerosis Múltiple del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. Se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y visualizado con luz UV. En la Figura 11 se muestra un gel donde se observa el ADNg de las muestras utilizadas.



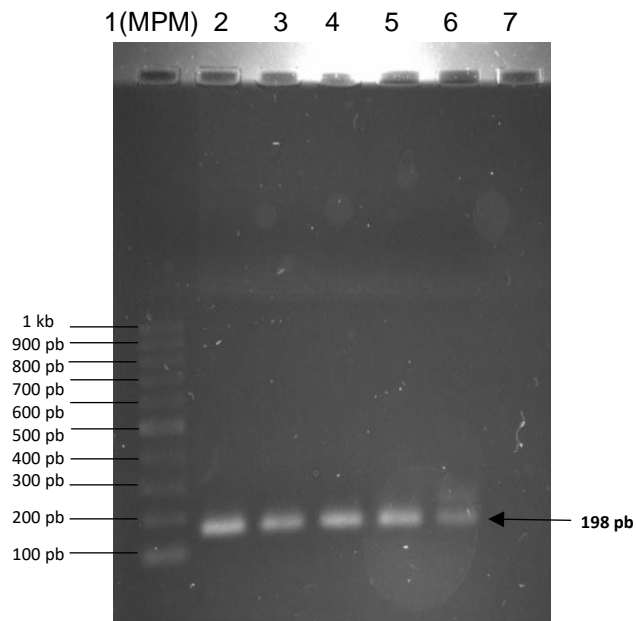
**Figura 11.** Integridad del ADN en gel de agarosa al 0.8%. En los carriles 1 ,2, 5 y 7 se observa ADN íntegro, en el carril 3,6,8 se observa ADN muy degradado, en el 4 no se observa muestra ADNg. La intensidad de las bandas está directamente relacionada con la cantidad de DNA presente en la muestra.

### 7.2 Análisis espectrofotométrico del ADN genómico

El ADN genómico se cuantificó mediante el espectrofotómetro UV, encontrándose una concentración y pureza promedio de 100–200 ng/μL y de (1.7 – 2.2) respectivamente en 87 muestras. Sin embargo, 16 muestras tuvieron una concentración promedio de 10-30 ng/μL y una pureza de 0.8 por lo tanto esas muestras se descartaron para hacer PCR-RFLP. Las diluciones realizadas tuvieron una concentración final de 50 ng/ μL.

### 7.3 Reacción en cadena polimerasa

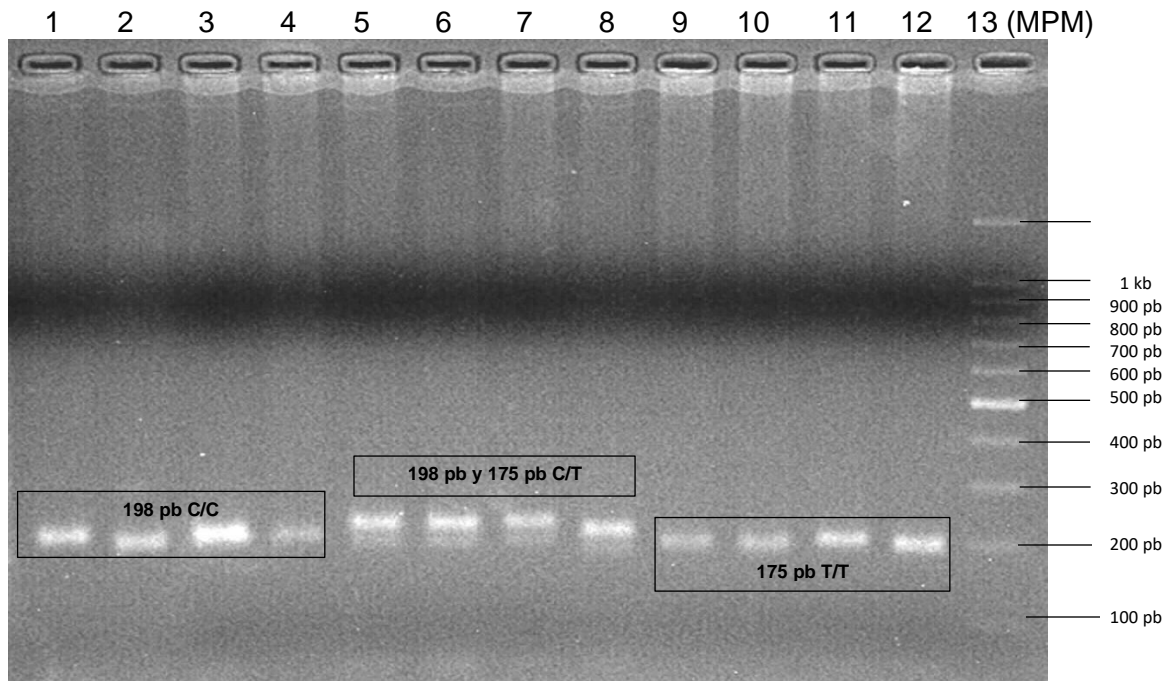
Los productos de PCR de cada muestra se identificaron en geles de agarosa al 1% utilizando un marcador de peso molecular con un patrón de bandas conocido como se observa en la Figura 12.



**Figura 12.** Gel de agarosa al 1%. Se observan 5 muestras del fragmento amplificado de 198 pb. En el carril 1 del gel se colocó un marcador de peso molecular de 100 pb.

#### 7.4 Digestión enzimática

Se identificaron los fragmentos amplificados para el polimorfismo C677T, uno de 198 pb que representa el genotipo CC, el segundo de 175 pb y 23 pb que representa el genotipo TT y el genotipo CT de 198 pb y 175 pb. En la figura 14 se muestra un gel de agarosa con los tres genotipos que presenta este polimorfismo. Cabe mencionar, que debido a que se realizó la electroforesis en gel de agarosa, no se visualiza el fragmento de 23 pb debido a su menor tamaño a comparación de las otras bandas observadas, ya que migra mucho más rápido e incluso sale del gel. No obstante, observar el fragmento de 175 pb se asegura que la endonucleasa realizó el corte y por lo tanto se establece que existe la presencia del alelo mutado. La concentración y pureza de las muestras utilizadas se muestra en la Tabla 7.



**Figura 13.** Gel de agarosa al 2.5%. En los carriles 1,2,3 y 4 se observan 4 muestras con genotipo CC, en los carriles 4, 5, 6 y 7 se observan 4 muestras del genotipo CT, en los carriles 9, 10, 11 y 12 se observan 4 muestras del genotipo TT, en el carril 13 se observa un marcador de peso molecular de 100 pb.

**Tabla 7.** Concentración y pureza de los genotipos que se observan en el gel

No. Carril	No. Muestra	Concentración	Pureza	Genotipo
1	1136	155.14	1.817/2.266	<b>C/C</b>
2	1017	23.987	1.904/2.059	<b>C/C</b>
3	1019	202.91	1.726/1.898	<b>C/C</b>
4	654	75.955	1.710/1.927	<b>C/C</b>
5	2	61.493	1.719/1.670	<b>C/T</b>
6	24	60.231	1.712/1.645	<b>C/T</b>
7	44	66.947	1.814/2.121	<b>C/T</b>
8	50	23.987	1.904/2.059	<b>C/T</b>
9	972	157.9	1.742/2.239	<b>T/T</b>
10	985	279.15	1.823/3.634	<b>T/T</b>
11	1060	115.46	1.731/2.488	<b>T/T</b>
12	1098	209.07	1.510/1.673	<b>T/T</b>



**Tabla 8.** Genotipos del gen *MTHFR* obtenidos a partir de las muestras de pacientes con EM

	Genotipo C/T		Genotipo C/C		Genotipo T/T		
Número de muestra de registro del paciente	RAM 2	EM 924	EM 481.1	EM 1075	EM 111/555	EM 1090	
	RAM 16	EM 947	EM 654	EM 1076	EM 346	EM 1092	
	RAM 24	EM 950	EM 955	EM 1082	EM 521	EM 1093	
	RAM 26	EM 971	EM 1004	EM 1088	EM 673	EM 1098	
	RAM 42	EM 1014	EM 1019	EM 1091	EM 959	EM 1110	
	RAM 44	EM 1025	EM 1022	EM 1107	EM 972	EM 1111	
	RAM 50	EM 1027	EM 1023	EM 1112	EM 973	EM 1113	
	RAM 52	EM 1048	EM 1037	EM 1123	EM 985	EM 1117	
	RAM 57	EM 1061	EM 1050	EM 1132	EM 1017	EM 1118	
	Total (N=90)	RAM 66	EM 1062	EM 1058	EM 1136	EM 1021	EM 1120
		EM 87	EM 1065	EM 1059	EM 1154	EM 1035	EM 1125
		EM 296	EM 1073	EM 1067		EM 1060	EM 1127
		EM 354	EM 1121	EM 1071		EM 1066	EM 1128
		EM 465	EM 1131			EM 1077	EM 1133
		EM 470	EM 1165			EM 1079	EM 1158
		EM 754				EM 1087	EM 1162

Una vez que se obtuvieron los resultados de los tres polimorfismos, se obtuvieron las frecuencias genotípicas y alélicas para cada uno (Tabla 9).

**Tabla 9.** Frecuencia genotípica y alélica de los genotipos obtenidos

Frecuencia genotípica y alélica de pacientes		
Genotipo	Número	Frecuencia
CC	24/87	27.6%
CT	31/87	35.6%
TT	32/87	36.8%
Total	87	100%
Alelo	Número	Frecuencia
C	79	45.4%
T	95	54.6%
Total	174	100%

## 8. DISCUSIÓN

El gen MTHFR ha sido investigado por varias malformaciones congénitas. Este gen es muy polimórfico, el SNP más estudiado es 677C>T (rs1801133). Se conoce que este SNP da como resultado una disminución de la actividad catalítica de la enzima MTHFR, así como el proceso de metilación en el cual se ha demostrado un impacto significativo en varias enfermedades neurodegenerativas (Wu et al., 2013). Además, estudios han considerado que este SNP aumenta el riesgo de EM y es una importante causa de morbilidad. Como ya se había mencionado MTHFR, que depende del folato y la vitamina B12, codifica para una enzima fundamental en el metabolismo (Levin et al., 2014). Aneji et al., (2012) informaron que la deficiencia del gen MTHFR es la causa genética más común de hiperhomocisteinemia.

Varios estudios han informado que los pacientes con EM tienen niveles elevados de homocisteína en el plasma en comparación con pacientes sanos, y que promueve la activación y proliferación de la microglía (Besler y Çomog˘lu, 2003; Aksungar et al., 2008; Triantafyllou et al., 2008). Se ha demostrado que pacientes con EM tienen niveles elevados de Hcy que conduce a una disminución de la función cognitiva (Russo et al., 2008; Teunissen et al., 2008; Gorgone et al., 2009). Asimismo, otros estudios han revelado que los pacientes con EMPP y EMPS tienen niveles de Hcy significativamente más altos en su plasma en comparación con los pacientes y controles en etapa remnente-recurrente (Singhal et al., 2018; Oliveira et al., 2018). Además, una concentración significativamente mayor de Hcy homocisteína en el grupo EMSP en comparación con el grupo EMRR (Mititelu et al., 2021). Gardner et al., 2013 mostró que los niveles de metionina, SAM, SAH y vitamina B12 disminuyeron en plasma de pacientes con EM en diferentes etapas de la enfermedad. SAM tendió a ser más alta en el plasma de pacientes con EMPP y EMSP en comparación con los controles mientras que la concentración de SAH fue casi el doble en los controles en comparación con las muestras de enfermedad. Por el contrario, otros estudios no informaron diferencias significativas en los niveles de homocisteína entre los pacientes con EM y los controles (Teunissen et al 2008; Ramsaransing et al 2006).

Aunque numerosos estudios de casos y controles, así como metaanálisis han investigado la asociación entre C677T y la EM, no hay una conclusión definitiva o un enfoque único en México. La tabla 10 muestra la distribución del SNP C677T en diferentes poblaciones y diferentes patologías. En este estudio se identificaron los genotipos en 87 muestras de pacientes con EM, de los cuáles se obtuvieron 24 genotipos homocigotos silvestres CC, 31 genotipos heterocigotos CT y 32 genotipos homocigotos con la variante anormal TT con una frecuencia genotípica de 27.6%, 35.6% y 36.8% respectivamente; y una frecuencia alélica de 0.64 para el alelo T y 0.46 del alelo C.

Estos resultados contrastan con un estudio de 150 pacientes con EM realizado en Suecia con una frecuencia alélica del alelo T de 51.9%. Sin embargo, no mostró ninguna asociación entre el polimorfismo C677T y la EM ya que se encontró que la distribución de alelos y genotipos era casi idéntica en pacientes y controles (Huang et al., 1997). Tajouri et al., (2006) llevó a cabo un estudio de casos y controles acerca del polimorfismo C677T en 101 pacientes australianos con EM y encontraron que la frecuencia del alelo T (31.2%) no tenía diferencia significativa entre los pacientes con EM y el grupo control. No obstante, el alelo TT fue 1.5 veces más frecuente en comparación con el grupo control. En otro estudio realizado en una población alemana, que incluyeron 138 pacientes con EMRR (frecuencia alélica T de 26.8%) no se observó asociación entre el polimorfismo MTHFR C677T y la EM respecto al grupo control (Klotz et al., 2010). Del mismo modo Mrissa et al. (2013) en un estudio realizado con 80 pacientes tunecinos con EMRR la frecuencia del genotipo TT fue

más prevalente en el grupo control que en el grupo de pacientes (8.5 % frente a 3.75 %) sin embargo, no encontraron diferencias significativas. Además, Chorazy et al., 2019 realizaron un estudio de 174 pacientes con EMRR con un grupo control. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas de frecuencia alélica/genotípica entre los grupos estudiados.

Por otro lado, un estudio realizado por Alatab et al. (2011) encontraron que los sujetos del genotipo T/T tenían un riesgo 1.7 veces mayor de desarrollar EM que los otros dos genotipos. Un estudio en la población turca incluyó 130 pacientes con EM reportó diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias genotípicas y alélicas entre los pacientes con EM y los controles. Además, mostraron que el alelo T (32.3%) del polimorfismo C677T estaba asociado con la susceptibilidad a la EM en la población turca (Cevik, et al 2014). Naghibalhossaini et al., 2015 en la población del Sur de Irán encontró diferencias significativas en las frecuencias genotípicas entre los pacientes (CC, 35%; CT, 46.1 %; TT, 18.9 %) comparado con los controles (CC, 0.65 %; CT, 0.295 %; TT, 0.05 %). Asimismo, los pacientes con EM presentaron una frecuencia alélica mayor respecto a los controles, las personas que tienen el genotipo TT tienen un riesgo 6.23 veces mayor de desarrollar EM. Asimismo, Cakina et al. (2019) donde reportaron una frecuencia de los genotipos CC, CT y TT de 0.4, 0.375 y 0.225 respectivamente. La frecuencia del genotipo T/T para el polimorfismo MTHFR C677T fue significativamente mayor en los pacientes que en los controles, así como diferencias entre los controles y los pacientes con EM para las frecuencias alélicas del alelo T (41.3%).

Por otra parte, en estudios realizados sobre otras patologías hay discrepancias con relación al SNP C677T y la patogenia de la enfermedad. Cantu et al., (2004) encontraron una mayor frecuencia del genotipo mutado TT en pacientes con trombosis venosa cerebral (TVC) (22%) comparado con controles (10%) pero no hubo diferencias significativas. Los pacientes con mutación de la MTHFR y niveles bajos de folato presentaron los niveles más elevados de homocisteína. En un estudio realizado por Arauz et al. (2007) en el grupo de pacientes con disección de arteria cervical-cerebral (CCAD) la distribución del genotipo TT mostró una mayor frecuencia (10%) que entre los controles sanos (5%). Jara y colaboradores (2010) reportaron una frecuencia alélica T de 0.4896 en pacientes, el genotipo TT homocigoto fue más frecuente en los controles que en los pacientes. Sin embargo, no está asociado significativo con la disección espontánea de la arteria cervical. Por otro lado, Ruiz-Franco, et al. (2016) reportaron que el genotipo TT homocigoto fue más frecuente en los casos de CCAD que en los controles con una frecuencia alélica para el alelo T de 54%. Estos resultados mostraron una significación estadística entre los dos grupos. Un estudio con 199 pacientes con enfermedad de Graves realizado en China no mostró asociación significativa entre las frecuencias del alelo 667T entre los pacientes (52.3%) y en los controles (58.6%) (Mao et al., 2010).

**Tabla 10.** Frecuencias alélicas de la variante 677C>T (rs1801133) en distintas poblaciones

Estudio	País	México	Pacientes (N)	Pacientes TT (n)	Frecuencia alélica
Huang et al., 1997	Suecia	Esclerosis múltiple	150	85	51.9
Cantu et al., 2004	México	Trombosis cerebral venosa	55	10	22.2
Tajouri et al., 2006	Australia	Esclerosis Múltiple	101	16	31.2
Arauz et al., 2007	México	Diseción espontánea de la arteria cervical	37	4	10.0
Mao et al., 2010	China	Enfermedad de Graves	199	60	52.3
Jara et al., 2010	México	diseción espontánea de la arteria cervical	48	8	48.9
Klotz et al., 2010	Alemania	Esclerosis múltiple	138	10	26.8
Alatab et al., 2011	Irán	Esclerosis múltiple	194	15	28.8
Mrissa et al., 2013	África	Esclerosis múltiple	80	3	27.5
Cevik et al., 2014	Turquía	Esclerosis múltiple	130	42	32.3
Naghbalhossaini et al., 2015	Irán	Esclerosis múltiple	180	34	41.9
Ruiz-Franco, et al., 2016	México	Diseción de la arteria cervico-cerebral	100	28	54
Cakina et al., 2019	Turquía	Esclerosis múltiple	80	18	41.2
Choraży et al., 2019	Polonia	Esclerosis múltiple	174	13	26.7

## 9. CONCLUSIÓN

Se determinó la presencia del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en 87 pacientes mexicanos con esclerosis múltiple, desarrollando la técnica PCR-RFLP en las muestras estos; donde a través de una electroforesis se observaron los patrones de banda de los diferentes genotipos, en las muestras siendo el alelo T el que tuvo mayor frecuencia en este grupo estudiado. Estos resultados se pueden comparar en un futuro con grupos controles para determinar una asociación significativa entre el polimorfismo y la esclerosis múltiple.

## 10. REFERENCIAS

- Alfredsson, L., & Olsson, T. (2019). Lifestyle and environmental factors in multiple sclerosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 9(4), a028944 DOI: [10.1101/cshperspect.a028944](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028944)
- Amini, M. E., Shomali, N., Bakhshi, A., Rezaei, S., Hemmatzadeh, M., Hosseinzadeh, R., ... & Mohammadi, H. (2020). Gut microbiome and multiple sclerosis: New insights and perspective. *International Immunopharmacology*, 88, 107024. DOI: [10.1016/j.intimp.2020.107024](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107024)
- Aksungar, F. B., Topkaya, A. E., Yildiz, Z., Sahin, S., & Turk, U. (2008). Coagulation status and biochemical and inflammatory markers in multiple sclerosis. *Journal of Clinical Neuroscience*, 15(4), 393-397. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2007.02.090>
- Alatab, S., Hossein-nezhad, A., Mirzaei, K., Mokhtari, F., Shariati, G., & Najmafshar, A. (2011). Inflammatory profile, age of onset, and the MTHFR polymorphism in patients with multiple sclerosis. *Journal of molecular neuroscience*, 44, 6-11. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9486-y>
- Aneji, C. N., Northrup, H., & Sing Au, K. (2012). Deep sequencing study of the MTHFR gene to identify variants associated with myelomeningocele. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 94(2), 84-90. <https://doi.org/10.1002/bdra.22884>
- Arauz, A., Hoyos, L., Cantú, C., Jara, A., Martínez, L., García, I., ... & Alonso, E. (2007). Mild hyperhomocysteinemia and low folate concentrations as risk factors for cervical arterial dissection. *Cerebrovascular diseases*, 24(2-3), 210-214. DOI: 10.1159/000104479
- Armao D.M., & Bouldin T.W. (2021). Patología del sistema nervioso. Reisner H.M.(Ed.), *Patología. Un estudio de caso moderno*, 2e. McGraw Hill.
- Asci, A. E., & Karahalil, B. (2017). The role of folate dependent genetic susceptibility in the risk of multiple sclerosis. *Journal of Neurology and Neuroscience*, 8(3), 0-0 <https://doi.org/10.21767/2171-6625.1000189>
- Ascherio, A., & Munger, K. L. (2015). EBV and autoimmunity. *Epstein Barr Virus Volume 1*, 365-385. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_15)
- Attfield, K. E., Jensen, L. T., Kaufmann, M., Friese, M. A., & Fugger, L. (2022). The immunology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*, 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00718-z>
- Audiffred Jaramillo, R. I., García Cobián, T. A., García de Alba García, J. E., & Rubio Arellano, E. D. (2016). Asociación del polimorfismo MTHFR C677T con la predominancia sintomatológica en una muestra de pacientes con esquizofrenia de Jalisco, México. *Acta universitaria*, 26(1), 56-64. <https://doi.org/10.15174/au.2016.838>
- Baptista-González, H. (2000). Cartas al editor sobre coexistencia de las mutaciones C677T y A1298C en el gen MTHFR y eventos trombóticos. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 66(6), 582-585.

Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "polymerase chain reaction". *Encyclopedia Britannica*, 6 Jan. 2023, <https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction>. Accessed 12 January 2023.

Besler, H. T., & Çomog̃lu, S. (2003). Lipoprotein oxidation, plasma total antioxidant capacity and homocysteine level in patients with multiple sclerosis. *Nutritional neuroscience*, 6(3), 189-196. <https://doi.org/10.1080/1028415031000115945>

Binia, A., Contreras, A. V., Canizales-Quinteros, S., Alonzo, V. A., Tejero, M. E., & Silva-Zolezzi, I. (2014). Geographical and ethnic distribution of single nucleotide polymorphisms within genes of the folate/homocysteine pathway metabolism. *Genes & nutrition*, 9(5), 1-14. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12263-014-0421-7>

Buffone, G. J., & Darlington, G. J. (1985). Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clinical chemistry*, 31(1), 164-165. <https://doi.org/10.1093/clinchem/31.1.164>

Cakina, S., Ocağ, O., Ozkan, A., Yucel, S., & Ozısık Karaman, H. (2019). Relationship between genetic polymorphisms MTHFR (C677T, A1298C), MTR (A2756G) and MTRR (A66G) genes and multiple sclerosis: a case-control study. *Folia Neuropathologica*, 57(1), 36-40. <https://doi.org/10.5114/fn.2019.83829>

Cantu, C., Alonso, E., Jara, A., Martínez, L., Ríos, C., Fernandez, M. D. L. A., ... & Barinagarrementeria, F. (2004). Hyperhomocysteinemia, low folate and vitamin B12 concentrations, and methylene tetrahydrofolate reductase mutation in cerebral venous thrombosis. *Stroke*, 35(8), 1790-1794. DOI: 10.1161/01.STR.0000132570.24618.78

Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2016). *Recombinant DNA Technology*. *Biotechnology*, 63–95. doi:10.1016/b978-0-12-385015-7.00003-x

Celarain, N., & Tomas-Roig, J. (2020). Aberrant DNA methylation profile exacerbates inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis patients. *Journal of neuroinflammation*, 17(1), 1-17. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1667-1>

Cevik, B., Yigit, S., Karakus, N., Aksoy, D., Kurt, S., & Ates, O. (2014). Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism with multiple sclerosis in Turkish patients. *Journal of Investigative Medicine*, 62(8), 980-984. <http://dx.doi.org/10.1097/JIM.000000000000107>

Choraży, M., Wawrusiewicz-Kurylonek, N., Gościk, J., Posmyk, R., Czarnowska, A., Więsik, M., ... & Kułakowska, A. (2019). Association between polymorphisms of a folate–homocysteine–methionine–SAM metabolising enzyme gene and multiple sclerosis in a Polish population. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 53(3), 194-198. DOI: [10.5603/PJNNS.a2019.0019](https://doi.org/10.5603/PJNNS.a2019.0019)

Cree B.C., & Hauser S.L. (2022). Esclerosis múltiple. Loscalzo J, & Fauci A, & Kasper D, & Hauser S, & Longo D, & Jameson J(Eds.), *Harrison. Principios de Medicina Interna*, 21e. McGraw Hill.

Cifu, D. X. (2020). Braddom's physical medicine and rehabilitation E-book. Elsevier Health Sciences.

Chacon Cortes, D. F., & Griffiths, L. (2014). Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*, 2014(2), 1-9. <http://dx.doi.org/10.2147/BSAM.S46573>

Contreras-Cubas, C., Sánchez-Hernández, B. E., García-Ortiz, H., Martínez-Hernández, A., Barajas-Olmos, F., Cid, M., ... & Orozco, L. (2016). Heterogenous distribution of MTHFR gene variants among Mestizos and diverse Amerindian groups from Mexico. *PLoS One*, 11(9), e0163248. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163248>

Cotsapas, C. y Mitrovic, M. (2018). Estudios de asociación del genoma completo de la esclerosis múltiple. *Inmunología clínica y traslacional*, 7(6), e1018. <https://doi.org/10.1002/cti.2.1018>

Dávalos, I. P., Olivares, N., Castillo, M. T., Cantú, J. M., Ibarra, B., Sandoval, L., Morán, M. C., Gallegos, M. P., Chakraborty, R., & Rivas, F. (2000). The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in mexican mestizo and native populations. *Annals of General*, 43(2), 89-92.

Dardiotis, E., Arseniou, S., Sokratous, M., Tsouris, Z., Siokas, V., Mentis, A. F. A., ... & Brotis, A. (2017). Vitamin B12, folate, and homocysteine levels and multiple sclerosis: A meta-analysis. *Multiple sclerosis and related disorders*, 17, 190-197. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.msard.2017.08.004>Dargahi, N., Katsara, M., Tselios, T., Androutsou, M. E., De Courten, M., Matsoukas, J., & Apostolopoulos, V. (2017). Multiple sclerosis: immunopathology and treatment update. *Brain sciences*, 7(7), 78. <https://doi.org/10.3390/brainsci7070078>

Dashti, M., Ateyah, K., Alroughani, R., & Al-Temaimi, R. (2020). Replication analysis of variants associated with multiple sclerosis risk. *Scientific reports*, 10(1), 1-7. doi: [10.1038/s41598-020-64432-3](https://doi.org/10.1038/s41598-020-64432-3)

Degelman, M. L., & Herman, K. M. (2017). Smoking and multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis using the Bradford Hill criteria for causation. *Multiple sclerosis and related disorders*, 17, 207-216. DOI: 10.1016/j.msard.2017.07.020

Deeb, O., Salameh, S., & Atallah, A. (2022). Exploring the Effect of Genetic, Environmental and Lifestyle Factors on Multiple Sclerosis Susceptibility. In *Multiple Sclerosis-Genetics, Disease Mechanisms and Clinical Developments*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.105834

Dhaiban, S., Al-Ani, M., Elemam, N. M., Al-Aawad, M. H., Al-Rawi, Z., & Maghazachi, A. A. (2021). Role of peripheral immune cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Sci*, 3(1), 12. <https://doi.org/10.3390/sci3010012>

Dean, L. (2017). Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66131/#>

Dobson, R., & Giovannoni, G. (2019). Multiple sclerosis—a review. *European journal of neurology*, 26(1), 27-40. . DOI: 10.1111/ene.13819

Douglas V.C., & Aminoff M.J. (2022). Esclerosis múltiple. Papadakis M.A., & McPhee S.J., & Rabow M.W., & McQuaid K.R.(Eds.), *Diagnóstico clínico y tratamiento 2022*. McGraw Hill.

Ducker, G. S., & Rabinowitz, J. D. (2017). One-carbon metabolism in health and disease. *Cell metabolism*, 25(1), 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.009>

Esposito, S., Bonavita, S., Sparaco, M., Gallo, A., & Tedeschi, G. (2018). The role of diet in multiple sclerosis: A review. *Nutritional neuroscience*, 21(6), 377-390. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1303016>

Fagnani, C., Neale, M. C., Nisticò, L., Stazi, M. A., Ricigliano, V. A., Buscarinu, M. C., ... & Ristori, G. (2015). Twin studies in multiple sclerosis: A meta-estimation of heritability and environmentality. *Multiple Sclerosis Journal*, 21(11), 1404-1413. <https://doi.org/10.1177/1352458514564492>

Frosst, P., Blom, H. J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C. A., Matthews, R. G., ... & Rozen, R. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature genetics*, 10(1), 111-113. <https://doi.org/10.1038/ng0595-111>

Froese, D. S., Huemer, M., Suormala, T., Burda, P., Coelho, D., Guéant, J. L., ... & Baumgartner, M. R. (2016). Mutation update and review of severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Human mutation*, 37(5), 427-438. <https://doi.org/10.1002/humu.22970>

Froese, D. S., Kopec, J., Rembeza, E., Bezerra, G. A., Oberholzer, A. E., Suormala, T., ... & Yue, W. W. (2018). Structural basis for the regulation of human 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase by phosphorylation and S-adenosylmethionine inhibition. *Nature communications*, 9(1), 1-1313 <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04735-2>

Gardner, L. A., Desiderio, D. M., Groover, C. J., Hartzes, A., Yates, C. R., Zucker-Levin, A. R., ... & Levin, M. C. (2013). LC-MS/MS identification of the one-carbon cycle metabolites in human plasma. *Electrophoresis*, 34(11), 1710-1716. <https://doi.org/10.1002/elps.201200536>

Graves, J. S., Barcellos, L. F., Simpson, S., Belman, A., Lin, R., Taylor, B. V., ... & van der Mei, I. A. (2018). The multiple sclerosis risk allele within the AHI1 gene is associated with relapses in children and adults. *Multiple sclerosis and related disorders*, 19, 161-165. DOI: 10.1016/j.msard.2017.10.008

Goris, A., Vandebergh, M., McCauley, J. L., Saarela, J., & Cotsapas, C. (2022). Genetics of multiple sclerosis: lessons from polygenicity. *The Lancet Neurology*, 21(9), 830-842. DOI: 10.1016/S1474-4422(22)00255-1

Gorgone, G., Ursini, F., Altamura, C., Bressi, F., Tombini, M., Curcio, G., ... & Vernieri, F. (2009). Hiperhomocisteinemia, grosor íntima-media y polimorfismo del gen C677T MTHFR: un estudio de correlación en pacientes con deterioro cognitivo. *Atherosclerosis*, 206 (1), 309-313. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.02.028>

Hecker, M., Bühring, J., Fitzner, B., Rommer, P. S., & Zettl, U. K. (2021). Genetic, environmental and lifestyle determinants of accelerated telomere attrition as contributors to risk and severity of multiple sclerosis. *Biomolecules*, 11(10), 1510. <https://doi.org/10.3390/biom11101510>

Harirchian, M. H., Fatehi, F., Sarraf, P., Honarvar, N. M., & Bitarafan, S. (2018). Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Multiple sclerosis and related disorders*, 20, 43-47 DOI: 10.1016/j.msard.2017.12.015



Hosseini, A., Masjedi, A., Baradaran, B., Hojjat-Farsangi, M., Ghalamfarsa, G., Anvari, E., & Jadidi-Niaragh, F. (2019). Dimethyl fumarate: Regulatory effects on the immune system in the treatment of multiple sclerosis. *Journal of cellular physiology*, 234(7), 9943-9955. <https://doi.org/10.1002/jcp.27930>

Huang, W. X., He, B., & Hillert, J. (1997). A methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*, 4(2), 185-187. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.1997.tb00325.x>

Huizar, C. C., Raphael, I., & Forsthuber, T. G. (2020). Genomic, proteomic, and systems biology approaches in biomarker discovery for multiple sclerosis. *Cellular Immunology*, 358, 104219. . DOI: 10.1016/j.cellimm.2020.104219

IMSS. (23 de mayo de 2017). Esclerosis múltiple, enfermedad discapacitante en adultos jóvenes. México: IMSS. Recuperado de: <http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/201705/150>

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium\*†, ANZgene, IIBDGC, & WTCCC2. (2019). Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science*, 365(6460), eaav7188. DOI: 10.1126/ciencia.aav7188

Ionescu, R. B., Willis, C., Nicaise, A. M., Krzak, G., Hamel, R., Peruzzotti-Jametti, L., & Pluchino, S. (2023). Multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorders. In *Neurobiology of Brain Disorders* (pp. 575-608). Academic Press

Jangi, S., Gandhi, R., Cox, L. M., Li, N., Von Glehn, F., Yan, R., ... & Weiner, H. L. (2016). Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nature communications*, 7(1), 1-11 <https://doi.org/10.1038/ncomms12015>

Jara-Prado, A., Alonso, M. E., Ruano, L. M., Camacho, J. G., Leyva, A., Lopez, M., ... & Arauz, A. (2010). MTHFR C677T, FII G20210A, FV Leiden G1691A, NOS3 intron 4 VNTR, and APOE ε4 gene polymorphisms are not associated with spontaneous cervical artery dissection. *International Journal of Stroke*, 5(2), 80-85. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2010.00412.x>

Jones, P., Luccock, M., Scarlett, C. J., Veysey, M., & Beckett, E. L. (2019). Folate and inflammation—links between folate and features of inflammatory conditions. *Journal of nutrition & intermediary metabolism*, 18, 100104. <https://doi.org/10.1016/j.inim.2019.100104>

Kim, W., & Patsopoulos, N. A. (2022, January). Genetics and functional genomics of multiple sclerosis. In *Seminars in Immunopathology* (pp. 1-17). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s00281-021-00907-3>

Khosravi-Largani, M., Pourvali-Talatappeh, P., Rousta, A. M., Karimi-Kivi, M., Noroozi, E., Mahjoob, A., ... & Tavakoli-Yaraki, M. (2018). A review on potential roles of vitamins in incidence, progression, and improvement of multiple sclerosis. *Eneurologicalsci*, 10, 37-44. DOI: 10.1016/j.ensci.2018.01.007

Klotz, L., Farkas, M., Bain, N., Keskitalo, S., Semmler, A., Ineichen, B., ... & Linnebank, M. (2010). The variant methylenetetrahydrofolate reductase c. 1298A> C (p. E429A) is associated with multiple sclerosis in a German case-control study. *Neuroscience letters*, 468(3), 183-185. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.10.057>

- Kunkl, M., Frasca, S., Amormino, C., Volpe, E., & Tuosto, L. (2020). T helper cells: the modulators of inflammation in multiple sclerosis. *Cells*, 9(2), 482. DOI:10.3390/cells9020482
- Kurniawan, H., Kobayashi, T., & Brenner, D. (2021). The emerging role of one-carbon metabolism in T cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 68, 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.001>
- Laura, T., Servy Edouard, J., & Menezo Yves, J. R. (2019). The hazards of excessive folic acid intake in MTHFR gene mutation carriers: An obstetric and gynecological perspective. *Clin Obstet Gynecol Reprod Med*, 4, 1-2. DOI:10.15761/COGRM.1000215
- Levin, M. C., Douglas, J. N., Meyers, L., Lee, S., Shin, Y., & Gardner, L. A. (2014). Neurodegeneration in multiple sclerosis involves multiple pathogenic mechanisms. *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*, 49-63. DOI: [10.2147/DNND.S54391](https://doi.org/10.2147/DNND.S54391)
- Mao, R., Fan, Y., Zuo, L., Geng, D., Meng, F., Zhu, J., ... & Fu, S. (2010). Association study between methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and Graves' disease. *Cell biochemistry and function*, 28(7), 585-590. <https://doi.org/10.1002/cbf.1694>
- Liew, S. C., & Gupta, E. D. (2015). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *European journal of medical genetics*, 58(1), 1-10. DOI: 10.1016/j.ejmg.2014.10.004
- Lyon, P., Strippoli, V., Fang, B., & Cimmino, L. (2020). B vitamins and one-carbon metabolism: implications in human health and disease. *Nutrients*, 12(9), 2867. <https://doi.org/10.3390/nu12092867>
- Lublin, F. D., Reingold, S. C., Cohen, J. A., Cutter, G. R., Sørensen, P. S., Thompson, A. J., ... & Polman, C. H. (2014). Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*, 83(3), 278-286 DOI: <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000560>
- Macaron, G., & Ontaneda, D. (2019). Diagnosis and management of progressive multiple sclerosis. *Biomedicines*, 7(3), 56. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7030056>
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sanbrook, J. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory*, 11, 31.
- Milo, R. (2019). Therapies for multiple sclerosis targeting B cells. *Croatian medical journal*, 60(2), 87. doi: [10.3325/cmj.2019.60.87](https://doi.org/10.3325/cmj.2019.60.87)
- Mabhida, S. E., Muhamed, B., Sharma, J. R., Apalata, T., Nomatshila, S., Mabasa, L., ... & Johnson, R. (2022). Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism (rs1801133) and the Risk of Hypertension among African Populations: A Narrative Synthesis of Literature. *Genes*, 13(4), 631. <https://doi.org/10.3390/genes13040631>
- Ménézo, Y., Patrizio, P., Alvarez, S., Amar, E., Brack, M., Brami, C., ... & Viot, G. (2021). MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase: EC 1.5. 1.20) SNPs (single-nucleotide polymorphisms) and homocysteine in patients referred for investigation of fertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 38(9), 2383-2389. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02200-6>

Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A salting out method for DNA preparation. *Nucleic Acids Res*, 16(1215), 10-1093.

Mititelu, R. R., Albu, C. V., Bacanoiu, M. V., Padureanu, V., Padureanu, R., Olaru, G., ... & Balasoiu, M. (2021). Homocysteine as a predictor tool in multiple sclerosis. *Discoveries*, 9(3). doi: [10.15190/d.2021.14](https://doi.org/10.15190/d.2021.14)

Moreno-Torres, I., Sabín-Muñoz, J., & García-Merino, A. (2019). Multiple sclerosis: epidemiology, genetics, symptoms, and unmet needs. <https://doi.org/10.1039/9781788016070-00001>

Mrissa, N. F., Mrad, M., Klai, S., Zaouali, J., Sayeh, A., Mazigh, C., ... & Mrissa, R. (2013). Association of methylenetetrahydrofolate reductase A1298C polymorphism but not of C677T with multiple sclerosis in Tunisian patients. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 115(9), 1657-1660. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2013.02.025>

Naghbalhossaini, F., Ehyakonandeh, H., Nikseresht, A., & Kamali, E. (2015). Association between MTHFR genetic variants and multiple sclerosis in a southern Iranian population. *International journal of molecular and cellular medicine*, 4(2), 87 PMID: [26261797](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26261797/)

Niino, M., & Miyazaki, Y. (2017). Role of Vitamin D in Multiple Sclerosis Pathogenesis and Therapy. In *Nutrition and Lifestyle in Neurological Autoimmune Diseases* (pp. 71-80). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805298-3.00009-8>

O'Gorman, C., Lin, R., Stankovich, J., & Broadley, S. A. (2013). Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data. *Neuroepidemiology*, 40(1), 1-12. DOI: [10.1159/000341902](https://doi.org/10.1159/000341902)

Oliveira, S. R., Flauzino, T., Sabino, B. S., Kallaur, A. P., Alfieri, D. F., Kaimen-Maciel, D. R., ... & Simão, A. N. C. (2018). Elevated plasma homocysteine levels are associated with disability progression in patients with multiple sclerosis. *Metabolic brain disease*, 33, 1393-1399. DOI: [10.1007/s11011-018-0224-4](https://doi.org/10.1007/s11011-018-0224-4)

Ostrajovitch, EA y Tabibzadeh, S. (2019). Homocisteína y trastornos asociados a la edad. *Revisiones de investigaciones sobre el envejecimiento*, 49, 144-164. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.10.010>

Pan, L., Yin, Y., Chen, J., Ma, Z., Chen, Y., Deng, X., ... & Wu, K. (2019). Homocysteine, vitamin B12, and folate levels in patients with multiple sclerosis in Chinese population: A case-control study and meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 36, 101395. DOI: [10.1016/j.msard.2019.101395](https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.101395)

Petrone, I., Bernardo, P. S., Dos Santos, E. C., & Abdelhay, E. (2021). MTHFR C677T and A1298C polymorphisms in breast cancer, gliomas and gastric cancer: a review. *Genes*, 12(4), 587. <https://doi.org/10.3390/genes12040587>

Piehl, F. (2021). Current and emerging disease-modulatory therapies and treatment targets for multiple sclerosis. *Journal of internal medicine*, 289(6), 771-791. <https://doi.org/10.1111/joim.13215>

Pizzorno, J. E., & Murray, M. T. (2020). *Textbook of Natural Medicine-E-Book*. Elsevier Health Sciences.

Ramsaransing, G. S. M., Fokkema, M. R., Teelken, A., Arutjunyan, A. V., Koch, M., & De Keyser, J. (2006). Plasma homocysteine levels in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 77(2), 189-192. <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.2005.072199>

Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Esclerosis múltiple. *N Engl J Med*. (2018) 378:169–80. doi: 10.1056/NEJMra1401483 DOI: 10.1056/NEJMra1401483

Ropper A.H., & Samuels M.A., & Klein J.P., & Prasad S(Eds.), (2020). *Adams y Victor. Principios de neurología, 11e*. Esclerosis múltiple y otras enfermedades inflamatorias desmielinizantes. McGraw Hill.

Ruiz-Franco, A., Barboza, M. A., Jara-Prado, A., Canizales-Quinteros, S., Leon-Mimila, P., Arguelles-Morales, N., ... & Arauz, A. (2016). TGFBR2 mutation and MTHFR-C677T polymorphism in a Mexican mestizo population with cervico-cerebral artery dissection. *Journal of neurology*, 263, 1066-1073. <https://doi.org/10.1007/s00415-016-8101-8>

Russo, C., Morabito, F., Luise, F., Piromalli, A., Battaglia, L., Vinci, A., ... & Aguglia, U. (2008). Hyperhomocysteinemia is associated with cognitive impairment in multiple sclerosis. *Journal of neurology*, 255, 64-69. <https://doi.org/10.1007/s00415-007-0668-7>

Salazar, A., Sandoval, A., & Armendáriz, J. (2013). *Biología molecular Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. Ciudad de México: McGraw Hill Education.

Semmler, A., Moskau, S., Lutz, H., Meyer, P., & Linnebank, M. (2011). Haplotype analysis of the 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c. 1298A> C (E429A) polymorphism. *BMC Research Notes*, 4(1), 1-5. . <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-439>

Sen, M. K., Almuslehi, M. S., Shortland, P. J., Coorsen, J. R., & Mahns, D. A. (2020). Revisiting the pathoetiology of multiple sclerosis: has the tail been wagging the mouse?. *Frontiers in Immunology*, 11, 572186. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.572186>

-

Singhal, N. K., Freeman, E., Arning, E., Wasek, B., Clements, R., Sheppard, C., ... & McDonough, J. (2018). Dysregulation of methionine metabolism in multiple sclerosis. *Neurochemistry international*, 112, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.10.011>

Sontheimer, H. (2021). *Diseases of the nervous system*. Elsevier.

Strategy Growth Council, SGC, 2023) Revisado el 04/01/23 de: <https://www.thesgc.org/tep/mthfr>

Tajouri, L., Martin, V., Gasparini, C., Ovcarić, M., Curtain, R., Lea, R. A., ... & Griffiths, L. R. (2006). Genetic investigation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and catechol-O-methyltransferase (COMT) in multiple sclerosis. *Brain research bulletin*, 69(3), 327-331. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.01.005>

Tafti D, Ehsan M, Xixis KL. Multiple Sclerosis. [Updated 2022 Sep 7]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from:

Tempest, A., Veetil, S. K., Maharajan, M. K., Earl, J. C., Ngorsuraches, S., & Chaiyakunapruk, N. (2022). Genetic biomarkers in multiple sclerosis: An umbrella review of meta-analyses of observational studies. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 63, 103834. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2022.103834>

Teunissen, CE, Killestein, J., Kragt, JJ, Polman, CH, Dijkstra, CD y Blom, HJ (2008). Niveles séricos de homocisteína en relación con la progresión clínica en la esclerosis múltiple. *Diario de Neurología, Neurocirugía y Psiquiatría*, 79 (12), 1349-1353. <http://dx.doi.org/10.1136/innp.2008.151555>

Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., Comi, G., ... & Cohen, J. A. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*, 17(2), 162-173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)

Tizaoui, K. (2018). Multiple sclerosis genetics: Results from meta-analyses of candidate-gene association studies. *Cytokine*, 106, 154-164. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.10.024>

Tran, P., Leclerc, D., Chan, M., Pai, A., Hiou-Tim, F., Wu, Q., ... & Rozen, R. (2002). Multiple transcription start sites and alternative splicing in the methylenetetrahydrofolate reductase gene result in two enzyme isoforms. *Mammalian Genome*, 13(9), 483-492. <https://doi.org/10.1007/s00335-002-2167-6>

Triantafyllou, N., Evangelopoulos, ME, Kimiskidis, VK, Kararizou, E., Boufidou, F., Fountoulakis, KN, ... & Vassilopoulos, D. (2008). Aumento de los niveles de homocisteína en plasma en pacientes con esclerosis múltiple y depresión. *Anales de Psiquiatría General*, 7 (1), 1-5. <https://doi.org/10.1186/1744-859X-7-17>

Tüzmen, Ş., Baskın, Y., Feyda Nursal, A., Eraslan, S., Esemem, Y., Çalibaşı, G., ... Hızel, C. (2018). *Techniques for Nucleic Acid Engineering. Omics Technologies and Bio-Engineering*, 247–315. doi:10.1016/b978-0-12-804659-3.00014-2

Van der Windt, M., Schoenmakers, S., van Rijn, B., Galjaard, S., Steegers-Theunissen, R., & van Rossem, L. (2021). Epidemiology and (patho) physiology of folic acid supplement use in obese women before and during pregnancy. *Nutrients*, 13(2), 331. <https://doi.org/10.3390/nu13020331>

Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R. A., ... & Baneke, P. (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS. *Multiple Sclerosis Journal*, 26(14), 1816-1821. <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1352458520970841>

Wan, L., Li, Y., Zhang, Z., Sun, Z., He, Y., & Li, R. (2018). Methylenetetrahydrofolate reductase and psychiatric diseases. *Translational psychiatry*, 8(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0276-6>

Waubant, E., Lucas, R., Mowry, E., Graves, J., Olsson, T., Alfredsson, L., & Langer-Gould, A. (2019). Environmental and genetic risk factors for MS: an integrated review. *Annals of clinical and translational neurology*, 6(9), 1905-1922 DOI: 10.1002/acn3.50862

Webb, L. M., & Guerau-de-Arellano, M. (2017). Emerging role for methylation in multiple sclerosis: beyond DNA. *Trends in molecular medicine*, 23(6), 546-562. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.04.004>

Weile, J., Kishore, N., Sun, S., Maaieh, R., Verby, M., Li, R., ... & Roth, F. P. (2021). Shifting landscapes of human MTHFR missense-variant effects. *The American Journal of Human Genetics*, 108(7), 1283-1300. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.05.009>

Wu, Y. L., Ding, X. X., Sun, Y. H., Yang, H. Y., & Sun, L. (2013). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T/A1298C polymorphisms and susceptibility to Parkinson's disease: a meta-analysis. *Journal of the neurological sciences*, 335(1-2), 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.09.006>

Yadav, M., Ali, S., Shrode, R. L., Shahi, S. K., Jensen, S. N., Hoang, J., ... & Mangalam, A. K. (2022). Multiple sclerosis patients have an altered gut mycobiome and increased fungal to bacterial richness. *PloS one*, 17(4), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264556>

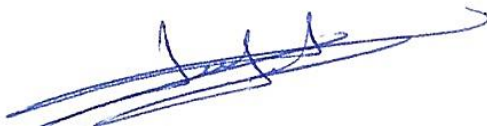
Yuan, S., Xiong, Y., & Larsson, S. C. (2021). An atlas on risk factors for multiple sclerosis: a Mendelian randomization study. *Journal of neurology*, 268(1), 114-124. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-10119-8Z>

Zarranz Imirizaldu, J. J. (Ed.). (2018). *Neurología*. Elsevier Health Sciences.

Zhou, Y., Simpson Jr, S., Charlesworth, J. C., Van Der Mei, I., Lucas, R. M., Ponsonby, A. L., ... & Taylor, B. V. (2017). Variation within MBP gene predicts disease course in multiple sclerosis. *Brain and behavior*, 7(4), e00670. DOI: 10.1002/brb3.670

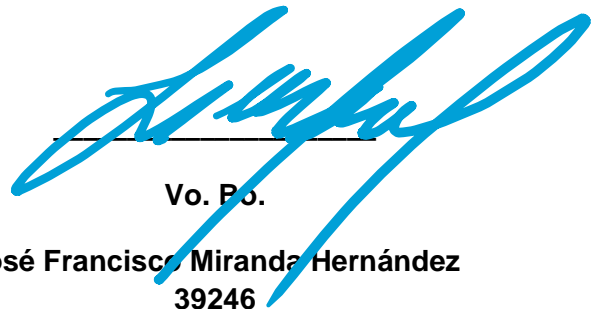
Zhou, X., Baumann, R., Gao, X., Mendoza, M., Singh, S., Sand, I. K., ... & Baranzini, S. E. (2022). Gut microbiome of multiple sclerosis patients and paired household healthy controls reveal associations with disease risk and course. *Cell*, 185(19), 3467-3486. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.08.021>

Zhou, Y., Graves, J. S., Simpson, S., Charlesworth, J. C., Van Der Mei, I., Waubant, E., ... & Taylor, B. V. (2017). Genetic variation in the gene LRP2 increases relapse risk in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 88(10), 864-868. <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp-2017-315971>



Vo. Bo.

**Aurelio Jara Prado 4450675**



Vo. Po.

**José Francisco Miranda Hernández  
39246**