

Polimorfismo de proteína 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa en población venezolana

Polymorphisms proteína 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa in venezuelan people

Chacin, Mary Carmen; Bravo, Martha; Arends, Anabel



 Mary Carmen Chacin
mchacin50@hotmail.com
Universidad Central de Venezuela, Venezuela

 Martha Bravo
marthabravo@hotmail.com
Universidad Central de Venezuela, Venezuela

 Anabel Arends
anabel.arends@gmail.com
Universidad Central de Venezuela, Venezuela

Revista Digital de Postgrado
Universidad Central de Venezuela, Venezuela
ISSN-e: 2244-761X
Periodicidad: Cuatrimestral
vol. 12, núm. 2, e367, 2023
revistadpmeducv@gmail.com

Recepción: 08 Mayo 2023
Aprobación: 03 Julio 2023

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/101/1014218006/>

DOI: <https://doi.org/10.37910/RDP.2023.12.2.e367>

©Los autores, 2023



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional.

Cómo citar:: Chacin M, Bravo M, Arends, A. Polimorfismo de proteína 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa en población venezolana. *Rev. Digit Postgrado*.2023;12(2):e367. doi:10.37910/RDP.2023.12.2.e367

Resumen: El folato es un miembro del grupo de la vitamina B y está relacionado con enfermedades crónicas como anemia megaloblástica, enfermedad cardiovascular, cáncer, disfunción cognitiva y riesgo de defectos del tubo neural. La proteína 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) juega un papel clave en el metabolismo del folato mediante la síntesis de nucleótidos y reacciones de metilación. El gen MTHFR se encuentra en el cromosoma 1 (1p36.3), y se han descrito dos alelos comunes, el alelo C677T (termolábil) y el alelo A1298C. El objetivo de este estudio es evaluar la distribución de los polimorfismos genéticos en MTHFR C677T y A1298C en la población venezolana. **MÉTODOS:** estudio de tipo transversal, descriptivo, experimental y correlacional. Las muestras de sangre se colectaron en 314 donantes no emparentados y sanos de la población. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) MTHFR 677C>T y 1298A>C se analizaron mediante polimorfismo de longitud de fragmento de restricción de reacción en cadena de polimerasa (PCR-RFLP). El desequilibrio de ligamiento (LD) entre pares de SNP se calculó mediante la prueba X. usando Prism 5 (GraphPad software, Inc). **RESULTADOS:** Encontramos mayor frecuencia genotípica de heterocigotos para el polimorfismo MTHFR C677T en la población general venezolana, con excepción del grupo caucásico. El polimorfismo MTHFR A1298C en el 70% de la población de estudio es homocigoto de tipo salvaje, encontrándose una baja frecuencia de homocigoto mutado. **CONCLUSIONES:** Se encontraron diferencias significativas entre grupos étnicos, destacando la importancia del genotipado racial de estos polimorfismos en la población venezolana.

Palabras clave: MTHFR C677T, MTHFR A1298C, Polimorfismo, Farmacogenética, Población venezolana, PCR-RFLP.

Abstract: Folate is a member of the vitamin B and it has also been indicated that may be related to chronic diseases such as megaloblastic anemia, cardiovascular disease, cognitive dysfunction and risk of neural tube. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) is a key enzyme of folate pathway by nucleotide synthesis and methylation reactions. Several polymorphisms were reported in MTHFR gene but C677T and A1298 polymorphism are most studied and these have been reported to be risk factor for several diseases/

disorders. The present study was designed to determine the frequency of *MTHFR* polymorphisms in Venezuelan healthy population. METHODS: The blood samples were collected from 314 unrelated and healthy donors from population. Both the *MTHFR* 677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms (SNPs) were analyzed by Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Linkage disequilibrium (LD) between pair of SNPs was calculated through the χ^2 test using Prism 5 (GraphPad software, Inc). RESULTS: We find higher genotypic frequency of heterozygotes for the *MTHFR* C677T polymorphism in the Venezuelan general population, with the exception of the Caucasian group. *MTHFR* A1298C polymorphism in 70% of the study population is homozygous wild type, finding a low frequency of homozygous mutated. CONCLUSIONS: Significant differences between ethnic groups were found, highlighting the importance of racial genotyping of these polymorphisms in the Venezuelan population.

Keywords: *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, Polymorphism, Pharmacogenetics, Venezuelan population, PCR-RFLP.

INTRODUCCION

El folato es un miembro del grupo de la vitamina B y es abundante en el hígado y en los vegetales. Su ausencia conduce a la anemia megaloblástica y actúa como una coenzima para el metabolismo de carbono. También, ha sido reportado que el estado nutricional del folato puede estar relacionado con enfermedades tales como las cardiovasculares, el cáncer y la disfunción cognitiva. Los resultados también han revelado que la ingesta materna de ácido fólico reduce el riesgo de defectos del tubo neural^(1,2).

El gen de la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (NAD(P)H) o gen *MTHFR* (OMIM: 607093) está ubicado en el brazo corto (p) del cromosoma 1 (ubicación citogenética: 1p36.22). Va desde 11.785.729 pares de bases (pb) hasta 11.806.102 pb (GRCh38, NCBI) y su longitud total es de 20.374 pb y consta de 11 exones. El gen *MTHFR* codifica una enzima, la metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*; EC 1.5.1.20) compuesta por 656 aminoácidos y un peso molecular de 74.597 Da. La metilentetrahidrofolato reductasa es importante para una reacción química que involucra formas de la vitamina folato (vitamina B9)⁽³⁾. Dicha enzima cataliza la conversión de 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-MTHF) a 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF). Esta reacción es necesaria para la remetilación del aminoácido homocisteína (Hcy) a metionina. Aunque se describieron varias mutaciones, los SNP (polimorfismos de un solo nucleótido) 677C>T (rs1801133) y 1298A>C (rs1801131) son las dos mutaciones más comunes en el gen *MTHFR*. El polimorfismo común de un solo nucleótido de los alelos 677C>T y 1298A>C en el gen *MTHFR* disminuye la actividad de la enzima⁽³⁾.

Dos polimorfismos frecuentes en el gen *MTHFR* humano confieren un deterioro funcional moderado de la actividad de *MTHFR* para individuos mutantes homocigóticos. Con respecto al polimorfismo *MTHFR* 677C>T, los resultados de los ensayos *in vitro* mostraron una disminución de la actividad enzimática al 65 % para el estado heterocigoto y al 30 % para el estado homocigoto de la variante 677T⁽⁴⁾. Para el polimorfismo 1298A>C, la actividad enzimática *in vitro* está disminuida en las variantes homocigóticas y, en menor medida, en las heterocigóticas en comparación con las homocigóticas para el alelo de tipo salvaje⁽⁵⁾.

El 677C>T se encuentra en el dominio catalítico de la proteína, mientras que el 1298A>C se encuentra en el presunto dominio regulador⁽⁵⁾.

La deficiencia grave de MTHFR, el error congénito más común del metabolismo del folato, produce hiperhomocisteinemia, homocistinuria e hipometionemia. Muchos de los polimorfismos del gen MTHFR alteran o disminuyen la actividad de la metilentetrahidrofolato reductasa, lo que provoca un aumento de la homocisteína en la sangre⁽³⁾. El folato es un nutriente esencial para un buen funcionamiento del organismo cobrando mayor relevancia durante el embarazo. Su metabolismo es complejo ya que tiene participación en diversas rutas metabólicas relacionadas en la síntesis de compuestos de importancia biológica⁽⁶⁾. Aunque se desconocen los mecanismos exactos, su deficiencia genera implicaciones graves que afectan tanto a la madre como al recién nacido al alterar procesos claves en esta etapa como es la síntesis y reparación del DNA así como la estabilidad y funcionalidad (expresión génica y mutaciones) del mismo, afectando también la síntesis de proteínas y otros compuestos e incrementando el estrés oxidativo⁽⁶⁾. La disminución del folato y el aumento de los niveles plasmáticos de Hcy están asociados con una variedad de afecciones comunes, tales como enfermedades cardiovasculares⁽⁷⁾, defectos del tubo neural^(6,8), labio o paladar hendido⁽⁹⁾, hipertensión⁽¹⁰⁾, preeclampsia y complicaciones del embarazo^(11,12), trombosis⁽¹³⁾, trisomía 21⁽¹⁴⁾, depresión /esquizofrenia^(15,16), autismo⁽¹⁷⁾, neuropatía diabética⁽¹⁸⁾, ACV isquémico⁽¹⁹⁾ y enfermedades gastrointestinales⁽²⁰⁾, entre otras.

Estas son algunas razones importantes para estudiar los polimorfismos de MTHFR en las poblaciones e investigar las asociaciones de enfermedades, ya sea mediante estudios de genes candidatos o estratificando la población por grupos étnicos. Una investigación a gran escala en varias poblaciones del mundo, estudió polimorfismos y mostró diferencias entre las frecuencias de los genotipos según el tipo de población⁽²¹⁾.

Por tal motivo es imperativo estudiar estos polimorfismos MTHFR en la población venezolana, teniendo en cuenta la heterogeneidad étnica, a fin de tener base de partida para posteriores estudios asociados con enfermedades. El objetivo del presente estudio fue determinar los genotipos MTHFR y sus frecuencias en población sana venezolana.

METODOS

El protocolo de esta investigación fue presentado y aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario de Caracas, con fecha 20 de julio de 2012. Se realizó un estudio de tipo transversal, descriptivo, experimental y correlacional.

Población: La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales, Instituto Anatómico "José Izquierdo", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. El genotipado se realizó en 314 individuos voluntarios sanos de diferentes regiones de Venezuela. Los individuos que participaron en este estudio pertenecen a diferentes grupos étnicos: amerindios, africanos, mestizos y caucásicos y no estaban relacionados entre sí.

Análisis de los polimorfismos C677T y A1298C del gen MTHFR: El ADN genómico se extrajo de sangre periférica completa de acuerdo con el método previamente propuesto por Miller et al.⁽²²⁾ con pequeñas modificaciones. El análisis de los polimorfismos más comunes en el gen MTHFR (677 C>T y 1298 A>C) se realizó mediante la amplificación por PCR de la región afectada y la digestión con enzimas del producto de restricción de la PCR (RFLP) según lo descrito por Frosst et al.⁽⁴⁾ y Van der Put et al.⁽⁵⁾.

Análisis Estadístico: Se probó si las frecuencias de genotipo estaban de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) usando la prueba χ^2 usando Prism 5 (GraphPad software, Inc). Todos los grupos étnicos estudiados estaban en HWE.

RESULTADOS

Para el genotipo MTHFR 677 se obtuvo un fragmento de 198 pares de bases (pb) y el producto de PCR se expuso durante la noche a 37°C a la enzima de restricción (HinfI) y luego se observaron los fragmentos digeridos en un gel de agarosa al 3%. Adultos humanos homocigóticos (CC) para el alelo normal MTHFR produjeron un fragmento de 198 pares de bases (pb); el heterocigoto (CT), un patrón de tres fragmentos de 198, 175 y 23 pb, y el homocigoto para la mutación (TT) produjo dos fragmentos de 175 y 23 pb.

De manera similar, para el genotipo MTHFR 1298 se obtuvo un fragmento de 163 pares de bases (pb) y el producto de PCR se expuso durante la noche a 37°C a la enzima de restricción (MboII) y luego los fragmentos digeridos se observaron en un gel de agarosa al 3%. La mutación 1298(A→C) suprime un sitio de restricción MboII. La digestión del fragmento de 163 pb del genotipo AA da cinco fragmentos, de 56, 31, 30, 28 y 18 pb, mientras que el genotipo CC da como resultado 4 fragmentos, a saber, 84, 31, 30 y 18 pb.

Los análisis preliminares mostraron que los polimorfismos A1298C y C677T estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg. La frecuencia de genotipos del polimorfismo MTHFR C677T en población venezolana se muestra en la Tabla 1. La genotipificación del polimorfismo MHTFR C677T se observó distribuida de manera similar entre homocigotos (CC) y heterocigotos (CT) de tipo salvaje en la población general, con menor frecuencia para homocigotos mutantes (TT). Entre las diferentes etnias en Venezuela se observaron variaciones significativas, pero similares a los valores de la población general. Se obtuvo una mayor frecuencia de CT de genotipo heterocigoto en las poblaciones amerindia y africana con respecto a las demás. Los caucásicos tuvieron una mayor frecuencia del genotipo CC homocigoto de tipo salvaje.

TABLA 1.
Frecuencias del genotipo MTHFR C677T en población venezolana

Población	N	Genotipo			χ^2	Valor-P
		CC	CT	TT		
Amerindios	112	41 (0.36)	56 (0.50)	15 (0.13)	0.220	0.896
Africanos	52	19 (0.3654)	23 (0.4423)	10 (0.1923)	0.163	0.922
Mestizos	50	23 (0.46)	23 (0.46)	4 (0.08)	0.223	0.894
Caucásicos	100	49 (0.49)	41 (0.41)	10 (0.10)	0.022	0.989
General	314	132 (0.42)	143 (0.46)	39 (0.12)	0.064	0.968

Los Valores-P fueron calculados por χ^2 (2df), alfa < 0.05

El genotipado del polimorfismo MHTFR A1298C mostró diferencias significativas en su distribución en la población general venezolana, Tabla 2. En la población general venezolana se encontró en mayor proporción la frecuencia genotípica homocigota tipo salvaje (AA) mientras que se observó una baja frecuencia de genotipos mutantes. En cuanto a la distribución en los grupos étnicos se observaron resultados interesantes, en los amerindios se detectó la mayor frecuencia (94%) de genotipo AA homocigoto y no se detectó mutante homocigoto (CC). Africanos y mestizos mostraron frecuencias similares de genotipos.

TABLA 2.
Frecuencias del genotipo MTHFR A1298C en población venezolana

Población	N	Genotipo			χ^2	Valor-P
		AA	AC	CC		
Amerindios	108	101 (0.94)	7 (0.06)	N.D		
Africanos	53	38 (0.71)	14 (0.26)	1 (0.03)	0.0	1.0
Mestizos	49	32 (0.653)	16 (0.326)	1 (0.021)	0.047	0.976
Caucásicos	100	48 (0.48)	39 (0.39)	13 (0.13)	0.735	0.692
General	310	219 (0.70)	76 (0.25)	15 (0.05)	2.83	0.243

N.D: No Determinado

Los Valores-P fueron calculados por χ^2 (2df), alfa < 0.05

DISCUSIÓN

La población venezolana es muy heterogénea en sus orígenes, a través de la inmigración europea de países mediterráneos tales como España, Portugal e Italia principalmente, africanos y amerindios posteriormente mezclados. Las variedades étnicas venezolanas se han clasificado en amerindia, africana, mestiza (europea/amerindia) y caucásica. Estas características representan una población interesante para estudiar los polimorfismos de genes metabolizadores de xenobióticos como MHTFR.

Los estudios en población del polimorfismo MTHFR C677T muestran que tiene una frecuencia variada según la etnia. El 10-15% de caucásicos y japoneses son homocigotos para este polimorfismo, los países mediterráneos tienen una mayor frecuencia mientras que es baja en afroamericanos. A su vez este polimorfismo homocigoto se ha asociado con altas concentraciones plasmáticas de homocisteína, un riesgo de enfermedad cardiovascular, cáncer de colon y leucemia⁽²³⁾. La población mexicana y colombiana son las que presentan una mayor frecuencia de genotipo homocigoto, 22,5% y 25,3% respectivamente, (2-30% distribución global) y el rango para la población latinoamericana es 1,2-25,3%⁽²⁴⁾.

Este estudio encontró en cuatro grupos étnicos de Venezuela, una frecuencia de homocigotos mutantes (TT) del 12%, similar a la de distribución latinoamericana. El grupo de origen africano tiene la mayor frecuencia (19,3%), lo que contrasta mucho con la frecuencia informada de homocigotos TT para las poblaciones africanas y negras brasileñas (1-2%)⁽²¹⁾.

Con respecto a la frecuencia de heterocigotos en población mundial, ésta va del 5 al 45%, mayormente se ha observado en el rango del 30% como en algunos países europeos, EEUU, Australia y Japón. Italia tiene la frecuencia alélica más alta y los africanos subsaharianos la más baja⁽²¹⁾. Un estudio del polimorfismo de MTHFER C677T a gran escala mostró una frecuencia general (CT) entre todas las poblaciones estudiadas de 32,7%, en donde los hispanos blancos tienen la frecuencia más alta (48,5%), seguidos por los amerindios (34,4%), caucásicos (32,7%), asiáticos (22,9%) y, con menor frecuencia, población afroamericana (10%)⁽²¹⁾. Sozen et al., reportaron una frecuencia del 47% del genotipo heterocigoto MTHFR C677T en población control del noroeste de Venezuela⁽⁹⁾.

Los hallazgos de este estudio mostraron una frecuencia global de heterocigotos MTHFR 677(CT) del 45,92%, cuya distribución tiene una presencia significativa en los cuatro grupos étnicos estudiados. Estos resultados sugieren que la frecuencia de heterocigotos MTHFR C677T en la población venezolana está por encima del nivel promedio de la población mundial y el grupo de origen africano tiene una frecuencia de heterocigotos (44,23%) superior a otras poblaciones africanas reportadas⁽²¹⁾.

En el genotipado de MTHFR A1298C, se encontró una frecuencia muy baja de homocigotos mutantes CC (5%) en la población general, cuya distribución fue para el grupo de origen africano de 3%, para mestizos de 2,1% y para amerindios de 0%, lo que sugiere que la población venezolana presenta una frecuencia de homocigotos CC baja en comparación con la población mundial, a excepción del grupo caucásico que fue de un 13%.

La mutación A1298C está asociada con una leve reducción en la actividad de MTHFR in vivo e in vitro, y se ha sugerido que está asociada con un mayor riesgo de defectos del tubo neural⁽⁸⁾. Robien y Ulrich, publicaron un estudio de referencia en frecuencia de homocigotos CC 1298, donde reportan el valor más alto para la población alemana caucásica (10,7%), japonesa (3,7%), africana (4,38%) y el rango de distribución global fue de 1, 4-12,8%⁽²⁴⁾. En población hispanoamericana hay reportes de población mexicana con una frecuencia de homocigotos CC 1298 de 2,2%⁽⁸⁾. Sozen et al., reportaron 3% de frecuencia de CC 1298 y 24% para heterocigotos AC en la población control del noroeste de Venezuela⁽⁹⁾.

Robien y Ulrich, reportaron frecuencias de heterocigotos MTHFR 1298C>T del 30 al 56% en población global, africanos (34,2%), caucásicos alemanes (45,15%), japoneses (30,8%), entre otras poblaciones estudiadas⁽²⁴⁾. Los heterocigotos MTHFR 1298A>C encontrados en este estudio mostraron una frecuencia en la población general venezolana de 25%, por debajo del promedio mundial, con diferencia significativa entre grupos étnicos, ya que presentaron diferente frecuencia en amerindios (6%), africanos (26%), mestizos (32,6%) y caucásicos (39%). Estos resultados tan variados demuestran la importancia del genotipado en diferentes grupos étnicos en la población venezolana.

CONCLUSIONES

En conclusión, encontramos heterogeneidad de los genotipos polimorfismos de MTHFR estudiados en la población venezolana sana, por su diversidad étnica y singularidad que ha sido comparada a nivel mundial. Este estudio da una referencia al conocimiento previo de las frecuencias genotípicas de la población control venezolana y abre la puerta a futuras investigaciones que justifiquen asociaciones de estos polimorfismos con diversas enfermedades frecuentes en nuestra población.

REFERENCIAS

1. Ebara S. Nutritional role of folate. *Congenit Anom.* 2017; 57:138–141.
2. McNulty H, Ward M, Hoey L, Hughes C, Pentieva K. Addressing optimal folate and related B-vitamin status through the lifecycle: health impacts and challenges. *Procs Nutr Soc.* 2019; 78:449–462.
3. Nefic H, Mackic-Djurovic M, Eminovic I. The Frequency of the 677C>T and 1298A>C Polymorphisms in the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene in the Population. *Med Arch.* 2018; 72(3):164-169.
4. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics.* 1995; 10(5):111–113.
5. Van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink J a, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet.* 1998; 62(5):1044–1051.
6. Manivel RA. Fولاتos: Metabolismo y Defectos del Tubo Neural. *REB.* 2021; 40(2):41-47.
7. Raghubeer S, Matsha TE. Methylenetetrahydrofolate (MTHFR), the One-Carbon Cycle, and Cardiovascular Risks. *Nutrients.* 2021; 13:4562.
8. Aranda CI, Bobadilla L, Corona A, Cuero I, Santana J, Baldomero A, et al. MTHFR C677T and A1298C variants in Mexican Mestizo infants with neural tube defects from Western Mexico. *Congenit Anom.* 2021; 61(5):188-192.

9. Sözen MA, Tolarova MM, Spritz RA. The common MTHFR C677T and A1298C variants are not associated with the risk of non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela. *J Genet Genomics*. 2009; 36(5):283–288.
10. Xu J, Zhang X, Zhao L, Han Q. Correlation between hypertension and high homocysteine levels caused by the MTHFR C677T gene polymorphisms. *Asian J of S*. 2022; 45:1039-1040.
11. Ding G, Yan L, Gao J, Wang W, Wang H, Bai G. Associations between AGT, MTHFR, and VEGF gene polymorphisms and preeclampsia in the Chinese population. *Placenta*. 2022; 118:38-45.
12. Kaldygulova L, Ukybassova T, Aimagambetova G, Gaiday A, Tussupkaliyev. A Biological Role of Folic Acid in Pregnancy and Possible Therapeutic Application for the Prevention of Preeclampsia. *Biomedicines*. 2023; 11:272.
13. Lupi E, Soto ME, Lugo AJ, Núñez ME, Gamboa R, Huesca C, et al. Polymorphisms C677T and A1298C of MTHFR Gene: Homocysteine Levels and Prothrombotic Biomarkers in Coronary and Pulmonary Thromboembolic Disease. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2019; 25:1-8.
14. Azevedo CT, Duarte JR, Silva SV, Coppedè F, Almeida MG. Association between MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms and maternal risk for Down syndrome. *Medicine (Baltimore)*. 2022; 101(3):282-293.
15. Wan L, Yuhong L, Zhang Z, Sun Z, He Y, Li R. 2,3 Methylene tetrahydrofolate reductase and psychiatric diseases. *Translational Psychiatry*. 2018; 8:242.
16. Stengler M. The Role of Folate and MTHFR Polymorphisms in the Treatment of Depression. *Altern Ther Health Med*. 2021; 27(2):53-57.
17. Li Y, Qiu S, Shi J, Guo Y, Li Z, Cheng Y and Liu Y. Association between MTHFR C677T/A1298C and susceptibility to autism spectrum disorders: a meta-analysis. *BMC Pediatrics*. 2020;20:449
18. Guan H, Xia MD, Wang M, Guan YJ, Lyu XC. Methylene tetrahydrofolate reductase genetic polymorphism and the risk of diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Medicine*. 2020;99:35.
19. Jin M, Wang N, Li X, Zhang H, Zhou J, Cong M, et al. Relationship between MTHFR C677T, homocysteine, and ischemic stroke in a large sample of the Han Chinese population. *Medicine*. 2022;101:38.
20. Ratajczak A, Szymczak-Tomczak A, Rychter A, Zawada A, Dobrowolska A, Krela-Kazmierczak I. Does Folic Acid Protect Patients with Inflammatory Bowel Disease from Complications? *Nutrients* 2021;13:4036.
21. Cross DS, Ivacic LC, Stefanski EL, McCarty CA. Population based allele frequencies of disease associated polymorphisms in the Personalized Medicine Research Project. *BMC Genet*. 2010; 11:51.
22. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res*. 1988; 16(3):1215.
23. Schwahn B, Rozen R. Polymorphisms in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: clinical consequences. *Am J Pharmacogen*. 2001; 1:189–201.
24. Robien K, Ulrich CM. 5,10-Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: A Huge minireview. *Am J of Epidemiol*. 2003;157 (7): 571–582.