

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar el título de
BACTERIÓLOGA



ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO C677T DEL GEN
METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (*MTHFR*) EN POBLACION
AMERINDIA

Por
ANA VIVIANA CAVIEDES AVENDAÑO

Director

Dr. JAIME EDUARDO BERNAL VILLEGAS, MD, PhD

Director Instituto de Genética Humana,
Pontificia Universidad Javeriana

Codirectora

Dra. PAOLA ANDREA AYALA RAMIREZ, Bac, MSc

Profesora e Investigadora Instituto de Genética Humana PUJ

Asesores

Dr. REGGIE GARCIA ROBLES

MD, PhD

Docente e Investigador
Universidad del Bosque

Dra. MARIA CLAUDIA NOGUERA

Bac, PhD

Profesora e investigadora Instituto
Genética Humana PUJ

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

BOGOTÁ, D.C

NOVIEMBRE DE 2012

**ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO C677T DEL GEN
METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (MTHFR)
EN POBLACION AMERINDIA**

ANA VIVIANA CAVIEDES AVENDAÑO

**Dra. Ingrid Schuler, Biol. PhD
DECANA ACADEMICA**

**Dra. Diana Patiño, Bact.
DIRECTORA DE CARRERA**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

AGRADECIMIENTOS

A Dios por acompañarme, guiarme y darme la fortaleza en los buenos y malos momentos a lo largo de mi carrera y mi vida.

Al Instituto de Genética Humana y a todas las personas que trabajan en él, especialmente a los Doctores Jaime Bernal, Paola Ayala, María Claudia Noguera y Reggie García, por su acompañamiento, apoyo, confianza y aportarme sus conocimientos en el desarrollo de mi trabajo de grado.

A la Doctora Luisa Gutiérrez y la Doctora Luz Amparo Maldonado por sus excelentes consejos y apoyo.

A mis padres y a mi hermano por estar conmigo y darme apoyo en el todo el transcurso de mi vida y el desarrollo de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Tabla de contenido.....	6
Índice de Tablas.....	9
Índice de Figuras.....	9
Simbología.....	10
RESUMEN	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
3. OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivo general.....	14
3.2 Objetivos Específicos.....	14
4. MARCO TEÓRICO.....	15
4.1 METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA	
- METIONINA.....	15
4.1.1 Folatos.....	16
4.1.2 Metilentrahidrofolato Reductasa.....	17
4.1.2.1 Asociación de polimorfismos de MTHFR	
con patologías.....	18
4.2 Etnografía de las poblaciones estudiadas.....	18
4.2.1 Coreguaje.....	19
4.2.2 Embera.....	20
4.2.3 Waunana.....	20

5.	METODOLOGÍA.....	21
5.1	DISEÑO DE INVESTIGACION.....	21
5.1.1	Población de Estudio y Muestra.....	21
5.1.2	Tamaño de muestra.....	21
5.2	MUESTREO POBLACIONES INDÍGENAS.....	21
5.2.1	Cuantificación de DNA.....	21
5.2.2	Dilución de DNA.....	21
5.2.3	Amplificación del DNA.....	21
5.2.4	Digestión enzimática de productos amplificados del DNA.....	22
5.2.5	Electroforesis.....	22
5.2.6	Revelado.....	22
5.2.7	Frecuencias alélicas y genotípicas.....	23
5.2.8	Análisis de datos.....	23
5.2.8.1	Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	23
5.2.8.2	Distancias Genéticas.....	24
6	RESULTADOS.....	28
6.1	Análisis de distribución alélica y genotípica de la población.....	24
6.2	Distancias Genéticas.....	27
7.	DISCUSIÓN.....	28
7.1	Polimorfismo MTHFR C677T.....	28
7.2	Distancias Genéticas.....	33

8	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	34
9	BIBLIOGRAFÍA.....	35
10	ANEXOS.....	39
	Anexo 1. Protocolo Amplificación de DNA.....	39
	Anexo 2. Protocolo Digestión enzimática de productos amplificados del DNA.....	40

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución alélica y genotípica polimorfismo C677T.....	26
Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo MTHFR C677T a nivel mundial.....	29
Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo MTHFR C677T en población amerindia.....	30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la vía metabólica de la Homocisteína.....	15
Figura 2. Distribución geográfica comunidades Coreguaje Embera y Waunana.....	19
Figura 3. Distribución genotípica del polimorfismo C677T.....	25
Figura 4. Filograma por UPGMA de las poblaciones en estudio más población outgroup.....	27

SIMBOLOGÍA

- AR: Artritis Reumatoidea
- ATP: AdenosilTrifosfato
- BHMT: Homocisteínametil-transferasa
- C β S: Cistationina β sintasa
- CL: Cistationina - γ -liasa
- Cys: Cisteína
- Cysta: Cistationina
- EAP: Enfermedad acidopéptica
- EDA: Enfermedad Diarreica Aguda
- IRA: Infección Respiratoria Aguda
- IVU: Infecciones de vías urinarias
- MAT: Metionina Adenosiltransferasa
- MS: Metionina Sintasa
- MSR: Metionina SintasaReductasa
- MT: Metiltransferasa
- MTHF: 5-Metiltetrahidrofolato
- MTHFR: 5,10- Metilentetrahidrofolatoreductasa
- OAD: Osteoartritis degenerativa
- PPI: Poliparasitismo intestinal

RESUMEN

Introducción: Una de las enzimas más importantes en la vía de la homocisteína-metionina es la 5,10-metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR), la cual cataliza la formación de 5-metilentetrahidrofolato a partir de 5,10-Metilentetrahidrofolato en la vía de la remetilación de la homocisteína para obtener metionina. El gen de esta enzima se denomina *MTHFR*. La homocisteína es un aminoácido sulfurado derivado del metabolismo de la metionina, importante para el crecimiento celular, proliferación celular, y regulación de la expresión génica. **Objetivo:** Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en las poblaciones Coreguaje, Embera y Waunana de Colombia y establecer relaciones filogenéticas entre las diferentes comunidades estudiadas. **Métodos:** Se utilizó la técnica de PCR para amplificar el exón 1 de la MTHFR en el cual se encuentra ubicado el polimorfismo, y por medio de la técnica de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) se evidenció la presencia o no del polimorfismo. El estudio se realizó mediante el equilibrio de Hardy-Weinberg y distancias genéticas. **Resultados:** Las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas de las comunidades Coreguaje, Embera y Waunana fueron: genotipo 677CC 0,13, 677CT 0,55 y 677TT 0,32 siendo la comunidad de Waunana la de mayor frecuencia de genotipo TT (0,42). Se presentó una frecuencia mayor del alelo C en la comunidad Coreguaje de 0,1 y 0,66 del alelo T en la comunidad Waunana. **Conclusión:** Los resultados de este estudio son los primeros reportados en comunidades amerindias colombianas, generando un gran impacto por sus elevadas frecuencias genotípicas y alélicas. La distancia genética es más corta entre las comunidad que se encuentran más cerca geográficamente, y sean de la misma familia lingüística. **Palabras clave:** *Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR), frecuencias alélicas y genotípicas, distancia genética.*

1. INTRODUCCIÓN

La homocisteína es un aminoácido sulfurado derivado del metabolismo de la metionina, importante para el crecimiento celular, proliferación celular, y regulación de la expresión génica, ya que participa en la síntesis de ácidos nucleicos y genera metionina para la síntesis de proteínas y reacciones de metilación (ADN e histonas). Esta vía metabólica necesita vitaminas y cofactores, dependiendo de las vitaminas cobalamina (Vitamina B12), piridoxina (Vitamina B6), riboflavina (vitamina B2) y ácido fólico (Vitamina B9). Una de las enzimas más importantes en la vía de la homocisteína-metionina es la 5,10-metilentetrahidrofolato Reductasa, la cual cataliza la formación de 5-metilentetrahidrofolato a partir de 5,10-Metilentetrahidrofolato en la vía de la remetilación de la homocisteína para obtener metionina. El gen de esta enzima se denomina *MTHFR* y se encuentra en el locus 1p36.3.

En 1988 Kang reportó una variante del gen *MTHFR*, la cual producía un cambio de una citosina por una timina en la posición 677, sustituyendo una valina por una alanina en la proteína; este polimorfismo se asocia con un aumento de los niveles de homocisteína total en plasma (Hiperhomocisteinemia) siendo un factor de riesgo para enfermedad vascular, malformaciones en el feto y complicaciones en el embarazo (Desprendimiento de la placenta, aborto espontáneo).

En Colombia no existen estudios de la frecuencia que tiene este polimorfismo en comunidades indígenas colombianas, por esta razón se realizó este estudio, en el que se incluyó las comunidades Coreguaje, Embera y Wuanana, analizadas en la Gran Expedición Humana (1992-1993).

El método empleado fue la amplificación de fragmentos de ADN, digestión enzimática y posterior visualización en gel de agarosa y poliacrilamida, finalmente se procedió al análisis de los resultados obtenidos teniendo en cuenta las frecuencias alélicas y genotípicas de cada comunidad, y análisis de distancias genéticas con la construcción de árboles filogenéticos.

2. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enzima *MTHFR* cataliza la formación de 5-MTHF a partir de 5,10- MTHF en la vía de la remetilación para obtener metionina (Fonseca, 1999), cuando se produce un cambio de una citosina por una timina en la posición 677, se ve afectada la síntesis de proteínas y reacciones de metilación (ADN e histonas) (Couce, 2007). En estudios epidemiológicos en población colombiana, la presencia del polimorfismo es alta (Bermúdez, 2006). Este polimorfismo se ha asociado con enfermedades complejas, entre ellas complicaciones en el embarazo (Desprendimiento de placenta, preeclampsia, defectos del tubo neural y aborto espontáneo), hiperhomocisteínemia como factor de riesgo para enfermedad vascular, y déficit de folato (Fohr, 2002). El desarrollo de este trabajo, nos permite estimar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en las comunidades indígenas Coreguaje, Embera y Waunana.

Este trabajo se basa en determinar las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en las comunidades Coreguaje, Embera y Waunana, y establecer las relaciones filogenéticas entre ellas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en las poblaciones Coreguaje, Embera y Waunana de Colombia y establecer relaciones filogenéticas entre las diferentes comunidades estudiadas.

3.2 Objetivos Específicos:

- Calcular las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en la población Coreguaje.
- Calcular las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en la población Embera.
- Calcular las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en la población Waunana.
- Establecer la relación filogenética de las comunidades Coreguaje, Embera y Waunana por medio de la construcción de árboles filogenéticos.

4. MARCO TEORICO

4.1 METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA - METIONINA

La Homocisteína es un aminoácido sulfurado derivado de la metionina, su metabolismo depende de la cobalamina (Vitamina B12), piridoxina (Vitamina B6), riboflavina (vitamina B2) y ácido fólico (Vitamina B9) (Llevadot, 2005). El valor de referencia de la concentración de Homocisteína en plasma es de 10 $\mu\text{mol/L}$ (Menéndez, 1999) o de 17 a 30 μM (Bermúdez, 2006).

La formación de Homocisteína a partir de Metionina se produce mediante una reacción catalizada por la enzima MAT en presencia de ATP produciendo S-Adenosilmetionina, seguido de S-Adenosilhomocisteína catalizada por la enzima MT, la cual en presencia de agua es hidrolizada a homocisteína finalmente. (Llevador, 2005; Stam, 2005).

Ya constituida la homocisteína, esta es metabolizada a través de dos vías: (Menéndez, 1999, Llevadot, 2005, Fonseca, 1999) **(Figura 1)**

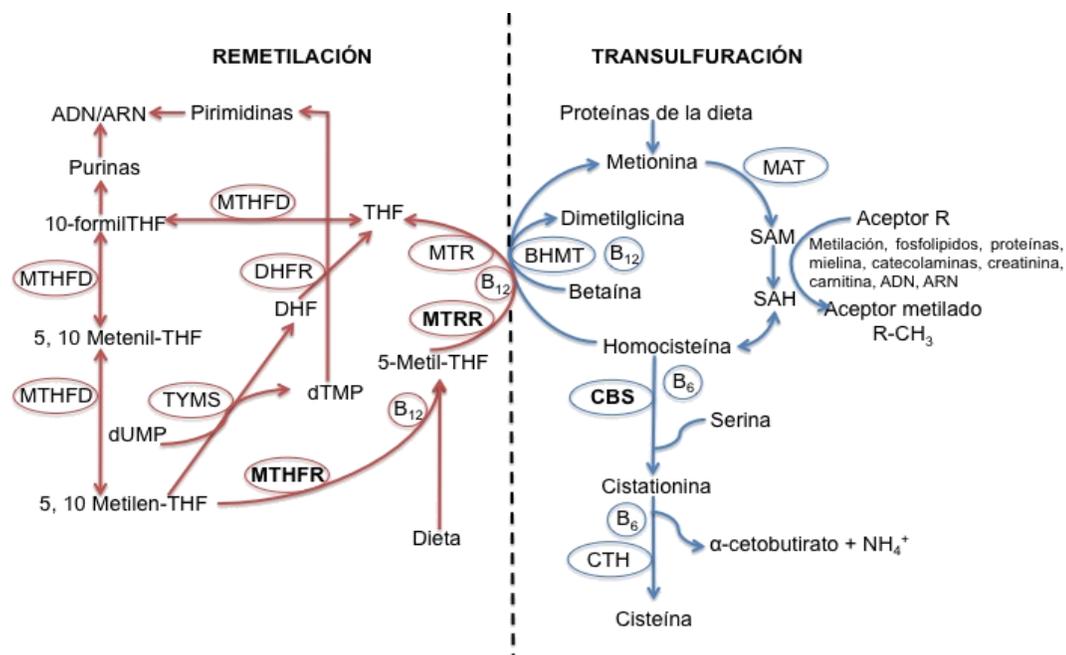


Figura 1. Esquema de la vía metabólica de la homocisteína. (De Luis et al., 2004; Gellekink et al., 2005; Sanchez et al., 2006).

1. En la vía de la **remetilación** se obtiene metionina a partir de la homocisteína mediante dos vías dependientes de Vitamina B12 (Cobalamina) y Vitamina B9 (Ácido Fólico) (Couce, M).
 - Remetilación catalizada por la Metionina Sintasa: La enzima MTHFR cataliza la reducción de 5,10-MTHF a 5-MTHF, la cual es activada por la Metionina sintasareductasa (Couce, M).
 - Remetilación catalizada por la betaína: BHMT, esta se localiza en el hígado y riñón principalmente (Couce, M).

2. En la vía de la **transulfuración** se obtiene Cys a partir de la homocisteína mediante dos reacciones dependientes de vitamina B6.
 - La cisteína se forma a partir de la Cysta procedente de la condensación de la Homocisteína. Esta reacción es catalizada por la enzima CβS.
 - A partir de la Cys se obtiene cisteína y α-cetobutirato. Esta reacción es catalizada por la enzima CL

4.1.1 Folatos

Los folatos son un grupo de compuestos de la vitamina B9 presentes en algunos alimentos como verduras, frutos secos y legumbres, una forma soluble, ácido fólico, es suministrado en suplementos vitamínicos. (González, 2002).

La principal forma activa y circulante de los folatos es el 5-MTHF, unido inespecíficamente a la transferrina, albúmina y alfa-macroglobulina. Los monoglutamatos, como el 5-MTHF pueden ser almacenados

intracelularmente por medio de la enzima folilpoliglutamato-sintetasa, la cual conjuga a poliglutamato o ser dirigido hacia la generación de ácido 5,6,7,8 – tetrahidrofólico (THF) (González, 2002).

El THF participa en la síntesis de pimidinas por medio de la 5,10-MTHF y de purinas por medio del 10-formil-THF; también participa en el ciclo metabólico de la metionina confiriendo un papel importante en el sistema nervioso central, ya que la metionina en su forma activa (S-adenosilmetionina (SAM)), principal donador de grupos metilo en diversas reacciones de metilación, los grupos metilos son captados por la homocisteína para generar metionina (González, 2002). Finalmente el metabolismo del folato y la homocisteína-metionina participan en la síntesis de ácidos nucleicos (proliferación y crecimiento celular, reparación del ADN), producción de metionina (síntesis de proteínas), y reacciones de metilación (regulación de la expresión génica) (González, 2002).

4.1.2 Metilentetrahidrofolato Reductasa

La *MTHFR* es una enzima de 77kDa, que cataliza la reacción que produce 5-MTHF a partir de 5,10-metilentetrahidrofolato, donde la vitamina B12 actúa como cofactor de la metionina sintasa, la *MTHF* es importante en la vía de la remetilación para obtener metionina a partir de homocisteína. (Fonseca, 1999).

En 1988 Kang reportó la variante termolábil de la *MTHFR*, la cual tenía un cambio puntual en la posición 677 ubicado en 1p36.3 (Couce, 2007), en el que se producía un cambio de una citosina por una timina, sustituyendo una valina por una alanina en la proteína (Menéndez, 2005), alterando la síntesis

de metionina y de ácidos nucleicos (Couce, 2007). En condiciones de homocigosis, esta variante se ha asociado con algunas patologías (p. ej. hiperhomocisteinemia, enfermedades cardiovasculares, entre otras). (Chillemi, 2005).

4.1.2.1 Asociación del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* con patologías

El polimorfismo C677T del gen *MTHFR* se asocia con un aumento en los niveles de homocisteína total en el plasma (Hiperhomocisteinemia), debido a los bajos niveles de vitamina B12 permitiendo que el folato destinado para la síntesis de ADN quede secuestrado en el ciclo de metilación siendo estos un factor de riesgo asociado a alteraciones del sistema nervioso central, a enfermedad vascular, cáncer y complicaciones en el embarazo, entre ellos, desprendimiento de placenta, aborto espontáneo o defectos del tubo neural. (Chillemi, 2005).

4.2 ETNOGRAFÍA DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS

La Gran Expedición Humana tuvo comienzo el 12 de Octubre de 1992 y finalizó el 14 de Junio de 1993 (Bernal, J., *Cifras*), en ella se analizaron diversas comunidades negras (Bellavista, Isla de Providencia y San Basilio de Palenque) y nativas (Embera, Waunana, Guane-Butaregua, Wayuu, Coreguaje, Huitoto, entre otras 16 comunidades (Bernal, J., *Comunidades*). Las comunidades del presente estudio son Coreguaje, Embera y Waunana **(Figura 2)**.

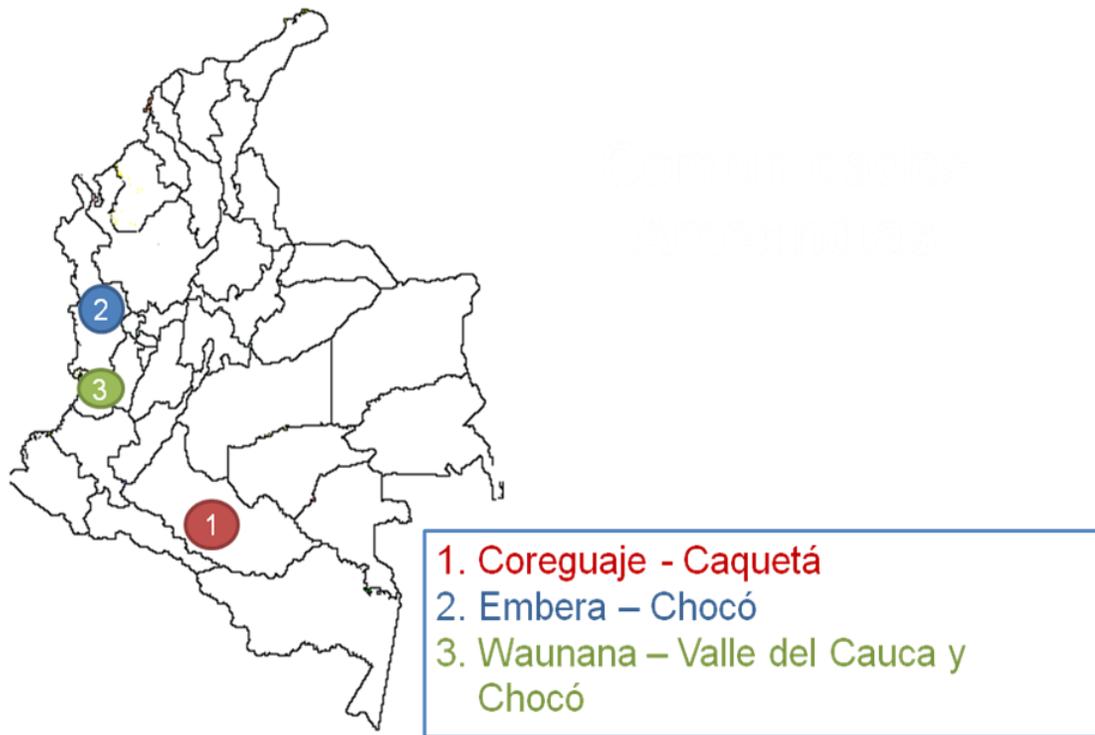


Figura 2. Distribución geográfica comunidades Coreguaje, Embera y Waunana.

4.1.1 Coreguaje

Ubicados en el piedemonte y parte de la llanura Amazónica, distribuidos en 14 asentamientos a lo largo de los ríos Caquetá, Ortegaza y Peneya; sus viviendas están hechas en guaduas, pisos en tierra y techo de palma, con una o dos habitaciones. No existe el servicio de luz ni el manejo adecuado de desechos, su principal actividad es la agricultura (Cultivo de yuca brava, plátano, café, cacao, chontaduro, frutales, etc), caza y pesca (Bernal, J., 12 ed).

La entidad con mayor morbilidad es el poliparasitismo intestinal con un 35%, seguido de infección respiratoria aguda en un 17%, enfermedad diarreica aguda 8%, Cefalea y dolor lumbar 5%, infecciones en piel 4%, enfermedad acidopéptica – embarazo – artritis reumatoidea- osteoartritis degenerativa 3%. (Bernal, J., 12 ed).Se analizaron 185 indígenas (Bernal,J., 6th ed).

4.2.2 Embera

Ubicados en la Costa pacífica colombiana, la comunidad Embera-Epena está ubicada en la ribera del río Guanguí, la entidad con mayor morbilidad es el poliparasitismo intestinal con 16%, seguido de enfermedad acidopéptica 10%, cefaleas-infecciones en piel con 6%, TBC – IRA 5%, finalmente infecciones de vías urinarias- anemias- y traumas en tejidos blandos 2% (Bernal, J., 12 ed), se analizaron los datos de 215 indígenas Embera-Epena (Bernal,J., 6th ed).

La segunda comunidad Embera, es la comunidad Embera de Salinas, se encuentra ubicada en la ribera del río Atrato, al igual de la comunidad Embera-Epena la entidad con mayor morbilidad es el poliparasitismo intestinal 21% (Bernal, J., 12 ed), y 154 indígenas Embera en salinas (Bernal,J., 6th ed).

4.2.3 Waunana

Ubicados en el departamento del Chocó a la ribera del río San Juan, su principal actividad es la agricultura, caza y pesca, la principal entidad de morbilidad es el poliparasitismo intestinal con un 24% (Bernal, J., 12 ed), se encuentran distribuidos en 9 comunidades que comprenden 459 familias y 2219 habitantes, se analizaron los datos de 129 indígenas (Bernal,J., 6th ed).

5 METODOLOGÍA

5.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACION

5.1.1 Población de Estudio y Muestra

La población universo de este estudio, comprende individuos de las comunidades amerindias Coreguaje, Embera y Waunana de Colombia de la expedición humana (Bernal, J., *Cifras*) realizada por el Instituto de Genética Humana de la Universidad Javeriana en un periodo comprendido entre 1992 y 1993.

5.1.2 Tamaño de la Muestra

Se analizan 49 muestras de la Comunidad Embera, 50 muestras de la comunidad de Coreguaje y 50 muestras Waunana (n total= 149 muestras).

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia.

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 Cuantificación de DNA

Se realizó por espectrofotometría en una dilución 1:20 de cada muestra de DNA (95ul de agua + 5ul DNA) utilizando como blanco 100ul de agua destilada. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 260nm para el DNA (ng/ul) y se tuvo en cuenta la relación 260nm/280nm para estimar la pureza de la muestra de DNA.

5.2.2 Dilución de DNA

Se realizó una dilución con agua destilada con el fin de que la concentración final de cada muestra sea 44 ng de DNA.

5.2.3 Amplificación del DNA (Anexo 1)

Las condiciones experimentales de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fueron las siguientes: Denaturación inicial por 4 minutos a 95°C, seguido 35 ciclos - 30 segundos, denaturación a 95°C, anillamiento 62°C, elongación a 72°C, y elongación final a 72°C por 10 minutos; los primers usados para la amplificación del exón 1 fueron: Forward: 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' y Reverse: 5-AGGACGGTGCGGTGAGTG-3'

5.2.4 Digestión enzimática de productos de PCR (Anexo 2)

Con la enzima de restricción utilizada *Tag I* se obtiene un fragmento 198 pares de bases (pb). Los fragmentos digeridos esperados son C/C 198pb/198pb (Heterocigotos sin polimorfismo), C/T 198pb/173pb (Heterocigoto), T/T 173pb/173pb (Homocigoto con polimorfismo).

Las condiciones experimentales de la digestión enzimática del exón 1 fueron las siguientes: Enzima *Tag I*, Temperatura: 65°C, Tiempo: 4 horas.

5.2.5 Electroforesis

La muestra se sembró (10ul) en un gel de Poliacrilamida en concentración 30:1 a 150w y fue chequeado para detección de fragmentos de 198pb para el alelo C y 173 para el alelo T.

5.2.6 Revelado

Los fragmentos de DNA fueron visualizados con luz ultravioleta (UV) y fotografiados. Para la detección de los fragmentos cortados con enzimas de restricción, fue utilizado gel de poliacrilamida y posteriormente la visualización se realizó en Luzultravioleta con Bromuro de Etidio.

5.2.7 Frecuencias alélicas y genotípicas

Las frecuencias genotípicas se realizaron a partir de las frecuencias absolutas obtenidas del número de individuos de cada uno de los tres posibles genotipos para el polimorfismo (Homocigoto con polimorfismo (CC), heterocigoto (CT) y homocigoto con polimorfismo (TT)) por medio de conteo manual, una vez obtenidas las frecuencias absolutas se procede a calcular la frecuencia relativa, dividiendo el número de individuos por genotipo entre el total de individuos por cada comunidad.

Las frecuencias alélicas se determinaron por conteo directo mediante la siguiente fórmula, a partir de los 2 alelos que posee el polimorfismo, teniendo en cuenta que un individuo homocigoto sin polimorfismo tiene dos alelos iguales (CC), un individuo heterocigoto solo tiene un par de alelos diferentes (CT) y finalmente un individuo homocigoto con polimorfismo tiene dos alelos iguales (TT) mediante la siguiente fórmula:

$$FA = \frac{\text{Número de alelos}}{\text{Número total de alelos}}$$

5.2.8 Análisis de datos

5.3.8.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg:

Se calculó el Equilibrio de Hardy-Weinberg en cada una de las poblaciones (Coreguaje, Embera y Waunana) por medio del programa “GENPOP 4.1”

5.3.8.2 Distancias Genéticas:

Se realizó el análisis con la construcción de árboles filogenéticos. Se entiende como distancia genética al equivalente a la heterocigocidad esperada para datos diploides, se define como la probabilidad de que dos haplotipos escogidos aleatoriamente sean diferentes en la muestra, se calculó según Nei, 1987 así:

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

Dónde:

n = Número de copias génicas en la muestra

k = Número de haplotipos

Pi= Frecuencia del i-thaplotipo

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 DISTRIBUCIÓN ALÉLICA Y GENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN

A continuación se muestran los patrones de digestión obtenidos del polimorfismo en estudio, que permitieron realizar la genotipificación de la población (**Figura 3**).

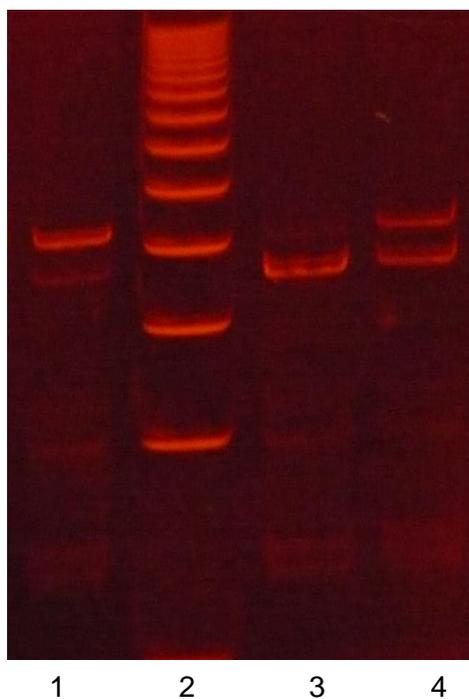


Figura 3. Distribución genotípica del polimorfismo MTHFR C677T. Fotografía del gel de poliacrilamida al 12%, patrón de digestión del producto amplificado con la enzima TaqI. 1: Homocigoto sin polimorfismo C/C. 2: Marcador de Peso Molecular. 3: Homocigoto para el gen mutado T/T. 4: Heterocigoto C/T.

A partir de las variantes analizadas de *MTHFR* de 149 individuos pertenecientes a las comunidades Embera, Coreguaje y Waunana de Colombia, se obtuvieron las siguientes variantes genotípicas y alélicas (**Tabla 1**).

Para el genotipo 677CC el promedio entre las tres comunidades, la frecuencia obtenida fue de 0,13 del cual Coreguaje presentó un mayor número de población sin polimorfismo con 11 individuos (0,22). Del total del genotipo 677CT se registró un promedio de frecuencia de 0,55, la comunidad

Embera con una frecuencia de 0,59, seguida de Coreguaje con 0,58. Finalmente para el genotipo polimórfico 677TT el promedio de la frecuencia observada fue de 0,32 siendo la comunidad de Waunana con mayor número de individuos que presentan el polimorfismo con 0,42 de frecuencia genotípica TT.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas de las comunidades Coreguaje ($p=0,396$), Embera ($p=0,072$) y Waunana ($p=0,760$).

Respecto a las frecuencias alélicas, se encontró que del alelo C la comunidad de Coreguaje presenta una mayor frecuencia con 0,51, mientras que del alelo T, la comunidad Waunana presento la mayor frecuencia con 0,66.

Genotipos Observados (n=149)

COMUNIDAD	C/C		C/T		T/T		TOTAL	
	COREGUAJE	11	0,22	29	0,58	10	0,20	50
EMBERA	3	0,06	29	0,59	17	0,35	49	1
WAUNANA	5	0,10	24	0,48	21	0,42	50	1
TOTAL	19	0,13	82	0,55	48	0,32	149	

COMUNIDAD	Frecuencia Alélica		*EHW
	C	T	
COREGUAJE	0,51	0,49	$p= 0,396$
EMBERA	0,36	0,64	$p= 0,072$
WAUNANA	0,34	0,66	$p= 0,760$

Tabla 1. Distribución alélica y genotípica polimorfismo MTHFR C677T en comunidades amerindias (*Equilibrio de Hardy-Weinberg)

6.2 DISTANCIA GENÉTICA

Mediante el uso de los valores de F_{st} de las poblaciones de interés y una población outgroup (Charlotte 2002), se determinaron las distancias genéticas entre ellas, por medio del Software Arlequín 3.01, usando el método de UPGMA (**Figura 4**).

	COREGUAJE	EMBERA	WAUNANA
COREGUAJE	0,00000	0,01126	0,02984
EMBERA	0,01126	0,00000	-0,00313
WAUNANA	0,02984	-0,00313	0,00000

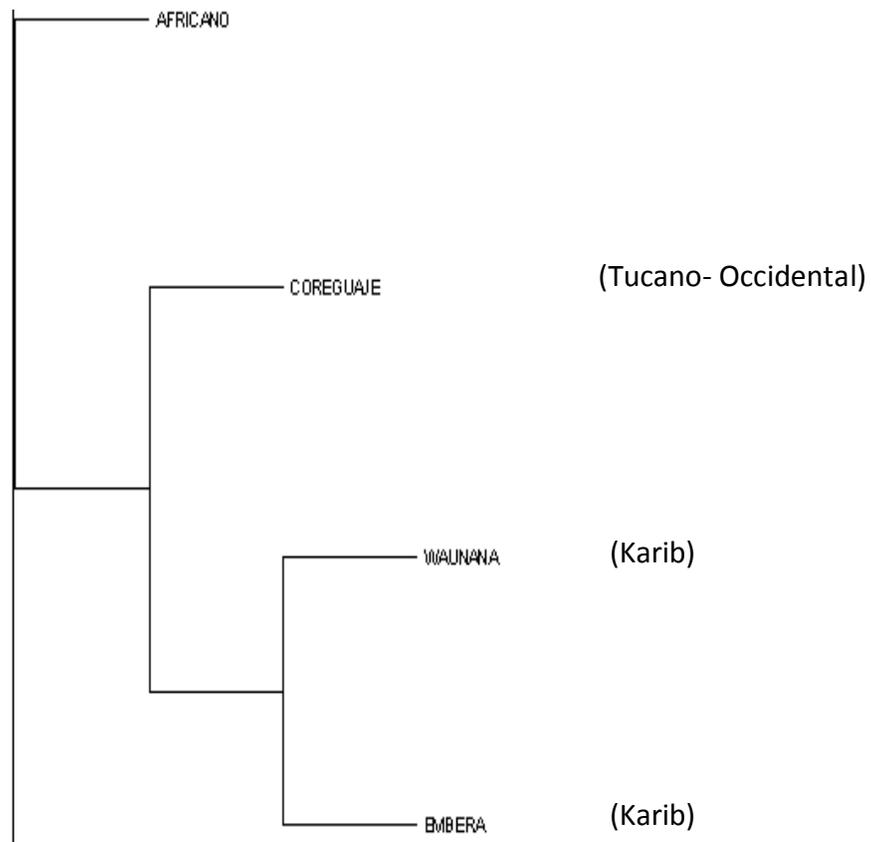


Figura 4. Filograma por UPGMA de las poblaciones en estudio más población outgroup.

7. DISCUSIÓN

7.1 POLIMORFISMO MTHFR C677T

Estudios a nivel mundial han demostrado variaciones en las frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismo C677T de la MTHFR (**Tabla 2**). En población negra africana se presenta una muy baja frecuencia genotípica TT (0,0) en comparación de la población blanca (0,11) de esta región, la frecuencia alélica en población negra está presente en baja frecuencia con 0,04, mientras que en población africana blanca esta frecuencia se incrementa (0,36) (Scholtz, 2002). En países como Italia y México, las frecuencias registradas del polimorfismo son elevadas, presentando frecuencias del alelo T de 0,47 y 0,44, y del genotipo TT de 0,22 y 0,19, respectivamente (Bottiglieri, 2001; Dávalos, 2000; Mayor, 2008). En Colombia Bermúdez *et al.* En el 2006 realizó un estudio con 95 individuos sanos voluntarios con residencia en la ciudad de Bogotá, registrando una frecuencia genotípica TT (0,24) y alélica (0,51).

Fuente	Región		N° Ind.	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas	
				CC	CT	TT	C	T
Bhat, 2008	Asía	India	110	0,62	0,33	0,05	0,84	0,27
Cui, 2012		Corea	1700	0,32	0,51	0,18	0,57	0,43
Scholtz 2002	Sur	Blancos	76	0,39	0,50	0,11	0,64	0,36
	África	Mestizo	73	0,65	0,34	0,02	0,82	0,18
		Negros	60	0,92	0,08	0,00	0,96	0,04
Bottiglieri, 2001	Europa	Italia	36	0,31	0,47	0,22	0,53	0,47
Dávalos, 2000		México	101	0,31	0,50	0,19	0,56	0,44
Monsalve, 2003		Estados Unidos	200	0,55	0,33	0,12	0,72	0,28
Bermúdez 2006	Latino América	Colombia	95	0,22	0,49	0,24	0,49	0,51

Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo MTHFR C677T a nivel mundial.

Otros estudios realizados en poblaciones amerindias (**Tabla 3**), mostraron una frecuencia mayor con genotipo TT de 0,33 y frecuencia alélica T 0,57 en la comunidad Purepecha de México (Dávalos, 2000), contra una frecuencia genotípica TT de 0,00 y alélica T de 0,10 en población Aché de Paraguay (Monsalve, 2003).

Fuente	Región	Comunidad	N° Ind.	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas	
				CC	CT	TT	C	T
Monsalve, 2003	Canadá	Nu-Chah-Nult	37	0,68	0,27	0,05	0,81	0,19
	Paraguay	Aché	30	0,80	0,20	0,00	0,90	0,10
Dávalos, 2000	México	Huichol	50	0,16	0,56	0,28	0,44	0,56
		Tarahumara	38	0,45	0,39	0,16	0,64	0,36
		Purepecha	21	0,19	0,48	0,33	0,43	0,57

Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo MTHFR C677T en población amerindia.

Las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C677T, se podrían ver afectadas por posibles cambios de algunos factores, entre ellos están:

El **apareamiento no aleatorio**, el cual permite un aumento de la frecuencia de homocigotos debido a un apareamiento dirigido o a consanguinidad; el apareamiento dirigido, es aquella elección de una pareja con la que se comparten ciertas características genotípicas o fenotípicas; la consanguinidad, es la unión entre personas de una misma familia (Turnpenny, 2009). En nuestras poblaciones estudiadas en las comunidades de Embera y Waunana la organización social es de parentela en la que se ven casos de consanguinidad, debido a esto se podría observar un aumento de la frecuencia genotípica y alélica; mientras que en la comunidad Coreguaje la organización social es exogámica, se prohíben las relaciones entre miembros de una misma

familia, disminuyendo así las posibilidades de que se presente un aumento de las frecuencias genotípicas y alélicas de este polimorfismo (Bernal, J., 12 ed).

El **flujo génico ó migración** permite un aumento de las frecuencias del polimorfismo debido la introducción de nuevos alelos a una población originado por el desplazamiento de individuos (Turnpenny, 2009); en el presente estudio este factor podría no ser tan influyente en el aumento de la frecuencia del polimorfismo, ya que en las comunidades Embera y Waunana han tenido la misma locación geográfica y son aisladas, y en el caso de la comunidad Coreguaje presentaron una migración desde el occidente hacia el sur de Colombia, lo que podría en parte explicar las diferencias en las frecuencias genotípicas y alélicas de esta población respecto a las otras dos.

Otro factor que podría modificar las frecuencias alélicas y genotípicas es la **deriva génica aleatoria**, producida por un cambio al azar debido a un evento causal (Ejemplo: Efectos ambientales) provocando la perdida uno de los alelos principalmente en una población pequeña (Turnpenny, 2009), se caracteriza porque la población se encuentra en desequilibrio de Hardy-Weinberg ($p \leq 0,05$).

Los resultados obtenidos en las poblaciones analizadas en este estudio, es poco probable que las frecuencias genotípicas y alélicas sean originadas por este factor ya que el efecto de la deriva genética es generalmente mayor y asociado a desequilibrio de Hardy-Weinberg.

Finalmente, la **presión de selección** consigue por medio de la fuerza que ejerce el medio, cambios en las frecuencias alélicas y genotípicas en poblaciones (Turnpenny, 2009).

Darwin, 1876. La selección natural es una fuerza que promueve el cambio en las especies a través de generaciones. Es también la fuerza que produce nuevas especies a partir de los cambios que se acumulan en la población durante largos períodos de tiempo (Rosenberger, 2004).

Se encuentran reportes en la literatura que sugieren un posible efecto de selección positiva sobre este polimorfismo en diversas poblaciones. Tal parece que en poblaciones con dietas ricas en alimentos con alto contenido de folato se ve favorecida la presencia del polimorfismo. Es probable que la presencia del polimorfismo de un mejor equilibrio a las rutas metabólicas involucradas cuando se ven expuestas a consumo de alimentos ricos en folato (Lucock, 2003). La evidencia sugiere que niveles elevados de folato plasmático podrían asociarse a aumento en la síntesis de ADN y por lo tanto en aumento de la proliferación celular (González, 2002), lo cual podría predisponer a embarazos múltiples, considerados como embarazos de alto riesgo por el aumento de la morbimortalidad materna y fetal-neonatal (Cremonte, 2008). De acuerdo a lo anterior y a los resultados obtenidos en este trabajo, así como la disponibilidad en la dieta de alimentos ricos en folato, es probable que el principal factor asociado a las elevadas frecuencias alélicas y genotípicas en las poblaciones evaluadas este dado por presión de selección positiva en este polimorfismo.

7.2 DISTANCIAS GENÉTICAS

Se observa una menor distancia genética entre las poblaciones Embera y Waunana, estas dos poblaciones son cercanas geográficamente y lingüísticamente pertenecen a la misma familia de Chocó. Se incluyó como población outgroup un grupo de África del Sur (Scholtz 2002), con el fin de realizar una comparación de estados plesiomorfos (ancestrales)

La población de Coreguaje presenta una mayor distancia genética con respecto a las otras dos poblaciones, esta comunidad según estudios previos antes se ubicaba geográficamente cercana a las comunidades Embera y Waunana, pero la comunidad pertenecen a una familia lingüística diferente de familia lingüística Tucano Occidental

Las tres poblaciones con respecto al outgroup presentan un origen diferente.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo con los reportes de la literatura, este parece ser el primer reporte de frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en poblaciones amerindias colombianas.

Los resultados obtenidos en las comunidades de Coreguaje, Embera y Waunana de Colombia, muestran frecuencias elevadas genotípicas y alélicas del polimorfismo. Estos resultados podrían ser atribuidos a una presión de selección positiva que ejerce la alta ingesta de alimentos ricos en folato en estas tres comunidades.

Se encontró una distancia genética más corta entre las comunidades Embera y Waunana, estas dos comunidades estas cercanas geográficamente y pertenecen a la misma familia lingüística: Karib.

Este estudio abre puertas a nuevas investigaciones con poblaciones amerindias colombianas, con el fin de identificar la frecuencia en otras comunidades, para poder determinar la carga genética de este polimorfismo en nuestra población así como conocer su comportamiento de acuerdo a las condiciones nutricionales de las poblaciones. Se recomienda continuar la investigación del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en comunidades amerindias de Colombia teniendo en cuenta condiciones de espacialidad y la temporalidad, así como en poblaciones negras afrocolombianas.

9. BIBLIOGRAFÍA

Alfred L. Rosenberger, Ph.D. "Charles Darwin II: La Selección Natural," *Visionlearning* Vol. BIO (4s), 2004.

http://www.visionlearning.com/library/module_viewer.php?mid=111&l=s

Bhat, T., Mir, M., Qasim, S., Misra, S., Kirmani, M. 2008. Genetic Polymorphism of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T in Kashmiri Population. *Biotechnology* 7(4): 822-825.

Bermúdez, M., Briceño, I., Gil, F., Bernal, J. 2006. Homocisteína y polimorfismos de cistationina β sintasa y metilentetrahidrofolato reductasa en población sana de Colombia. *ColombMed.* 37: 46-52

Bernal, J., Mendoza, R., Zarante, I., Valbuena, G. Terrenos de la gran expedición humana serie de reporte de investigación N° 6, aspectos demográficos de las poblaciones indígenas, negras y aisladas visitadas por la Gran Expedición Humana. (6th ed.) JAVEGRAF.

Bernal, J., Zarante, I., Salazar, O., Núñez, F., Ordóñez, A., Terrenos de la Gran Expedición Humana serie de investigación N° 12, Aspectos médicos y resultados clínicos comunidades indígenas y negras Colombiana. (12 ed.) JAVEGRAF,

Bernal, J., Zarante, I., Cifras de la gran expedición humana. Retrieved from <http://www.javeriana.edu.co/Humana/cifras.html>

Bernal, J., Zarante, I., Comunidades estudiadas por la expedición Humana. Retrieved from <http://www.javeriana.edu.co/Humana/comunidades.html>

- Bottiglierim T., Parnetti, L., Arning, E., Ortiz, T., Amici, S., Lanari, A., Gallai, V. 2001. Plasma total homocysteine levels and the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene: a study in an Italian population with dementia. *Mechanisms of Ageing and Development* 122 (2001) 2013–2023
- Chillemi, R., Angius, A., Persico, I., Sassu, A., Prodi, D., Musumeci, S. 2005. Methylenetrehydrofolate Reductase (MTHFR) from Mediterranean to Sub-Saharan Areas. *Online Journal of Biological Sciences* 6 (1): 28-34
- Ciu, L., Shin, M., Kweon, S, Kim, H., Song, H., Piao, J., Choi, J., Shim, H., Hwang, J., Kim, H., Park, Y., Kim, S. 2010. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T Research article polymorphism in patients with gastric and colorectal cancer in a Korean population. *BMC Cancer* 2010, 10:236
- Cremonte, A., 2008. Embarazo gemelar y múltiple., UNNE, aleelizaldecremonte@gmail.com
- Couce, M., Balcells, S., Dalmau, J., Grinberg, D., Rodés, M., Vilaseca, M., 2007. Protocolo de Diagnóstico y tratamiento de Homocistinuria. Capítulo 12 Homocistinuria. Págs 325 – 353. En línea <http://www.ae3com.eu/protocolos/protocolo12.pdf>
- Dávalos, I., Olivares, N., Castillo, M., Cantú, J., Ibarra, B., Sandoval, L., Cristina, M., Gallegos, M., Chakraborty, R., Rivas, F. 2000. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Annales de Génétique* 43 (2000) 89–92

- Fonseca, V., Guba, S., Fink, L., 1999. Hyperhomocysteinemia and the Endocrine System: Implications for Atherosclerosis and Thrombosis. *EndocrineReviews* 20(5): 738-759
- González, M., Sola, R., Castillo, M., 2002. Folato: una vitamina en constante evolución. *Med Clin (Barc)* 2002;119(16):627-35
- González, Z., Villegas, V., Matínez, M., 2010. Determinación del polimorfismo C677T de metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en un población piloto de estudiantes de la Universidad del Rosario. *Rev. Cienc. Salud. Bogotá (Colombia)* 8 (1): 7-21, enero-abril 2010
- Llevarot, J., Blanco, F., González, F. 2005. Determinación y utilización de la concentración plasmática de Homocisteína en la práctica clínica. *Med Clin (Barc)*. 124 (14):544-53
- Li DH, Ahmed M, Li YN, Jiao L, Chou TH, Wolff RA, Lenzi R, Evans DB, Bondy ML, Pisters PW, Abbruzzese JL, Hassan MM. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and the Risk of Pancreatic Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1470-6.
- Lucock, M., Yates, Z., Glanville, T., Leeming, R., Simpson, N., Daskalakis, I. (2003). A critical role for B-vitamin nutrition in human developmental and evolutionary biology. M. Lucock et al. / *Nutrition Research* 23 (2003) 1463–1475.
- Mayor, Á., Callejón, G., Palomares, A., Jiménez, A., Gaitán, M., Rodríguez, A., Ruiz, M., Reyes, A. 2008. Human genetic selection on the MTHFR 677 C>T polymorphism. *BMC Medical Genetics* 9:104

- Menéndez, A., Fernández, J. 1999. Metabolismo de la Homocisteína y su relación con la aterosclerosis. *Rec Cubana InvestBiomed.* 18 (3):155-68
- Monsalve, M., Salzano, F., Rupert, J., Hutz, M., Hill, K., Hurtado, A., Hochachka, P., Devine, D. 2003. Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Allele Frequencies in Amerindians. *Annals of Human Genetics* 67, 376-371
- Scholtz, C., Odendaal, H., Thiart, R., Loubser, L., Hillermann, R., Delpont, R., Vermmak, W., Kotze, M. (2002). Analysis Of Two Mutations In The Mthfr Gene Associated With Mild Hyperhomocysteinaemia – Heterogeneous Distribution In The South African Population. June 2002, *Vd!*. 92, No. 6 *Samj*
- Stam, F., Smulders, M., Guldener, C., Jakobs, C., Stehouwer, C., Meer, K. 2005. Folic acid treatment increases homocysteine remethylation and methionine transmethylation in healthy subjects. *Clinical Science.* 108, 449-456
- Turnpenny, P., Ellerd, S., 2009. EMERY, *Elementos de Genética Médica.*, Elsevier Limited., España: Barcelona.

10. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo amplificación del exón 1, 677 de la MTHFR

MIX	1X (uL)
BUFFER	2.5
MgCl (25mM)	1.5
dNTPs (2mM)	0.5
PRIMER 1 (677A) 10uM	0.5
PRIMER 2 (677B) 10uM	0.5
TagPol 5U/ul	0.5
Agua	17
DNA	2
	Vol Final: 25

Las condiciones experimentales de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fueron las siguientes: Denaturación inicial por 4 minutos a 95°C, seguido 35 ciclos - 30 segundos, denaturación a 95°C, anillamiento 62°C, elongación a 72°C, y elongación final a 72°C.

Los primers usados para la amplificación del exón 1 fueron:

Forward: 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'

Reverse: 5-AGGACGGTGCGGTGAGTG-3'

Anexo 2. Protocolo digestión enzimática exón 1, 677 de la MTHFR

MIX	1X (uL)
H₂O	15.3
BUFFER	2
Enzima Tag I	0.5
Producto de PCR	2
BSA	0.2
	Vol. Final: 20

BSA: Suero Fetal Bovino

Las condiciones experimentales de la digestión enzimática del exón 1 fueron las siguientes: Enzima *Tag I*, Temperatura: 65°C, Tiempo: 4 horas