



**POLIMORFISMOS EN GENES DE LA VÍA DE LOS FOLATOS Y SU
ASOCIACIÓN CON ENFERMEDADES HUMANAS**

Miguel Ángel Cáceres Durán^{1,2}, Bárbara do Nascimento Borges²

- 1. Laboratorio de Genética Humana y Médica. Instituto de Ciencias Biológicas. Programa de Posgrado en Genética y Biología Molecular. UFPA. Brasil.**
- 2. Laboratorio de Biología Molecular. Instituto de Ciencias Biológicas. Programa de Posgrado en Neurociencias y Biología Celular. UFPA. Brasil.**

Correspondencia: Laboratorio de Genética Humana y Médica. Universidad Federal de Pará, Brasil. Calle Augusto Correa, 01. Belém, PA, 66075-110. Teléfono: +55 91 98053-2660.

E-mail: macdur@gmail.com

RESUMEN

El folato juega un papel esencial en procesos celulares importantes, entre ellos la síntesis de precursores del ADN y eventos epigenéticos como la metilación del ADN. Polimorfismos en genes involucrados en la vía de los folatos pueden estar asociados a diferentes tipos de enfermedades humanas, principalmente defectos en el tubo neural, autismo, enfermedades cardiovasculares y diversos tipos de cáncer. Se piensa que las variantes polimórficas T5ER y 1494del6 del gen *Timidilato sintasa (TYMS)*, C677T y A1298C del gen *Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)* y A1298G del gen *Metionina sintasa (MTR)* podrían ser funcionalmente relevantes y estar asociadas al riesgo de padecer ciertas



enfermedades humanas. Por esta razón, la presente revisión tiene por objetivo describir estos polimorfismos y su posible asociación a patologías humanas. El abordaje molecular de estos genes, aunado a factores ambientales, puede ayudar a dilucidar la función del folato en el desarrollo de enfermedades.

PALABRAS CLAVE: Polimorfismos, vía de los folatos, *Timidilato sintasa (TYMS)*, *Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)*, *Metionina sintasa (MTR)*, metilación.

POLYMORPHISMS IN GENES OF THE FOLATE PATHWAY AND THEIR ASSOCIATION WITH HUMAN DISEASE

ABSTRACT

Folate plays an essential role in important cellular processes including DNA synthesis and epigenetic events such as DNA methylation. Polymorphisms in genes involved in the folate pathway may be associated with different types of human diseases such as neural tube defects, autism, cardiovascular disease and various types of cancers. It is suggested that the polymorphic variants T5ER and 1494del6 in *Thymidylate synthase* gene (*TYMS*), C677T and A1298C in *Methylenetetrahydrofolate reductase* gene (*MTHFR*) and A1298G in *Methionine synthase* gene (*MTR*) could be functionally relevant and associated with the risk of human diseases. For this reason, this review aims to describe these polymorphisms and their possible association with human pathologies. Molecular screening to these genes, associated with environmental factors, can help determine the folate role in disease development.

KEY WORD: Polymorphisms, folate pathway, *Thymidylate synthase (TYMS)*, *Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)*, *Methionine synthase (MTR)*, methylation



INTRODUCCIÓN

METABOLISMO DE LOS FOLATOS

El metabolismo de los folatos, que apoya un conjunto más amplio de transformaciones conocidas como metabolismo de un solo carbono 1C, es un proceso metabólico universal que sirve para activar y transferir unidades de 1C para procesos biosintéticos incluyendo la síntesis de purinas y timidina y la remetilación de homocisteína (Hcy). En humanos adultos, el folato dietético insuficiente conduce a la anemia. En el desarrollo de fetos, crea una disposición a defectos congénitos conocidos como defectos del tubo neural, que implican la falla del cierre del tubo neural al principio del embarazo. Los resultados varían en gravedad desde la anencefalia, causando pérdida fetal, hasta la espina bífida con parálisis parcial de la pierna (1).

La vía de los folatos también está estrechamente asociada con el metabolismo de Hcy y se encuentra en un punto de rama de las vías metabólicas: la

remetilación y la vía de transulfuración, donde se requieren como cofactores las vitaminas B, es decir, folato, vitamina B12, vitamina B6 y vitamina B2. Por lo tanto, los niveles no adecuados de estas vitaminas pueden elevar los niveles plasmáticos de folato sérico y Hcy total (2). Cuando se presentan ciclos de ingesta inadecuada, mala absorción o cambios bioquímicos asociados con un nivel inapropiado de folato, se generan anomalías (3).

Polimorfismos en genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo de 1C como timidilato sintasa (*TS*), metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*), metionina sintasa (*MTR*), y metionina sintasa reductasa (*MTRR*) juegan un papel importante en el metabolismo de los folatos (Fig. 1), así, esos polimorfismos pueden influenciar el riesgo de enfermedades (4). Es por ello, que esta revisión se enfocó en los principales polimorfismos de tres de estos genes y su posible asociación con enfermedades humanas.

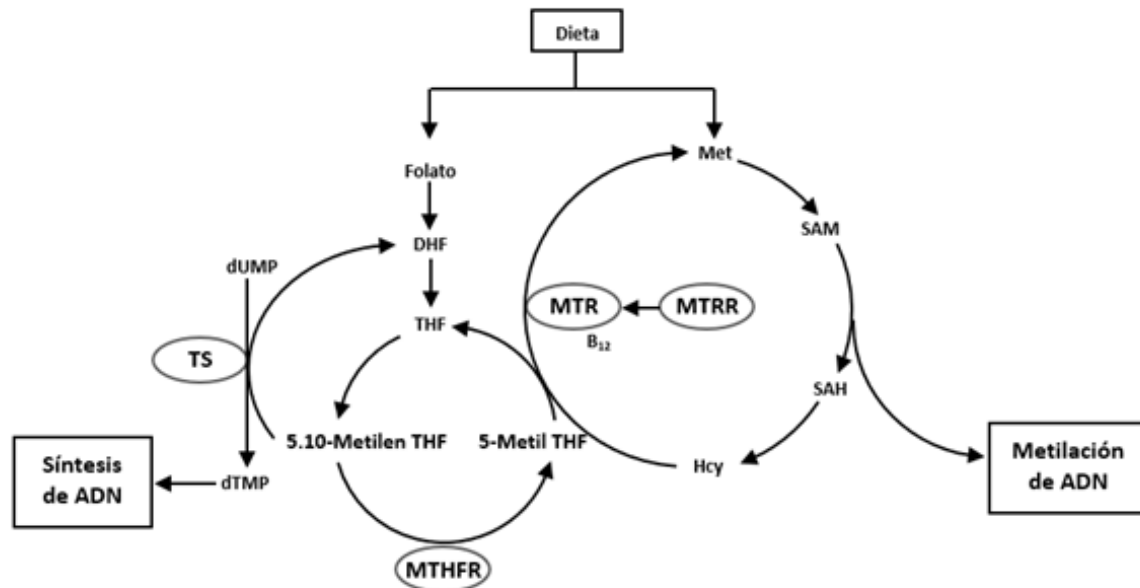


Figura 1. Descripción general del metabolismo del folato.

Las enzimas involucradas en la vía de los folatos se encuentran en los óvalos. TS (timidilato sintasa), MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa), MTR (metionina sintasa), MTRR (metionina sintasa reductasa, THF (tetrahidrofolato), DHF (dihidrofolato), dUMP (desoxiuridina monofosfato), dTMP (desoxitimidina monofosfato), Met (metionina), Hcy (homocisteína), SAM

(S-adenosil metionina), SAH (S-adenosil homocisteína).

DESARROLLO

GEN Y ENZIMA TIMIDILATO SINTASA (*TYMS*, TS).

TYMS se localiza en la región 18p11.32 (5). La unidad biológicamente activa abarca aproximadamente 16 mil pb y está compuesta por siete exones y seis intrones.



La región promotora y los principales sitios de inicio transcripcional se localizan dentro de aproximadamente 400 pb y 160-180 pb, respectivamente, aguas arriba del codón de iniciación ATG. El gen codifica para la enzima TS que cataliza la conversión de desoxiuridina monofosfato (dUMP) a desoxitimidina monofosfato (dTMP), usando 5,10-metilentetrahidrofolato como donador de metilo (figura 1). Esta conversión es esencial para la provisión de timina, un nucleótido necesario para la síntesis y reparación del ADN (6-8).

A través de la vía de los folatos, TS se relaciona con un equilibrio de dNTPs, que es importante en la reparación y replicación del ADN y la proliferación celular. TS funciona como una proteína de unión al ARN y regula su propia expresión, así como también la expresión de otros genes, incluyendo al supresor de tumores *TP53*. La extensión de la expresión de TS puede afectar la carcinogénesis a través de la regulación de

la expresión génica, el estado del conjunto de dNTPs necesario para la proliferación de células tumorales y la sensibilidad de fármacos basados en 5-fluorouracilo (5-FU) en pacientes con cáncer (9,10).

Las características estructurales del gen *TYMS* son únicas en comparación con muchos otros genes, especialmente en el extremo 5'-UTR, zona reconocida como la región promotora del gen, allí es donde se encuentran los elementos esenciales que participan en la regulación de su expresión, proceso que, a su vez, esta modulado por varios polimorfismos cuya presencia o ausencia repercuten directamente sobre la tasa de transcripción y traducción de TS, y, cuyas variantes se han vinculado a la eficacia terapéutica de diversos fármacos utilizados en la terapia contra el cáncer (11-16).

POLIMORFISMO TSER (RS34743033)

Se ha identificado una repetición en tándem polimórfica en la región potenciadora (TSER) la cual contiene una



triple (3R) o una doble (2R) repetición de una secuencia de 28 pb, también hay alelos que raramente contienen cuatro, cinco, seis o nueve repeticiones. Estas variantes de la región TSER despiertan la curiosidad sobre su origen evolutivo, así como sobre su actividad y papel en la expresión del gen. Se cree que las variantes TSER son funcionalmente relevantes y están hipotéticamente asociadas al riesgo de cáncer, así como un factor genético importante en la respuesta a la quimioterapia basada en 5-FU (8,9).

Se ha demostrado que las repeticiones en tándem polimórficas de 28 pb descubiertas en 5'-UTR influyen en la expresión génica. En condiciones normales, TS puede unirse a la estructura del tallo-bucle en 5'-UTR de su propio ARNm para inhibir la traducción de proteínas; sin embargo, la presencia de repeticiones en tándem adicionales altera la estructura secundaria del tallo-bucle al acercar la región promotora al sitio de iniciación, lo que impide la inhibición de

retroalimentación adecuada y conduce a niveles de expresión aumentados de enzima activa (17).

Estudios de expresión *in vitro* han demostrado que el alelo 3R da como resultado un aumento de 2,6 veces en la expresión de ARNm en comparación con el 2R. Un análisis retrospectivo en 52 pacientes con cáncer colorrectal metastásico detectó un aumento de 3,6 veces en los niveles de ARNm de *TYMS* en individuos homocigotos 3R versus 2R y un aumento de 2,1 veces para aquellos que fueron heterocigotos 2R/3R versus homocigotos 2R. Por tanto, las repeticiones en tándem 3R confieren una mayor estabilidad del ARNm y eficacia traduccional en comparación con las repeticiones dobles en tándem 2R (9,17). TS compete con MTHFR en el ciclo del metabolismo del ácido fólico por la disponibilidad de 5,10-metilentetrahidrofolato por lo que los niveles de este último disminuyen, consecuentemente, la variante 3R puede



afectar los niveles de 5,10-metilentetrahidrofolato llevando a una disminución en la concentración celular de S-adenosilmetionina (SAM), y una subsecuente disminución en la metilación del ADN. Así, la hipometilación de ADN puede aumentar la susceptibilidad a mutaciones génicas y alterar la expresión de oncogenes y supresores de tumores. Esto podría resultar en cambios epigenéticos que pueden iniciar el proceso de carcinogénesis (18-21).

POLIMORFISMO 1494DEL6 (RS34489327)

El polimorfismo *1494del6* consiste en la variación de una secuencia de 6 pb (TTAAAG) en la posición 1494 en 3'-UTR, cuya presencia o ausencia se identifica como inserción (+6pb) y deleción (-6pb). Estas variantes alélicas están estrechamente relacionadas con el nivel de expresión de TS. Se ha determinado que el alelo -6pb está vinculado con inestabilidad del ARNm *in vitro*, niveles bajos del mismo y menor

expresión enzimática intratumoral inferior *in vivo*. (22,23).

Estudios recientes han informado que este polimorfismo puede afectar los niveles de ARNm de *TYMS*, y que el genotipo +6/+6 los aumenta significativamente en comparación con el genotipo -6/-6. El efecto funcional de este polimorfismo aún no se comprende completamente, los datos disponibles sugieren que el alelo -6 podría asociarse con una disminución de la estabilidad de *TYMS in vitro*, menor expresión de *TYMS* intratumoral *in vivo* y quizás con un mayor riesgo de cáncer (24). Este polimorfismo se ha asociado con afecciones inflamatorias (artritis reumatoide) y varias malignidades, como carcinomas colorrectales y pulmonares y linfoma no Hodgkin. También se ha encontrado que aumenta el riesgo de malformaciones en el desarrollo embrionario como la espina bífida (25-29). Además, fue descrito que la causa de la inestabilidad del ARNm se debe a que la ausencia de las 6 pb aumenta la afinidad entre este y el factor regulador AUF1, una



ribonucleoproteína que actúa como desestabilizador del ARNm (30).

OTROS POLIMORFISMOS DEL GEN *TYMS*

Se ha descrito otro polimorfismo en la región 5'-UTR de *TYMS* que puede ocurrir solo en caso de estar presente el alelo 3R y consiste en la sustitución de una guanina por una citosina G>C en la posición 12 de la segunda repetición (TSER 3G>C, rs2853542), lo que da lugar a dos nuevas formas alélicas: 3RG (silvestre) y 3RC (variante) (18). Este SNP cambia un residuo crítico en el factor de consenso E-box del factor estimulador en sentido ascendente (CACTTG>CACTTC) suprimiendo un E-box en el alelo 3R, que conduce a una disminución en la transcripción de *TYMS*, de modo que 3RC tiene una actividad transcripcional inferior a 3RG, pero una actividad similar a 2R (18, 31).

Este polimorfismo modifica la actividad traduccional de *TYMS* siendo tres veces

mayor la actividad en la forma alélica 3G que en los alelos 2RC, 2RG y 3RC, por lo que se han clasificado como genotipos de baja expresión a 2R/2R, 2R/3RC y 3RC/3RC y como genotipos de alta expresión a 2R/3RG 3RC/3RG y 3RG/3RG (13, 32).

En el 2006 se describió un raro SNP G> C en el alelo 2R de *TYMS*, que lleva un cambio de base G> C en el 12º nucleótido de las dos repeticiones de 28 pb (2RC). Un estudio funcional demostró que la actividad transcripcional del promotor del alelo 2RC es la más baja entre los alelos conocidos, esto es consistente con el SNP que altera el único E-box del alelo 2R (33). Fue identificado también un SNP G>C en la primera repetición del alelo 2R de *TYMS*, que suprime el único sitio de unión funcional de la proteína USF. Además, se identificó una inserción de 6 pb (TCCCCG) en la segunda repetición del alelo 2R que puede afectar negativamente la unión de las moléculas reguladoras a esta región (34). En el año 2016 se realizó



el primer análisis de relevancia clínica del SNP G>C en la posición 12 de la primera repetición de 28 pb del alelo 2R, y se reportó una disminución significativa de la expresión génica *in vitro* de *TYMS*, suprimiendo el sitio de unión de USF-1 (35).

La relación entre los polimorfismos del gen *TYMS* y el cáncer ha sido muy estudiada. Se han estudiado genotipos y haplotipos combinados del SNP G>C y la inserción/delección +6pb/-6pb y genotipos combinados de TSER y +6pb/-6pb en cáncer gástrico y otros tipos de cáncer, encontrándose que el genotipo combinado 2R/2R, +6pb/+6pb confiere un riesgo significativo para el cáncer gástrico (9).

GEN Y ENZIMA METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (*MTHFR/MTHFR*)

MTHFR se localiza en la región 1p16.22, tiene 11 exones y codifica para la enzima 5,10- MTHFR cuya expresión es tejido-específica. *MTHFR* tiene 656 aminoácidos y es una flavoenzima citoplasmática que regula el equilibrio entre la metilación celular y la síntesis de ácidos nucleicos mediante la canalización de la distribución de folato. Por lo tanto, la enzima cataliza la conversión de 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato para aumentar la abundancia de esta forma de folato en circulación y proporcionar una fuente de grupos metilo para la metilación de Hcy a metionina (Met) (36,37). La Met posteriormente se convierte en SAM, que es la molécula donadora de metilo universal para las reacciones biológicas, incluida la metilación de proteínas y ácidos nucleicos (Fig. 2) (38-40).

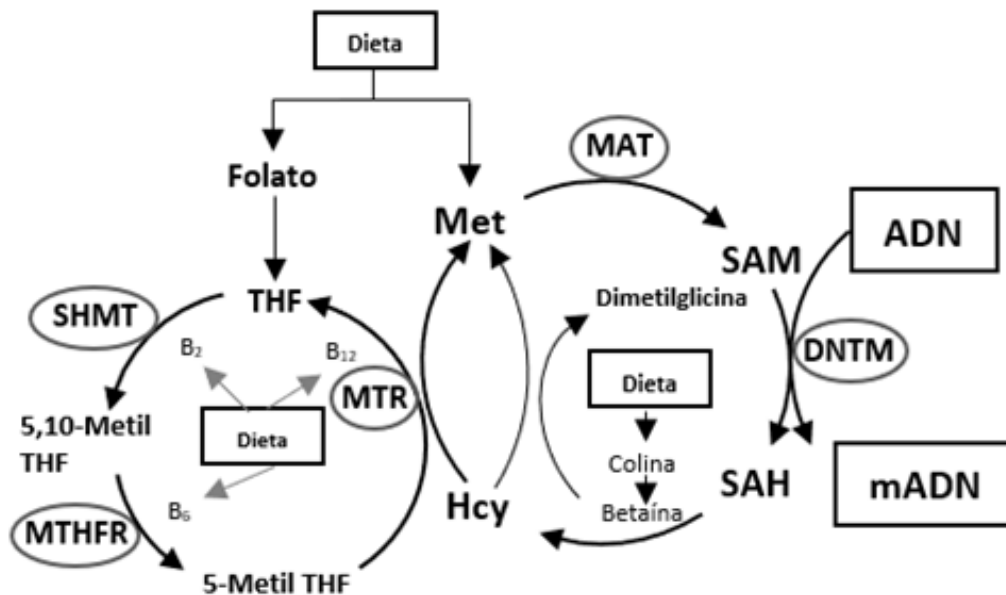


Figura 2. Vista general del metabolismo de un Carbono.

5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-Metil THF) es requerido para la síntesis de ácidos nucleicos. 5-metilentetrahidrofolato (5-Metil THF) es necesario para la formación de Met a partir de Hcy. La Met, en forma de donante de metilo, S-adenosil metionina (SAM), es esencial para muchas reacciones de metilación. MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa),

SHMT (serina hidroximetil transferasa), MTR (metionina sintasa), THF (tetrahidrofolato), MAT (metionina adenosil transferasa), DNMT (ADN metiltransferasa), mADN (ADN metilado) (Editado y traducido de Zhang, 2015 ⁴⁰).

POLIMORFISMO C677T (RS1801133)



El polimorfismo C677T es un SNP común en el exón 4, en el sitio de unión del folato del gen *MTHFR* que da como resultado la sustitución de alanina por valina en el codón 222. Esta sustitución genera una enzima termolábil y se asocia con concentraciones elevadas de Hcy, especialmente en aquellos individuos con bajo nivel de folato. Se ha demostrado que individuos con los genotipos 677TT y 677CT tienen solo un 30% y 65% de actividad enzimática respectivamente en comparación con el tipo salvaje (8, 37,40-42).

Individuos homocigotos 677TT tienen niveles de homocisteína significativamente elevados, con una disminución en la metilación de Hcy a Met en el plasma, que canaliza adversamente el metabolismo de la Hcy en una ruta de transulfuración, conduciendo a toxicidades. En consecuencia, estos polimorfismos predisponen a los individuos a múltiples enfermedades como trombosis, enfermedad arterial coronaria,

infarto de miocardio, enfermedades renales, anomalías congénitas, cáncer, entre otras (43,44).

La relación entre el polimorfismo C677T y diversas enfermedades implica dos aspectos. En primer lugar, la enfermedad puede influir en las concentraciones de Hcy y puede haber modificación del efecto por el polimorfismo. En segundo lugar, el genotipo podría estar asociado con el riesgo de enfermedad, posiblemente mediado por el metabolismo alterado de folatos y de Hcy (43).

Estudios afirman que individuos con al menos una variante polimórfica de *MTHFR* (heterocigotos y homocigotos combinados) tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama premenopáusicas (45). También se ha encontrado una asociación significativa entre los genotipos 677CT y 677TT con el riesgo al cáncer de próstata (46).

**POLIMORFISMO A1298C
(RS1801131)**

En comparación con el polimorfismo C677T, la relevancia funcional de la variante A1298C está menos definida y su función enzimática es menos anormal. Este polimorfismo está localizado en el exón 7 del gen *MTHFR*. Este cambio de base resulta en la sustitución de un residuo de glutamato por uno de alanina en la posición 429 de *MTHFR*, donde puede estar involucrado en la estabilización de la enzima y dando como resultado una actividad enzimática disminuida (47,48).

Los genotipos 1298CC y 1298AC se han asociado, respectivamente, con 70% y 85% de actividad enzimática cuando se comparan el tipo salvaje 1298AA (48).

Estudios con *MTHFR* demuestran que el genotipo 677TT está asociado con un estado de metilación del ADN significativamente menor. Los homocigotos 1298CC también muestran un estado de metilación de ADN inferior. El genotipo 1298CC,

independientemente de la disponibilidad de folato, y el genotipo 677TT con niveles de folato inadecuado, podrían ser factores de riesgo potenciales de estados patológicos asociados con el estado de hipometilación del ADN (42).

Modificaciones epigenéticas en *MTHFR* también pueden contribuir a trastornos humanos. En particular, el aumento de la metilación del promotor de *MTHFR* resulta en una disminución de los niveles de expresión génica y se ha asociado con infertilidad masculina, preeclampsia, abortos espontáneos recurrentes, trisomía 21 y cardiopatía congénita (49-52). También se sospecha que la hipermetilación de *MTHFR* desempeña un papel en complicaciones diabéticas, enfermedades vasculares y cáncer (53-55).

**GEN Y ENZIMA METIONINA
SINTASA (*MTR/MTR*)**

MTR se localiza en la región 1q43, tiene una longitud de 105.24 kb y está formado

por 33 exones. Codifica para la enzima MTR, de 1265 aminoácidos, que cataliza la remetilación de Hcy a Met en una reacción en la que metilcobalamina sirve como un cofactor portador de metilo intermediario (figura 3). Esto ocurre por transferencia del grupo metilo de 5-metiltetrahidrofolato a la enzima ligada cob (I) alamina para formar metilcobalamina con transferencia

posterior del grupo metilo a la Hcy para formar Met. Con el tiempo, cob (I) alamina puede oxidarse en cob (II) alamina, lo que hace que la enzima quede inactiva. La regeneración de la enzima funcional se produce a través de la metilación de la cob (II) alamina mediada por MTR, en la que se utiliza SAM como donadora de metilo. (56-58).

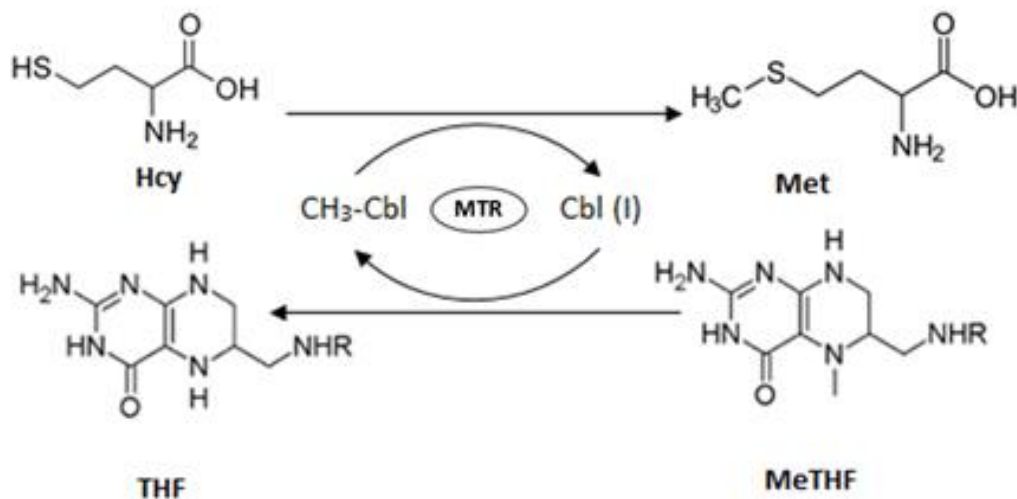


Figura 3. Reacción catalizada por MTR.



Remetilación de Hcy a Met. THF (tetrahidrofolato), MeTHF (metiltetrahidrofolato), Cbl (Cobalamina).

POLIMORFISMO A2756G (RS1805087)

El polimorfismo A2756G, ubicado en el exón 26, resulta en un cambio de aminoácido de aspartato a glicina en la posición 919 de la proteína, y se ha demostrado que contribuye a alteraciones en los niveles plasmáticos de Hcy y ácido fólico (59-61).

Inicialmente se pensó que esa alteración A>G se asociaba con una actividad enzimática menor que el genotipo 2756AA, lo que causaba una elevación de Hcy y una hipometilación del ADN. Sin embargo, en investigaciones posteriores, algunos estudios sugirieron una asociación inversa modesta entre el genotipo 2756GG y los niveles de Hcy, lo que indica un aumento de la actividad enzimática del genotipo variante (61). Además, se encontró que individuos homocigotos 2756GG muestran una menor frecuencia

de hipermetilación de islas CpG en genes supresores de tumores. Por esto se realiza un gran número de estudios para evaluar el rol de este polimorfismo en diferentes tipos de neoplasmas, sin embargo, su asociación con el cáncer aún es controversial (62,63).

El polimorfismo A2756G puede reducir el factor de riesgo para el cáncer en poblaciones europeas, especialmente para el cáncer colorrectal. No obstante, la posible asociación entre este polimorfismo en poblaciones asiáticas, puede ser espurio, debido a que ha sido asociado tanto a un riesgo incrementado, como a un riesgo reducido al cáncer, lo cual no es claro, siendo necesario un mayor número de estudios para interpretar esas asociaciones (62).

Este polimorfismo también ha sido asociado a defectos en el tubo neural, autismo, enfermedades cardiovasculares, cáncer de próstata, retinoblastoma, entre otros. Hay algunos estudios que evalúan este polimorfismo y el riesgo de cáncer de



mama, por otro lado; pocos estudios han considerado la combinación de este polimorfismo con los del polimorfismo de *MTHFR* en el riesgo de esta enfermedad (60-62,65-68).

CONCLUSIÓN

En definitiva, es importante resaltar que el folato es un nutriente esencial para la síntesis de nucleótidos y las reacciones de donación de metilo, y contribuye al crecimiento, desarrollo y reproducción del ser humano. Sin embargo, aunque se han informado asociaciones del estado de folato con diversas enfermedades crónicas o defectos del tubo neural, los mecanismos por los cuales estas afecciones se desarrollan o pueden prevenirse siguen sin estar claros. No obstante, la identificación de polimorfismos en genes involucrados en la vía de los folatos puede ser usada como una importante herramienta para la evaluación de la predisposición y pronóstico de enfermedades debido a su participación en síntesis y reparación de ADN, así como su papel epigenético.

También, se debe tomar en cuenta la interacción entre el folato y otros nutrientes relacionados con la metilación, como las vitaminas B12 y B6, Met, colina y betaína. Finalmente, cabe recalcar que

enfermedades como el cáncer son multifactoriales, por tanto, para interpretar de manera adecuada esta clase de estudios se deben ampliar las investigaciones evaluando otros factores a los que esté sometida cada persona, tales como la dieta, estilo de vida, historia familiar, historia reproductiva, consumo de tabaco y alcohol, la exposición a agentes carcinógenos, entre otros. Tales esfuerzos deberían ayudar a dilucidar la función nutricional del folato y su importancia en el desarrollo de enfermedades.

ROLES DE AUTORÍA

MACD realizó la búsqueda de la literatura, redacción del manuscrito y diseño/edición de las figuras. BDNB revisó y editó el manuscrito. Ambos autores aprobaron el



manuscrito para su publicación y no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. Ducker G, Rabinowitz JD. One-Carbon metabolism in health and disease. *Cell Metabo.* 2017; 25(1): 27–42. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.08.009
2. Hiraoka M, Yasuo K. Genetic polymorphisms and folate status: SNPs and folate". *Congenit Anom.* 2017; 57(5):142-9. DOI: 10.1111/cga.12232
3. González-Galofre Z, Villegas V, Martínez-Agüero M. Determinación del polimorfismo C677T de *metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)* en una población piloto de estudiantes de la Universidad del Rosario. *Rev Cienc Salud.* 2010;8(1):7-21.
4. Suzuki T, Matsuo K, Hirose K, Hiraki A, Kawase T, Watanabe M, Yamashita T, Iwata H, Tajima K. One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of breast cancer. *Carcinogenesis.* 2008; 29(2):356-62. DOI: 10.1093/carcin/bgm295
5. Hori T, Takahashi E, Ayusawa D, Takeishi K, Kaneda S, Seno T. Regional assignment of the human *thymidylate synthase (TS)* gene to chromosome band 18p11.32 by nonisotopic in situ hybridization. *Hum Genet.* 1990;85(6):576-80.
6. Kaneda S, Nalbantoglu J, Takeishi K, Shimizu K, Seno T, Ayusawa D. Structural and functional analysis of the human *thymidylate synthase* gene. *J Biol Chem.* 1990; 265(33):20277-84.
7. Costi M, Ferrari S, Venturelli A, Calò S, Tondi D, Barlocco D. *Thymidylate synthase* Structure, Function and Implication in Drug Discovery. *Curr Med Chem.* 2005; 12(19):2241-58.
8. Henríquez-Hernández LA, Fernández-Pérez L, González-Hernandez A, Cabrera de León A, Díaz-Chico B, Murias-Rosales A: *TYMS, MTHFR, p53* and *MDR1* gene polymorphisms in breast cancer patients treated with adjuvant therapy. *Cancer*



- Epidemiol. 2010; 34:490-3. DOI: 10.1016/j.canep.2010.03.004
9. Yim DJ, Kim OJ, An HJ, Kang H, AHN DH, Hwang SG. Polymorphisms of thymidylate synthase gene 5'- and 3'-untranslated region and risk of gastric cancer in Koreans. *Anticancer Res.* 2010; 30:2325-30.
10. Sulzyc-Bielicka V, Bielicki D, Binczak-Kuleta A, Kaczmarczyk M, Pioch W, Machoy-Mokrzyńska A, Ciechanowicz A, Gołębiewska M, Drozdziak M. *Thymidylate synthase* gene polymorphism and survival of colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-Fluorouracil. *Genet Test and Mole Biomarkers.* 2013; 17(11):799-806. DOI: 10.1089/GTMB.2013.0171
11. Villafranca E, Okruzhnov Y, Dominguez MA, García-Foncillas J, Azinovic J, Martínez E, Illarramendi JJ, Arias F, Martínez-Monge R, Salgado E, Angeletti S, Brugarolas A. Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the *thymidylate synthase* gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol.* 2001; 19:1779–86. DOI: 10.1200/JCO.2001.19.6.1779
12. Edler, D. Glimelius B, Hallström M, Jakobsen A, Johnston PG, Magnusson I, Ragnhammar P, Blomgren H. *Thymidylate synthase* expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2002; 20(7):1721-8. DOI: 10.1200/JCO.2002.07.039
13. Kawakami K, Watanabe G. Identification and Functional Analysis of Single Nucleotide Polymorphism in the Tandem Repeat Sequence of *Thymidylate Synthase* Gene. *Cancer Res.* 2003; 63:6004-7.
14. Marsh S. *Thymidylate synthase* pharmacogenetics. *Invest New Drugs.* 2005; 23:533-7. DOI: 10.1007/s10637-005-4021-7
15. Lurje G, Manegold PC, Ning Y, Pohl A, Zhang W, Lenz HJ. *Thymidylate Synthase* gene variations: predictive and prognostic markers". *Mol Cancer Ther*



2009;8(5):1000–07. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0219

16. Hu Q, Li X, Su C, Chen X, Gao G, Zhang J, Zhao Y, Li J, Zhou C. Correlation between *thymidylate synthase* gene polymorphisms and efficacy of pemetrexed in advanced non-small cell lung cancer. *Expe Ther Med*. 2012; 4:1010-6. DOI: 10.3892/etm.2012.730

17. Gibson, TB. Polymorphisms in the *Thymidylate synthase* gene predict response to 5-fluorouracil therapy in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2006;5(5):321-23.

18. Mandola MV, Stoehmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz HJ, Ladner RD. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the *thymidylate synthase* gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res*. 2003; 63:2898-904.

19. Quintero-Ramos A, Gutiérrez-Rubio SA, Del Toro-Arreola A, Franco-Topete RA, Ocegüera-Villanueva A, Jiménez-Pérez LM, Castro-Cervantes JM,

Barragán-Ruiz A, Vázquez-Camacho JG, Daneri-Navarro A. Association between polymorphisms in the *thymidylate synthase* gene and risk of breast cancer in a Mexican population. *Genet Mol Res*. 2014;13(4):8749-56. DOI: dx.doi.org/10.4238/2014.October.27.16

20. da Silva J, de Lima FA, Bertuzzo CS. *Thymidylate synthase* gene (*TYMS*) polymorphisms in sporadic and hereditary breast cancer. *BMC Res Notes*. 2012;5(676):1-6. DOI: 10.1186/1756-0500-5-676

21. Schwarzenbach H, Goekkurt E, Pantel K, Aust DE, Stoehmacher J. Molecular analysis of the polymorphisms of *thymidylate synthase* on cell-free circulating DNA in blood of patients with advanced colorectal carcinoma. *Int J Cancer*. 2010; 127:881-8. DOI: 10.1002/ijc.25096

22. Ulrich CM, Bigler J, Bostick R, Fosdick L, Potter JD. *Thymidylate synthase* promoter polymorphism, interaction with folate intake, and risk of



- colorectal adenomas. *Cancer Res.* 2002; 62:3361-4.
23. Mandola MV, Stoehlmacher J, Zhang W, Groshen S, Yu M, Iqbal S, Lenz HJ, Ladner R. A 6 bp polymorphism in the *thymidylate synthase* gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics.* 2004; 14(5):319-27. DOI: 10.1097/01.fpc.0000114730.08559.df.
24. Kumar K, Vamsy K, Jamil K. *Thymidylate synthase* gene polymorphisms effecting 5-FU response in breast cancer patients. *Cancer Biomark.* 2010; 6:83-93. DOI: 10.3233/CBM-2009-0121.
25. Skibola CF, Forrest MS, Coppede F, Agana L, Hubbard A, Smith MT, Bracci PM, Holly EA. Polymorphisms and haplotypes in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2004; 104(107):2155-62. DOI: 10.1182/blood-2004-02-0557.
26. Shi Q, Zhang Z, Neumann AS, Li G, Spitz MR, We Q: Case-control analysis of *thymidylate synthase* polymorphisms and risk of lung cancer. *Carcinogenesis.* 2005; 26(3):649-56. DOI: 10.1093/carcin/bgh351.
27. Gallegos-Arreola MP, Peralta-Leal V, Morgan-Villela G, Puebla-Pérez AM. Frecuencia del polimorfismo *TS 1494del6* en pacientes con cáncer colorrectal del Occidente de México. *Rev Invest Clin.* 2008; 60(1):21-30.
28. Mo A, Zhao Y, Shi Y, Qian F, Hao Y, Chen J, Yang S, Jiang Y, Luo Z, Yu P. Association between polymorphisms of *thymidylate synthase* gene 5'- and 3'-UTR and gastric cancer risk: meta-analysis. *Biosci Rep.* 2016; 36:e00429. DOI: 10.1042/BSR20160273.
29. Stanisławska-Sachadyn A, Borzyszkowska J, Krzemiński M, Janowicz A, Dziadziuszko R, Jassem J, Rzyman W, Limon J. Folate/homocysteine metabolism and lung cancer risk among smokers. *Plos One.* 2019; 14(4): e0214462. DOI: 10.1371/journal.pone.0214462.



30. Pullmann R, Abdelmohsen K, Lal A, Martindale JL, Ladner RD. Differential Stability of *Thymidylate synthase* 3'-Untranslated Region Polymorphic Variants Regulated by AUF1. *J Biol Chem.* 2006; 281(33):23456-63. DOI: 10.1074/jbc.M600282200.
31. Thomas F, Hoskins JM, Dvorak A, Tan BR, McLeod H. Detection of the G>C SNP and rare mutations in the 28-bp repeat of *TYMS* using gel-based capillary electrophoresis. *Pharmacogenomics.* 2010;11(12):1751-6. DOI: 10.2217/PGS.10.170.
32. Yawata A, Kim SR, - Miyajim A, Kubo T, Ishida S, Nakajima Y, Katori N, Matsumoto Y, Fukuoka M, Ohno Y, Ozawa S, Sawada, J. Polymorphic tandem repeat sequences of the *thymidylate synthase* gene correlates with cellular-based sensitivity to fluoropyrimidine antitumor agents. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005; 56:465-72. DOI: 10.1007/s00280-005-1018-z.
33. Gusella M, Bolzonella C, Crepaldi G, Ferrazzi E, Padrini R. A novel G/C single-nucleotide polymorphism in the double 28-bp repeat thymidylate synthase allele. *Pharmacogenomics J.* 2006; 6:421-24.
34. Lincz L, Scorgie FE, Garg MB, Ackland SP. Identification of a novel single nucleotide polymorphism in the first tandem repeat sequence of the *thymidylate synthase* 2R allele. *Int J Cancer* 2007; 120(9):1930-4. DOI: 10.1002/ijc.22568.
35. Meulendijks D, Jacobs BAW, Aliev A, Pluim D, van Werkhoven E, Deenen MJ, Beijnen JH, Cats A, Schellens JHM. Increased risk of severe fluoropyrimidine-associated toxicity in patients carrying a G to C substitution in the first 28-pb tandem repeat of the *thymidylate sintase* 2R allele. *Int J Cancer.* 2016; 138:245-53. DOI: 10.1002/ijc.29694.
36. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R. Human *Methylenetetrahydrofolate reductase*: isolation of cDNA, mapping and mutation



- identification. *Nat Genetics*. 1994; 7:195-200.
37. Rezende LM, Lima Marson FA, Passos Lima CS, Bertuzzo CS. Can *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms alter the risk and severity of sporadic breast cancer in Brazilian women? *Clin Breast Cancer*. 2017. DOI: 10.1016/j.clbc.2017.02.004.
38. Gaughan D, Barboux S, Kluijtmans LAJ, Whitehead AS. The human and mouse *methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)* genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the *CLCN6* gene. *Gene*. 2000; 257(2):279-89.
39. Duthie S.J. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull* 1999; 55(3):578-92.
40. Zhang, N. Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its mechanisms in animals. *Anim Nutr* 2015; 1:144-51. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.aninu.2015.09.002.
41. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van del Heuvel LP, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in *methylenetetrahydrofolate reductase*. *Nat Genetics*. 1995; 10:111-3.
42. Castro R, Rivera I, Ravasco P, Camilo ME, Jakobs C, Blom HJ de Almeida IT. 5,10-*methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)* 677CT and 1298AC mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet*. 2004; 41:454-8. DOI: 10.1136/jmg.2003.017244
43. Uleand PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the *MTHFR* C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci*. 2001; 22(4):195-201.
44. Gonzales M, Yu P, Shiao P. *MTHFR* gene polymorphism-mutations and air pollution as risk factors for breast cancer. A Metaprediction Study. *Nurs Res*.



- 2017; 66(2):151-62. DOI: 10.1097/NNR.0000000000000206.
45. Semenza J, Delfino RJ, Ziogas A, Anton-Culver H. Breast cancer risk and *methylenetetrahydrofolate reductase* polymorphism. *Breast Cancer Res Tr.* 2003; 77:217-23.
46. López-Cortés A, Jaramillo-Koupermann G, Muñoz MJ, Cabrera A, Echeverría C, Rosales F, Vivar N, Paz-y-Miño C. Genetic polymorphisms in *MTHFR* (C677T, A1298C), *MTR* (A2756G) and *MTRR* (A66G) genes associated with pathological characteristics of prostate cancer in the Ecuadorian population. *Am J Med Sci.* 2013; 346(6):447-54.
47. van der Put NMJ, Gabreëls F, Stevens EMB, Smeitink AM, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van der Heuvel LP, Blom H. A second common mutation in the *methylenetetrahydrofolate reductase* gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998; 62:1044-61.
48. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in *methylenetetrahydrofolate reductase* (*MTHFR*) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64:169-72.
49. Khazamipour N, Noruzinia M, Fatehmanesh P, Keyhaneh M, Pujol P. *MTHFR* promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: The role of epigenetics in male infertility. *Hum Reprod.* 2009; 24:2361-64. DOI: 10.1093/humrep/dep194.
50. Rotondo JC, Bosi S, Bazzan E, Di Domenico M, De Mattei M, Selvatici R, Patella A, Marci R, Tognon M, Martini F. *Methylenetetrahydrofolate reductase* gene promoter hypermethylation in semen samples of infertile couples correlates with recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod.* 2012; 27:3632-8. DOI: 10.1093/humrep/des319.
51. Ge J, Wang J, Zhang F, Diao B, Song ZF, Shan LL, Wang W, Cao HJ, Li



XQ. Correlation between *MTHFR* gene methylation and pre-eclampsia, and its clinical significance. *Genet Mol Res.* 2015; 14:8021-8. DOI: 10.4238/2015.July.17.10.

52. Coppedè F, Denaro M, Tannorella P, Migliore L. Increased *MTHFR* promoter methylation in mothers of Down syndrome individuals. *Mutat. Res.* 2016; 787:1-6. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2016.02.008.

53. Santana Bezerra H, Severo de Assis C, Dos Santos Nunes MK, Wanderley de Queiroga EI, Modesto Filho J, Alves Pegado Gomes CN, Ferreira do Nascimento RA, Pordeus Luna RC, de Carvalho Costa MJ, de Oliveira NFP, Camati Persuhn D. The *MTHFR* promoter hypermethylation pattern associated with the A1298C polymorphism influences lipid parameters and glycemic control in diabetic patients. *Diabetol. Metab Syndr.* 2019; 11:4 DOI: 10.1186/s13098-019-0399-9.

54. Botezatu A, Socolov D, Iancu IV, Huica I, Plesa A, Ungureanu C, Anton G. *Methylenetetrahydrofolate reductase*

(*MTHFR*) polymorphisms and promoter methylation in cervical oncogenic lesions and cancer. *J Cell Mol Med.* 2013; 17:543-9. DOI: 10.1111/JCMM.12032.

55. Wei LK, Sutherland H, Au A, Camilleri E, Haupt LM, Gan SH, Griffiths LRA. A potential epigenetic marker mediating serum folate and vitamin B12 levels contributes to the risk of ischemic stroke. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:167976. DOI: 10.1155/2015/167976.

56. Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, and Christensen B, Ross M et al. Human *methionine synthase*: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet.* 1996; 5(12):1867-74.

57. Al Farra, HY. *Methionine synthase* polymorphisms (*MTR* 2756 A>G and *MTR* 2758 C>G) frequencies and distribution in the Jordanian population and their correlation with neural tube defects in the population of the northern part of Jordan. *Indian J Hum Genet.* 2010;



- 16(3):138-43. DOI: 10.4103/0971-6866.73405.
58. Elshihawy H, Helal M, Said M, Hammad MA. Design, synthesis, and enzyme kinetics of novel benzimidazole and quinoxaline derivatives as *methionine synthase* inhibitors. *Bioorgan Med Chem*. 2014; 22:550-8.
59. Zhu H, Wicker NJ, Shaw GM, Lammer EJ, Hendricks K, Suarez L, Mark C, Richard F. Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risks for neural tube defects. *Mol Genet Metab*. 2003; 78:216-21. DOI: 10.1016/S1096-7192(03)00008-8.
60. Lu M, Wang F, Qiu J. *Methionine synthase* A2756G polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis involving 18,953 subjects. *Breast Cancer Res Tr*. 2010; 123:213-7. DOI: 10.1007/s10549-010-0755-9.
61. De Cássia Carvalho Barbosa R, da Costa DM, Cordeiro DE, Vieira AP, Rabenhorst SH. Interaction of *MTHFR* C677T and A1298C, and *MTR* A2756G Gene Polymorphisms in Breast Cancer Risk in a Population in Northeast Brazil. *Anticancer Res*. 2012; 32:4805-12.
62. Yu K, Zhang J, Zhang J, Dou C, Gu S, Xie Y, Mao Y, Ji C. *Methionine synthase* A2756G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *Eur J Hum Genet*. 2010; 18:370-8. DOI: 10.1038/ejhg.2009.131.
63. Paz M, Ávila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, Sanchez-Cespedes M, Hermam JG, Esteller M. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res*. 2002; 62(15):4519-24.
64. De Lima EL, da Silva VC, da Silva HAD, Bezerra A, de Moraes VL, de Moraes AL, Cruz RV, Barros MHM, Hassan R, de Freitas AC, Muniz MTC. *MTR* Polymorphic Variant A2756G and Retinoblastoma Risk in Brazilian Children. *Pediatr Blood Cancer*. 2010; 54:904-08. DOI: 10.1002/pbc.22472.
65. Wang Y, Liu Y, Ji W, Qin H, Wu H, Xu D, Tukebai T, Wang Z. Analysis of



MTR and *MTRR* polymorphisms for neural tube defects risk association. *Medicine*. 2015; 94(35)

DOI: 10.1097/MD.0000000000001367.

66. Haghiri R, Mashayekhi F, Bidabadi E, Salehi Z. Analysis of *methionine synthase* (rs1805087) gene polymorphism in autism patients in Northern Iran. *Acta Neurobiol Exp*. 2016; 76:318-23.

67. Raina JK, Sharma M, Panjaliya RK, Bhagat M, Sharma R, Bakaya A. *Methylenetetrahydrofolate reductase* C677T and *methionine synthase* A2756G gene polymorphisms and associated risk of cardiovascular diseases: A study from Jammu region. *Indian Heart J*. 2016; 68:421-30. DOI:

[dx.doi.org/10.1016/j.ihj.2016.02.009](https://doi.org/10.1016/j.ihj.2016.02.009).

68. Ebrahimi A, Hosseinzadeh A, Karimian M. Association of human *methionine synthase* A2756G transition with prostate cancer: a case-control study and in silico analysis. *Acta Med Iran*. 2017; 55(5):297-303.