Journal of College of Education for pure sciences(JCEPS)
Web Site: http://eps.utq.edu.iq/ Email: eps_tqr@yahoo.com
Volume 7, Number 2, May 2017

تردد الطفرة A2756G في جين ***MTR*** لدى مرضى تشوهات القلب الولادية في محافظة ذي قار

أ.م.د.حسن ريسان الركابي[1] وديان كاطـــع الفرطوسي[1]
Widyan_89@yahoo.com Hassanalrkaby@yahoo.com
(1) قسم علوم الحياة – كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ذي قار

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية للكشف عن دور جين ***MTR*** وعلاقته في حدوث تشوهات القلب الولادية في محافظة ذي قار من خلال استخدام تقنية PCR- RFLP . وعلى هذا الأساس تم جمع 120 عينة دم (من مركز الناصرية للقلب) في أنابيب حاوية على مادة الـ EDTA من مرضى مصابين بتشوهات القلب الولادية بأعمار تتراوح بين (شهر – 17 سنة) و110 عينة من الأصحاء بأعمار تتراوح بين (شهر – 17 سنة) وحفظت مباشرة في درجة حرارة - 20 مْ لاستخدامها في استخلاص DNA وتقنية الـ PCR .

وأظهرت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود ارتباط بين تعدد الأشكال الوراثية للجين ***MTR*** والإصابة بتشوهات القلب الولادية عند مقارنتها بمجموعة المقارنة ولكل من الطرازالطافر المتجانس ***(GG)*** (OR=0.64 ; 95%Cl= 0.31-1.30) والطراز الطافر المتباين ***(AG)*** (OR=0.42 ; 95%Cl=0.21-0.83) ، واتضح من النتائج أن الإناث الذين يمتلكون الطراز الطافر المتباين ***(AG)*** قد ازداد لديهم خطر الاصابة بتشوهات القلب الولادية بنسبة فرق (OR=1.86) وبفترة ثقة (0.65 – 5.27) ، وكما بينت النتائج أن الذين يمتلكون الطراز الطافر المتباين ***(AG)*** وضمن الفئة العمرية (شهر- 9سنة) ازداد لديهم خطر الإصابة بتشوهات القلب الولادية بنسبة فرق (OR=3) وبفترة ثقة (0.8 - 12)، واظهرت النتائج عدم وجود ارتباط بين التدخين وتعدد الطرز الوراثية للجين ***MTR*** .

الكلمات المفتاحية : تشوهات القلب الولادية ، جين ***MTR*** ، الطفرة A2756G ، Polymorphism

Journal of College of Education for pure sciences(JCEPS)
Web Site: http://eps.utq.edu.iq/ Email: eps_tqr@yahoo.com
Volume 7, Number 2, May 2017

The mutation frequency A2756G for the MTR gene in patients with Congenital heart defects in the province of Dhi Qar

Hassan Rissan AL-rikabi[(1)] **Widyan Gataa AL-fartosi**[(1)]

Hassanalrkaby@yahoo.com Widyan_89@yahoo.com

(1) Department of Life Sciences - College of Education for Pure Science – University of Dhi Qar

Abstract

The present study aimed to detect the role of MTR gene and their relationship in the incidence of Congenital heart defects in Dhi Qar province, through the use of PCR-RFLP technique on this basis were collected 120 blood samples (from Nasiriyah heart Center) in tubes container on EDTA from patients with congenital heart defects ages ranging between (a month - 17 years) and 110 samples from healthy people ages ranging between (a month - 17 years) and saved directly at a temperature of - 20 ° C for use in the extraction DNA and the

PCR technique.

Resultsof statistical analysis also showed no correlation between polymorphism of the gene MTR and the incidence of congenital heart defects when compared to patients a range of comparison And each of the mutant homogenized style(AG) (OR=0.64 ; 95%CI=0.31-1.30)The style of the mutant differential (GG) (OR= 0.42; 95%CI=0.21-0.83) . It was evident from the results that females who have the mutant heterozygous (AG) has increased their risk of congenital heart defects by deference (OR = 1.86) and the period of confidence (0.65 - 5.27), and the results also showed that those who have the heterozygous differential (AG) and category age (month - 9 years) have increased the risk of congenital heart defects by teams (OR = 3) and the period of confidence (0.8 – 12). and the results showed no correlation between smoking and multiple genotypes of the gene MTR.

Journal of College of Education for pure sciences(JCEPS)
Web Site: http://eps.utq.edu.iq/ Email: eps_tqr@yahoo.com
Volume 7, Number 2, May 2017

Keywords: congenital heart abnormalities, MTR gene, Mutation A2756G, Polymorphism

1. المقـــــدمـة

تشوهات القلب الولادية Congenital heart defects: هي وجود خلل في تركيب القلب والأوعية الدموية الكبيرة التي هي موجودة عند الولادة . وتوجد أنواع متعددة من هذه التشوهات ومعظمها أما عرقله أو انسداد تدفق الدم في القلب أو الأوعية بالقرب منه أو بسبب تدفق الدم خلال القلب في وضع غير طبيعي [1] . كما أن عيوب القلب هي من بين العيوب الخلقية الأكثر شيوعا والسبب الرئيسي للوفيات المرتبطة بعيب خلقي . تحدث CHD في ما يقرب 9 لكل 1000 ولادة حية. العديد من العيوب لا تحتاج للعلاج لكن بعض عيوب القلب الولادية معقده تتطلب الدواء أو الجراحة [2].

كما أنها تشير تركيبيا أو وظيفيا لأمراض القلب التي تكون موجودة عند الولادة [3]. ويعتقد أن هذه الإصابة لم تتغير كثيرا على مر السنين [4]. وتقريبا 33% إلى 5% من تلك التشوهات حرجه وتتطلب التدخل في السنة الأولى من الحياة نفسها[5] . مع ذلك, السبب الحقيقي في حدوث CHDs غير مفهومة. وتؤكد العديد من الدراسات ارتباط CHDs مع متلازمات وراثية (مثل متلازمة داون) أو أنها يمكن أن تكون منشأ متعدد العوامل، التي تنطوي على العوامل الوراثية والبيئية [7,6]. مثل التعرض للملوثات البيئية، نمط حياة الأمهات والاستعداد الوراثي لكل من الوالدين والجنين[8].

تقريبا 90% من المرضى الذين يعانون من CHDs لوحظت في حاله تقييم القلب والأوعية الدموية مع نفخة قلبية ، عدم انتظام ضربات القلب ، سرعة التنفس ، صعوبة في التنفس ، قصور في النمو، زرقة ، خفقان وألم في الصدر [9] .

أكثر هذه التشوهات شيوعا عند الولادة هي عيب الحاجز ألبطيني (30%) ، عيب الحاجزالاذيني (7%)، تضيق الرئوي (7%) ، رباعية فالوت (5%) وتضيق الأبهر (5%) . وتكتشف هذه التشوهات بعد الولادة أو في سن الطفولة أو تمر بمرحلة سبات طويلة ولا تظهر أعراضها ألا بعد سن الطفولة وأحيانا الشباب [11,10] .

ومن أهم عوامل الخطر التي يجب تحديدها للحد من مخاطر التشوهات القلبية هي مرض السكري في الأمهات ، الحصبة الألمانية ، الإنجاب المتأخر(بعد سن الأربعين) واستخدام العقاقير العلاجية أثناء الحمل وتشير التقارير أن استخدام الأمهات للفيتامينات ، بما في ذلك حامض الفوليك ، يرتبط مع الحد من العيوب الخلقية القلبية الوعائية [13,12]. كما أن تدخين الأمهات وتعاطيها للمخدرات يزيد من الخطر النسبي لولادة الرضيع بعيب خلقي في القلب [15,14] .

الـهيموسيستين Homocysteine : هو حامض أميني موجود في الدم . وتعرف المستويات المرتفعة منه باسم الهايبر هيموسيستينيميا hyperhomocysteinemia حيث درس على نطاق واسع في علاقته بنمو أمراض الشرايين التاجية [16] . والمستوى المرتفع من Homocysteine قد يضعف من حركة ووظيفة بطانة القلب أو تلف الشرايين التاجية مما تسبب تدفق الدم بصورة غير طبيعية [17].

ومن الجينات المرشحة علاقتها بحدوث تشوهات القلب الولادية هو جين ***MTR*** يقع على الذراع الطويل لكر وموسوم رقم 1 في الحزمة 43 ويحتوي على 33 أكسون .والذي يستخدم مجموعة المثيل من 5-methyltetrahydrofolate لأعاده مثيلة Remethylation الهيموسيستين tHcy إلى ميثيونين . ويمتلك هذا ألجين تعدد شكلي إذ تسبب الطفرة في جين ***MTR*** تغيير الحامض الاميني الاسبارتيك Aspartic acid الى الحامض الاميني الجلايسين Glycine acid [18] .

وتشفر هذه الجينات الى الانزيمات تعمل على أيض الهيموسيستين أو حامض الفوليك حيث النقص أو تعدد الأشكال في أي من هذه الإنزيمات يشتبه أنها تؤدي إلى خطأ خلقي في التمثيل الغذائي لل Homocysteine وتتسبب أيضا في حدوث homocystinuria. وهذا النقص قد يؤدي الى حدوث أمراض الشرايين التاجية [19].

2. المواد وطرائق العمل

1.2 جمع عينات الدم Collection of Blood Samples

جمعت 120عينة دم من المرضى المصابين بتشوهات القلب الولادية بعد تشخيص أصابتهم بالمرض من قبل الطبيب المختص في مركز الناصرية للقلب, إذ تراوحت أعمار المرضى بين شهر _ 17 سنة كذلك جمعت 110عينة دم لأشخاص أصحاء كمجموعة مقارنة تراوحت أعمارهم بين شهر _ 17 سنة. سحب 2 مل من الدم ووضعت في أنابيب معقمة سعة 2.5 مل تحتوي على مادة مانعة للتخثر EDTA إذ حفظت بشكل مباشر في المجمدة بدرجة حرارة - 20 مْ لحين استخلاص DNA.

2.2. استخلاص DNA من الدم Extraction of DNA from Blood

تم استخلاص DNA من مجموعة المرضى والمقارنة باتباع طريقة Sambrook *et al* (1989) [20]

3.2. الترحيل الكهربائي Electrophoresis

اتبعت Sambrook et al (1989) [20] باستخدام هلام الاكاروز للكشف عن الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA.

4.2. طريقة عمل Polymerase Chain Reaction

استعملت تقنيـة Polymerase Chain Reaction فـي تضخيم جين ***MTR*** اعتمــــــــــاداً على طريقـــة [21].

الجدول (1): تسلسل البادئات المستعملة في تقنية Polymerase chain reaction

Genes	Primer Sequences 5 → 3	Length	Tm	T_A

MTR	F5-TGT TCC AGA CAG TTA GAT GAA AAT C -3	25	60	55
	R5-GAT CCA AAG CCT TTT ACA CTC CTC -3	24	60	55

درجة الانصهار Tm = Melting Temperature

درجة الالتصاق T_A = Annealing Temperature

تم إضافة المواد بحسب ما موضح في الجدول (2) إذ تمزج المواد في أنبوب PCR وكما موضح في أدناه

جدول(2): مواد التفاعل لتقنية Polymerase chain reaction

Chemicals	**Volume**
Master mix.	5 µL
Primer Forward .	1µL
Primer Reverse.	1µL
DNA	5µL
D. W.	8µL
Total volume	20 µL

بعد أكمال جميع الإضافات مزجت العينات بجهاز Vortex ثم نقلت العينات إلى جهاز Thermo cycler وشغل الجهاز حسب البرنامج التالي :-

الجدول(3): خطوات تشغيل برنامج (PCR) للجين *MTR*

St.No.	**Steps**	**Temperature**	**Time**	**No. of Cycles**
1	Denaturation	95Cº	2 min	1
2	Denaturation	95Cº	1 min	35
3	Annealing	55Cº	1.5 min	
4	Extension 1	72 Cº	1 min	
5	Extension 2	72 Cº	7 min	1

وبعد انتهاء برنامج عمل جهاز Thermo cycler رحلت هذه النواتج بواسطة جهاز الترحيل الكهربائي باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 2%. بعدها نقل هلام الاكاروز إلى جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV Light ;

إذ تم ملاحظـة ظهور حزمة عند الزوج القاعـدي 211bp مما يدل على وجـود الجين ***MTR*** بعد مقارنتـه مع DNA marker (100 – 2000 bp).

قطع الجين ***MTR*** باستعمال أنزيم القطع HaeIII وحسب النشرة المرفقة مع الأنزيم من شركة Bioworld .

الجدول (4): مواد التفاعل لقطع ألجين *MTR*

Chemicals	Volume
PCR reaction mixture	10 µL
Nuclease – free water.	18 µL
10 X Buffer R.	2 µL
Hinf1.	1 µL
Total volume	31 µL

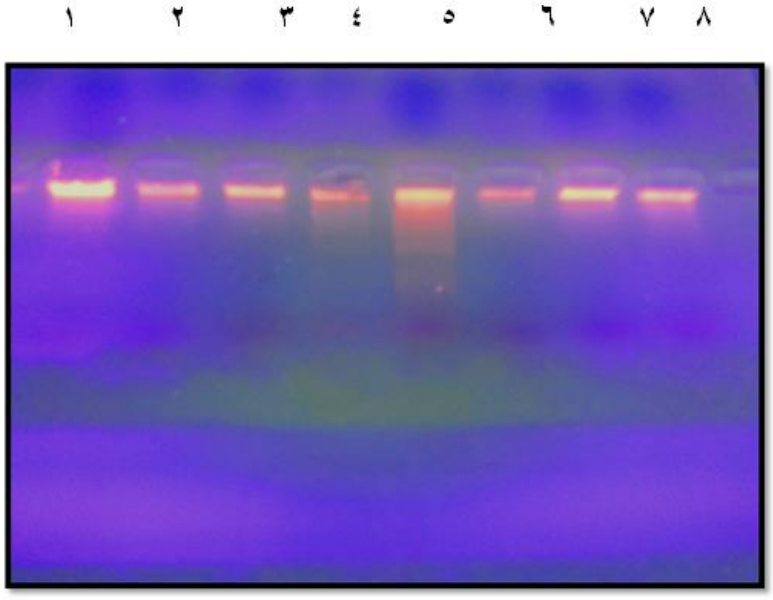
بعد ذلك حضنت المكونات بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 16 ساعة ثم رحلت العينات بواسطة جهاز الترحيل الكهربائي وكانت النتائج كالأتي : ظهور حزمة عند الزوج القاعدي 211bp يدل على الطراز البري Wild **(*AA*)** ، وظهور حزم عند القواعد الزوجية 211,131,80bp يدل على الطراز الطافر المتباين Heterozygous **(*AG*)** ، في حين ظهور حزم عند القواعد الزوجية 131,80bp يدل على الطراز الطافر المتجانس Homozygous **(*GG*)** .

3. التحليل الاحصائي

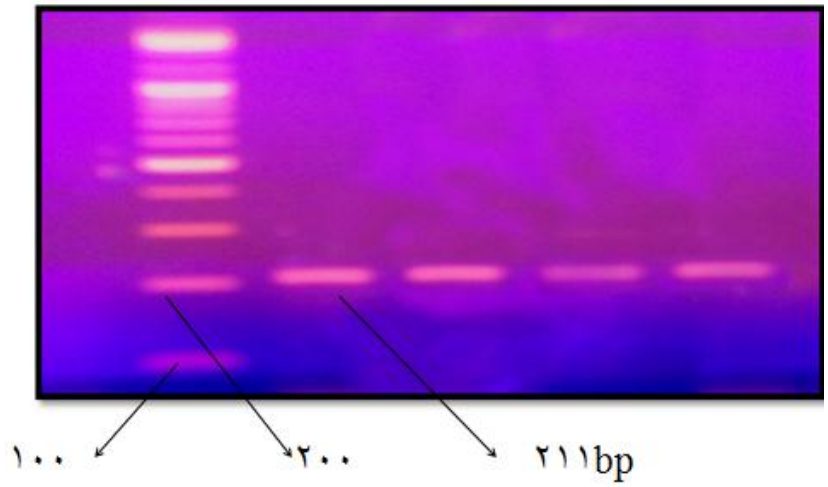
تم اختبار الفروق المعنوية للعينات المدروسة باستعمال اختبار مربع كاي X2 وOR بوساطة برنامج SPSS (ver. 17) تحت مستوى معنوية $P \leq 0.05$ للمقارنة بين العينات ودراسة تردد الطرز الوراثية للجين ***MTHFR***.

4. النتـائج والمناقشة

توضح الصورة رقم (1) الترحيل الكهربائي لحزم الحامض النووي DNA المستخلص من عينات المقارنة والمرضى على هلام الاكاروز بتركيز 0.8%.



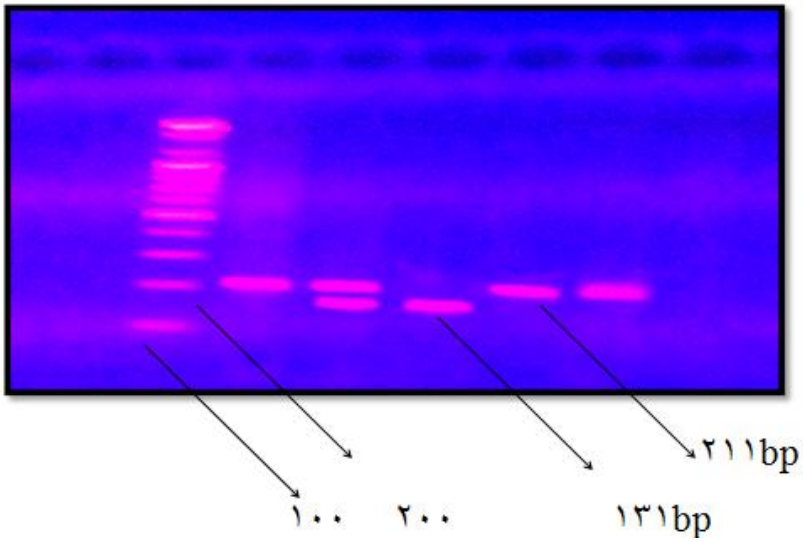
توضح الصورة رقم (2): الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم ألجين ***MTR*** بوساطة تقنية PCR إذ نلاحظ وجود حزم ألجين عند الزوج القاعدي 211bp على هلام الاكاروز بتركيز 2%.



توضح الصورة رقم (3): تحليل نواتج تقنية PCR للجين ***MTR*** باستعمال أنزيم القطع HaeIII اذ تبين الصورة الطرز الوراثية المختلفة بعد أن قطعت بالأنزيم المذكور وكما مبين في أدناه.

نتائج التحليل الإحصائي للدراسة الحالية أظهرت عدم وجود ارتباط بين تعدد الطرز الوراثية للجين ***MTR*** والإصابة بتشوهات القلب الولادية عند مقارنة المرضى بمجموعة المقارنة وكما مبين في الجدول (5).

Journal of College of Education for pure sciences(JCEPS)
Web Site: http://eps.utq.edu.iq/ Email: eps_tqr@yahoo.com
Volume 7, Number 2, May 2017



جدول (5): تردد الطرز الوراثية لجين *MTR* لمجموعتي المرضى والمقارنة

الطرز الجينية	المقارنة (%)n=110	المرضى (%)n=120	OR	95% CI
AA	(% 54)59	(% 69)83	1.0	———
GG	(% 19)21	(% 16)19	0.64	0.31 – 1.30
AG	(% 27)30	(% 15)18	0.42	0.21 – 0.83

OR= Odds Ratio

95%CI = Confidence Interval

وجاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع ما توصل اليه [22]. أذ لاحظ عدم وجود فروق معنوية لكلا الطرازين **(*AG*) (*GG*)** (OR=0.84 ; 95%CI=0.35 - 2.01). وكذلك اتفقت نتائج هذه الدراسة مع [23].بعدم ارتباط الاصابة مع تعدد الاشكال الوراثية للجين *MTR* . وكما اتفقت نتائج هذه الدراسة مع [24].اذ لاحظ عدم وجود ارتباط بين تعدد الاشكال الوراثية للجين وخطر الاصابة أذ أظهرت وجود علاقة عكسية بين تناول حامض الفوليك وCHD.

من نتائج الدراسة الحالية نجد أن الاناث يزداد لديهم خطر الاصابة بتشوهات القلب الولادية بحوالي مرتين تقريبا (OR=1.86) اكثر من الذكور في حالة وجود الطرازالطافر المتباين **(*AG*)** بينما وجود الطراز **(*GG*)** لم يظهر أي فروق معنوية. وكما مبين في الجدول (6)

جدول (6): تردد الطرز الوراثية لجين *MTR* حسب الجنس

الطرز الجينية	ذكور (%)n=62	اناث (%)n=58	OR	95% CI
AA	(% 72.58)45	(% 65.5)38	1.0	———
GG	(% 16.12)10	(% 15.5)9	1.0	0.39 – 2.89
AG	(% 11.29) 7	(% 19)11	1.86	0.65 – 5.27

OR= Odds Ratio

95%CI =Confidence Interval

واتفقت نتائج هذه الدراسة مع دراسة [25]. حيث ذكرت أن الإناث هم الاكثر اصابة بـ CHD في كلا الطرازين ***(AG)*** (OR=1.69) و ***(GG)*** (OR=1.60) على الرغم لم تظهر النتائج الحالية فروق معنوية للطراز ***(GG)***. بالمقابل لم تتفق نتائج هذه الدراسة مع [26].حيث بينت أن الذكور هم الاكثر تضررا بـ CHD. ودعمت هذه النتائج من خلال الدراسة [27]. التي أظهرت أن النمط الوراثي ***(GG)*** يزداد بمقدار مرتين تقريبا في الذكور عند مقارنة مجموعة المرضى مع مجموعة المقارنة (OR=1.55). بينما ذكرت الدراسة [22] عدم وجود فروق معنوية بين تعدد الاشكال الوراثية والجنس ولكلا الطرازين (OR=0.15).

تشير النتائج المبينة في الجدول (7) الى أن خطر الاصابة بتشوهات القلب الولادية يزداد بمقدار ثلاث مرات أكثر لمن هم ضمن الفئة العمرية (شهر- 9 سنة) ويحملون الطراز الطافر المتباين ***(AG)*** بينما لم يلاحظ فرق معنوي لحاملي الطراز الطافر المتجانس ***(GG)***.

جدول (7): تردد الطرز الوراثية لجين *MTR* حسب الفئات العمرية

الطرز الجينية	شهر- 9 سنة (%)n=108	10 - 19 (%)n=12	OR	95% CI
AA	(% 70.37) 76	(% 58.33)7	1.0	———
GG	(% 16.66)18	(% 8.33)1	0.60	0.07 – 5.21
AG	(% 12.96) 14	(% 33.33)4	3	0.8 – 12

OR= Odds Ratio

95%CI =Confidence Interval

بينت نتائج الدراسة الحالية عدم وجود علاقة بين تعدد الطرز الوراثية للجين ***MTR*** والتدخين على خطر الإصابة بتشوهات القلب الولادية وكما مبين في الجدول (8).

جدول (8): تردد الطرز الوراثية لجين *MTR* حسب تدخين الابوين

الطرز الجينية	غير مدخن (%)n=75	مدخن (%) n=45	OR	95% CI
AA	(% 69.33)52	(% 68.89)31	1.0	———
GG	(% 17.33)13	(% 13.33)6	0.77	0.26 – 2.24
AG	(% 13.33)10	(% 17.78)8	1.34	0.47 – 3.76

OR= Odds Ratio

95%CI =Confidence Interval

أظهرت نتائج التحليل الاحصائي للدراسة الحالية عدم وجود فروق معنوية بين تعدد الطرز الوراثية للجين *MTR* وتدخين الابوين في كل من الطرازين ***(GG)*** و ***(AG)*** على التوالي (OR= 0.77 ; 95%CI= 0.26- 2.24) و(OR= 1.34 ; 95%CI= 0.47 - 3.76) بالمقابل لم تتوافق نتائج الدراسة الحالية مع [28]. أذ لاحظ وجود

ارتباط بين تعدد الطرز الوراثية للجين *MTR* والتدخين. حيث يمثل التدخين عامل خطر لسمية المادة الوراثية لما يحتويه التبغ من مواد مسرطنة وبالتالي أثره على تعدد الأشكال الوراثية . وكما يرتبط النمط الوراثي ***(GG)*** مع زيادة حساسية Clastogenicity للتدخين التبغ [29].

5. الاستنتاجات

1. عدم وجود ارتباط كبير بين تعدد الاشكال الوراثية ***MTRA2756G***، وخطر الاصابة بتشوهات القلب الولادية.
2. .عدم وجود علاقة بين تعدد الاشكال الوراثية ***MTRA2756G*** والتدخين للإصابة بتشوهات القلب الولادية.

6. التوصيات

1. على وسائل الإعلام والتلفزيون والإذاعة، اقامة المحاضرات في جمعيات المجتمع المختلفة أو في المراكز الصحية بشأن عوامل الخطر والوقاية من تشوهات القلب الولادية.
2. أجراء دراسات مستقبلية وبأكبر عدد من العينات حول الكشف عن الاشكال الوراثية الاخرى من جينات الهيموسيستين وعلاقتها في حدوث CHD.

7. المصادر

[1].Lozano, R (Dec 15, 2012). "Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010.". Lancet380(9859): 2095–128.

[2]."Congenital Heart Defects in Children Fact Sheet". American Heart Retrieved 30 July 2010.

[3].Fyler DC, Buckley LP, Hellenbrand WE,Cohn HE.Report of the New England Regional infant Care Program.Pediatries 1980;65 Supp:375-461.

[4].Abdulla R. What is the Prevalence of Congenital heart disease? Pediatr Cardiol 1997;18:268.

[5].Hoffman JIE, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. J Am Coll Cardiol. 2002; 39: 1890-1900.

[6]. Tennstedt C, Chaoui R, Korner H and Dietel M (1999). Spectrum of congenital heart defects and extracardiac malformations associated with chromosomal abnormalities: results of a seven year necropsy study. Heart 82: 34-39.

[7]. Botto, LD. & Correa, A. (2003). Decreasing the burden of congenital heart anomalies: an epidemiologic evaluation of risk factors and survival. Progress in Pediatric Cardiology, Vol.18, pp. 111–121, ISSN 1058-9813.

[8]. Botto LD, Correa A. Decreasing the burden of congenital heart anomalies: an epidemiologic evaluation of risk factors and survival. Prog Pediatr Cardiol. 2003; 18: 111-21.

[9]. Borzouee, M. & Jannati, M. (2008). Distribution and Characteristecs of the Heart Disease in Pediatric Age Group in Southern Iran. Iranian Cardiovascular Research Journal, Vol.2 , No.1, pp. 48-51, ISSN1735-8868.

[10]. Hoffman JI. Incidence of congenital heart disease: I. Postnatal incidence. Pediatr Cardiol-1995;16:103-13.

[11]. Dadvand P, Rankin J, Shirley MD, Rushton S, Pless-Mulloli T. Descriptive epidemiology of congenital heart disease in Northern England. Paediatr Perinat Epidemiol 2009; 23: 58-65.

[12]. Smedts HP, de Vries JH, Rakhshandehroo M, Wildhagen MF, Verkleij-Hagoort AC, Steegers EA, Steegers-Theunissen RP. High maternal vitamin E intake by diet or supplements is associated with congenital heart defects in the offspring. BJOG 2009; 116: 416-23.

[13]. Loffredo CA, Wilson PD, Ferencz C. Maternal diabetes: an independent risk factor for major cardiovascular malformations with increased mortality of affected infants . Teratology 2001; 64: 98-106.

[14]. Autti-Ramo I, Fagerlund A, Ervalahti N, Loimu L, Korkman M, Hoyme HE. Fetal alcohol spectrum disorders in Finland: clinical delineation of 77 older children and adolescents. Am J Med Genet Part A 2006; 140: 137-43.

[15]. Källen K. Maternal smoking and congenital heart defects. Eur J Epidemiol 1999; 15: 731-7. [16]. Deeparani, T., Pillai, M. R., and Elavazhagan T. Detection of *MTHFR* C677T and A1298C Gene Polymorphism in Congenital Heart Disease. Middle East Journal of Scientific Research. 2009. 4(2), 127-2.

[17]. Bruneau, B. G. The developmental genetics of congenital heart disease. Nature. 2008. 451(7181), 943-48.

[18]. Yamada K, Gravel RA, Toraya T, Matthews RG (2006). Human methionine synthase reductase is a molecular chaperone for human methionine synthase. Proc Natl Acad Sci USA 103, 9476–9481.

[19]. García-Fragoso, L., García-García, I., Leavitt G., Renta, J., Ayala, M. A., and Cadilla, C. L. MTHFR polymorphisms in Puerto Rican children with isolated congenital heart disease and their mothers. International journal of genetics and molecular biology. 2010. 2(3), 43-7.

[20].Sambrook,K.J. ;Fritsh,E.F. and Maniatis,T.(1989). Molecular cloning laboratory manual, 2nd ed., cold spring Harbor laboratory prees. U.S.A.

[21].Vinukonda, G., Mohammad, N. S., Jain, J. M N., Chintakindi, K. P., and Akella, R. R. D. Genetic and environmental influences on total plasma homocysteine and coronary artery disease (CAD) risk among South Indians. Clinica Chimica Acta. 2009. 405(1), 127-1

[22]. Doolin, M. T., Barbaux, S., McDonnell, M., Hoess, K., Whitehead, A. S., and Mitchell, L. E. (2002). Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida. Am. J. Hum. Genet. 71, 1222-1226.

[23]. Lim U, Wang SS, Hartge P, Cozen W, Kelemen LE, Chanock S, et al. Gene-nutrient interactions among determinants of folate and one-carbon metabolism on the risk of non-Hodgkin lymphoma: NCI-SEER case-control study. Blood 2007;109: 3050-3059.

[24].World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington (DC): AICR; 2007.

[25].Zhang Z, Shi Q, Liu Z, Sturgis EM, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14: 1188-1193.

[26]Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer Lancet 2008; 371: 1695-1709.

[27].Kruszyna L, Lianeri M, Rydzanicz M, Gajecka M, Szyfter K, Jagodzinski PP. Polymorphic variants of folate metabolism genes and the risk of laryngeal cancer. Mol Biol Rep 2010; 37: 241-247.

[28].Albertini,R.J. et al. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of effects of carcinogens in humans. International Programme on genotoxic Chemical Safety. Mutat. Res., 463, 111–172.

[29].Catala´n,J. et al. (2009). Chromosomal aberrations in railroad transit workers: effect of genetic polymorphisms. Environ. Mol. Mutagen., 50 304–316.