

Victoria Hlistun, V. Scurtu, C. Boiciuc, Natalia Uşurelu, Victoria Sacară
**DEREGLĂRI LA NIVELUL GENELOR CICLULUI FOLAT ŞI METIONINIC LA FEMEI CU PIERDERI
REPRODUCTIVE**

ISMP Institutul Mamei și Copilului (Director general - dr.med.comf. univer.Ștefan Gașcan)
Centrul de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală (Director - dr.med. M. Strătilă)

SUMMARY

FOLATE AND METHIONINE CYCLE GENES MUTATION IN THE WOMEN WITH OF RECURRENT PREGNANCY LOSS

Key words: MTHFR gene, MTR gene, MTRR gene, polymorphism, recurrent pregnancy loss

Background: Pathogenesis in recurrent pregnancy loss (RPL) is complex and involves the interaction of multiple genetic and environmental factors. It is supposed that genetic polymorphisms in MTHFR (C677T and A1298C), MTR (A2756G) and MTRR (G66A) genes may be associated with the risk of recurrent pregnancy loss. In this study, we aimed to investigate the association between the polymorphism of MTHFR, MTR, MTRR genes and the pregnancy loss.

Methods: In this study we determined the genotypic frequencies of the MTHFR, MTR, MTRR gene polymorphisms in a sample of 274 women from Moldova, 166 with 2 and more miscarriages and 108 without history of miscarriages, with 2 healthy births. The genomic DNA was extracted from the peripheral blood collected on EDTA. The methods used to study polymorphisms were PCR and PCR-RFLP. Statistical analysis was performed using www.gen-exp.ru site.

Results: The results of this study showed that women with recurrent pregnancy loss have a higher proportion of the MTHFR677TT, MTHFR 677CT, MTR2756AG, MTRR66GG genotype compared with the control group, does not present significant differences between the study group and control ($p>0.05$). The test Hardy-Weinberg was applied for the control and research group.

Have been established no statistically significant differences ($p>0.05$) between the observed and theoretically expected genotypic frequencies for MTHFR677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G polymorphisms, but for MTRR G66A polymorphism have found the Hardy-Weinberg disequilibrium in control and research groups ($\chi^2=22.81$, $p=0.000$, respectively $\chi^2=28.31$, $p=0.000$).

Conclusion: Our study revealed the role of folate and methionine cycle genes polymorphisms (MTHFR, MTR, MTRR) in the etiology of recurrent pregnancy loss showed no correlation between the results obtained from the two groups ($\chi^2<5$, $p>0.05$), but the risk of pregnancy loss is higher for women carrying MTR 2756AG genotype, OR=1.38, 95% CI [0.81-2.34], as well as MTRR 66AA genotype (OR=1.19, 95% CI [0.21-6.59]).

РЕЗЮМЕ

**НАРУШЕНИЕ В ГЕНАХ ФОЛАТНОГО И МЕТИОНИНОВОГО ЦИКЛА У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ
НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ**

Ключевые слова: MTHFR ген, MTR ген, MTRR ген, полиморфизм, невынашивание беременности.

Актуальность: Патогенез привычного невынашивания беременности (ПНБ) сложный и включает взаимодействие нескольких генетических и экологических факторов. Предполагается, что генетические полиморфизмы в генах MTHFR (C677T и A1298C), MTR (A2756G) и MTRR (G66A) могут быть связаны с риском ПНБ. В этом исследовании, мы изучали корреляции между этими полиморфизмами и ПНБ.

Методы: Определялись генотипические частоты полиморфных генов MTHFR, MTR, MTRR у 274 женщин из Молдовы, из которых 166 женщин с двумя и > потерями и 108 без потерь с 2 нормальными родами. Геномную ДНК экстрагировали из периферической крови. Были использованы следующие молекулярно-генетические методы: PCR и PCR-RFLP. Статистическая обработка с использованием сайта www.gen-exp.ru.

Результаты: Результаты данного исследования показали, что женщины с привычным невынашиванием имеют более высокую долю MTHFR677TT, MTHFR 677CT, MTR 2756AG, MTRR 66GG генотипа по сравнению с контрольной группой, но данные величины не являются статистически значимыми ($p>0,05$). Тест Харди-Вайнберга был проведен в группе исследуемой и контрольной группе и при сравнении наблюдаемых генотипических частот и теоретически ожидаемым для MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, не было выявлено статистически значимых различий ($p>0,05$), но для полиморфизма MTRR G66A наблюдалось статистически значимое отклонение от распределения Харди-Вайнберга в исследуемой и контрольной группе ($\chi^2=22,81$, $p=0,000$, соответственно $\chi^2=28,31$, $p=0,000$).

Выводы: Исследование не выявило существенных различий между частотами генотипов в двух исследуемых группах ($\chi^2<5$, $p>0,05$), но риск ПНБ выше в 1,5 раза для женщины, несущих MTR 2756AG генотип, OR=1.38, 95% CI [0.81-2.34], а также несущих MTRR 66AA генотип (OR=1.19, 95% CI [0.21-6.59])

Introducere. Pierderea reproductivă constituie una din componentele importante ale eșecului reproductiv la specia umană. Literatura de specialitate, arată că între 40 și 60% cazuri, cu toate investigațiile efectuate, această maladie este declarată, în final, idiopatică. În acest context, cercetarea medicală își îndreaptă atenția, în ultimii ani, spre diverse mecanisme care ar putea să conducă la elucidarea cauzelor pierderilor reproductive. Unele din aceste mecanisme vizează dezvoltarea și funcționarea placentei, vascularizația acesteia, sau alterarea altor procese fiziologice și moleculare care pot influența în sens negativ dezvoltarea produsului de concepție [7].

La nivel molecular, se studiază metabolismul folaților și al homocisteinei, fiind condiționate nu doar de aportul extern de folați, dar aflându-se și sub influența modului în care funcționează o serie de proteine și enzime implicate, expresia genelor ce codifică aceste proteine este subiect important de studiu. Variantele alelice ale unor gene ce codifică compuși implicați în metabolismul folaților și homocisteinei au fost cercetate, în încercarea de a găsi eventualii factori de risc genetici ce se pot asocia cu pierderi de sarcină. Cu acest scop, în populația din Republica Moldova, se cercetează polimorfismele genelor *MTHFR* (*C677T* și *A1298C*), *MTR* (*A2756G*) și *MTRR* (*G66A*).

Metilentetrahidrofolat reductaza (*MTHFR*) este o enzimă care catalizează reducerea 5,10-metilenetetrahidrofolatului la 5-metilenetetrahidrofolat, un cofactor în remetilarea homocisteinei la metionină [3]. S-a demonstrat că purtătorii genotipului *677TT* au o activitate enzimatică de 30%, comparativ cu genotipul *677CC*, iar heterozigoții compuși (*677CT+1298AC*) au o activitate enzimatică de 65% din activitatea normală a enzimei [1]. Variantele genotipice ale *MTHFR A1298C* determină o scădere a activității enzimaticice mai pronunțată la genotipul homozigot (*C/C*) decât la cel heterozigot (*A/C*) [10].

Metionin sintaza (*MTR*) catalizează reacția de remetilare a homocisteinei la metionină, esențială pentru menținerea intracelulară a metioninei și a concentrațiilor normale de homocisteină [5].

Metionin-sintaza-reductaza (*MTRR*) catalizează regenerarea metilcobalaminei, un cofactor pentru *MTR*.

Astfel, activitatea *MTR* este întreținută de către *MTRR*. Polimorfismele genelor *MTR* (*A2756G*) și *MTRR* (*G66A*) determină nivelul de homocisteină și hipometilarea ADN-ului [4]. Deci formele mutante și heterozigote ale acestor gene sunt asociate cu risc crescut de a dezvolta hiperhomocisteinemie și anumite complicații ale sarcinii ce includ anomalii cromozomiale, malformații congenitale, pierderi recurente de sarcină, afecțiuni ale placentei și preeclampsia [3, 11]. Mai mult, pe lângă consecințele asupra embrionului sau fătului, se pot observa și fenomenele tromboembolice survenite tardiv în sarcină și chiar în perioada post-partum [11].

Scopul lucrării: Studiarea rolului polimorfismelor genelor ciclului folat și metioninei (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR*) în etiologia pierderilor reproductive la femei din Republica Moldova.

Materiale și metode

Grupuri de studiu. Cercetarea actuală a fost realizată ca un studiu observațional de tip caz control, la care au participat 274 de femei. Participantele la studiu au fost recrutate din rândul pacientelor care s-au prezentat pentru consult, investigații și sfat genetic în Laboratorul de Genetică Moleculară Umană, în cadrul Institutului Mamei și Copilului, între 2011-2014, precum și femei recrutate pe bază de voluntariat din populația generală. Cele 274 de femei, majoritatea moldovence, cu vârstă medie de 32 ani, au fost împărțite în două loturi: 166 de femei au constituit lotul de paciente - femei de vârstă fertilă, cu cel puțin 2 pierderi de reproducere în antecedente și 108 femei ce au avut cel puțin 2 sarcini normale, fără antecedente de avort au constituit lotul de control. Au fost colectate probe de sânge periferic (2.5 ml/probă) de la ambele grupuri, din care a fost extras ADN-ul genomic.

PCR-RFLP. Polimorfismul genelor *MTHFR* (*C677T* și *A1298C*), *MTR* (*A2756G*) și *MTRR* (*G66A*) a fost determinat prin reacția de polimerizare în lanț, efectuată în amplificatorul Eppendorf MastercyclerPro, utilizând anumite programe de amplificare (tabelul 1), urmată de restricția fragmentelor (PCR-RFLP).

Tabelul 1

Secvența primerilor utilizați în cercetare

Nr.	Denumirea mutației	Secvența primerilor	Temperatura de aliniere	Enzima de restricție
1	MTHFR(C677T)	F: 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'	60°C	HinfI
		R: 5'-AGGCGGTGCGGTGAGAGTTG-3'		
2	MTHFR (A1298C)	F: 5'-CTTTGCGGAGCTGAAGGACTACTAC-3'	61°C	MboII
		R: 5'-CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG-3'		
3	MTR(A2756G)	F: 5'-GGTGCCAGGTATACAGTGACTCT-3'	58°C	HaeIII
		R: 5'-GATCCAAAGCCTTTTACTACTCCTC-3'		
4	MTRR(G66A)	F: 5'-AAGGCCATCGCAGAAGACAT-3'	58°C	NdeI
		R: 5'- CACTCCCAACCAAAATTCTTCAA-3'		

Polimorfismul *C677T* a fost determinat utilizând enzima de restricție *HinfI* (Thermo scientific), iar mutația *A1298C* a fost determinată prin digestie cu enzima de restricție *MboII* (Thermo scientific). Reacțiile are loc la temperatura de 37°C timp de 12 ore, după

care se efectuează electroforeza pentru vizualizarea rezultatelor (figura 1, A și B). Polimorfismele în genele *MTR*(*A2756G*) și *MTRR*(*G66A*) au fost identificate în urma restricției cu enzimele *HaeIII* și *NdeI* (Thermo scientific). În urma electroforezei se observă benzi de diferită lungime (figura 1, C și D).

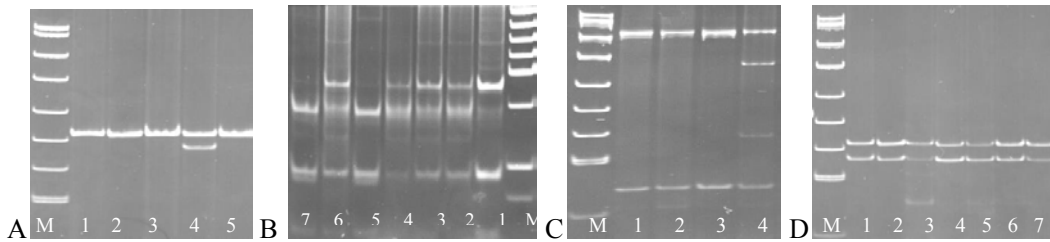


Figura 1. Electroforeogramele analizei polimorfismelor genelor *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*.

Figura - 1A (<i>MTHFR</i> <i>C677T</i>)	Figura - 1B (<i>MTHFR</i> <i>A1298C</i>)	Figura - 1D (<i>MTR</i> <i>A2756G</i>)	Figura - 1C (<i>MTRR</i> <i>G66A</i>)
M – marker O'GeneRuler DNA Ladder, 100-1000 bp (Thermo scientific); 677CC-1,2,3,5 (197 pb); 677CT-4 (175 pb și 197 pb); 677TT-(175pb).	M – marker O'GeneRuler DNA Ladder, 100-1000 bp (Thermo scientific); 1298AA-5, 7 (30, 56pb) 1298AC-2, 3, 4, 6 (30, 56, 80pb) 1298CC-1 (30 și 80pb)	M – marker O'GeneRuler DNA Ladder, 100-1000 bp (Thermo scientific); 2756AA-1, 2, 3 (420, 83 pb) 2756GA-4 (420, 268, 152, 83 pb)	M – marker O'GeneRuler DNA Ladder, 100-1000 bp (Thermo scientific); 66AA-(145 pb) 66AG-1, 2, 4, 5, 6, 7 (122, 145 pb) 66GG-(122 pb)

Analize statistice. Genotipurile au fost introduse într-o bază de date de tip Excel. Frecvențele genotipice au fost calculate pentru ambele grupuri și testul χ^2 a fost aplicat pentru a stabili dacă distribuția genotipurilor este în echilibru Hardy-Weinberg. S-a calculat riscul relativ - odds ratio (OR), pentru un interval de încredință de 95%. Rezultatele au fost considerate statistic semnificative la o valoare $p < 0,05$. Calculele statistice au fost efectuate cu ajutorul calculatorului online gen-exp.ru.

Rezultate și discuții. Ciclul acidului folic reprezintă o cascadă de procese reglate de enzime care au drept coenzime derivați ai acidului folic. Elementul principal al acestor procese este sinteza metioninei din homocisteină [2].

Aceasta se realizează în procesul conversiei folaților: din 5,10-metilenetetrahidrofolat la 5-metilenetetrahidrofolat, care deține gruparea metil necesară conversiei homocisteinei în metionină. Restabilirea folaților are loc cu participarea enzimei metilentetrahidrofolat-reductaza (*MTHFR*). Gruparea metil este transferată vitaminei B12 care o cedează la rândul său homocisteinei cu formarea metioninei prin participarea enzimei metionin-sintaza (*MTR*), activitatea căreia depinde de metilarea cu ajutorul metionin-sintazei-reductazei (*MTRR*) [9].

La indivizii sănătoși, nivelul homocisteinei în plasmă și metabolismul ei sunt reglate de diferiți factori ai mediului și genetici, care determină creșterea nivelului

de homocisteină [8]. Variantele genetice ale genelor implicate în metabolismul folatului și homocisteinei pot acționa ca factori predispuși în dezvoltarea anormală a fătului și în pierderi reproductive [6].

Astfel, aceste gene (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR*) au fost cercetate la populația Republicii Moldova. Se observă dominarea genotipului heterozigot al genei *MTHFR* (*MTHFR 677CT*) în grupul de cercetare (52%) comparativ cu grupul control (47%), (OR=0.83, 95%CI=0.51-1.35), precum și genotipul *MTHFR 677TT*, cu o frecvență de 10% în grupul pacientelor și de 8% la femeile sănătoase (OR=0.85, 95%CI=0.36-2.00). Diferențe observăm și în cazul genei *MTR*, al cărei genotip heterozigot (*MTR 2756AG*) predomină în grupul pacientelor (OR=1.38, 95%CI=0.81-2.34) (tabelul 2). În ceea ce privește formele normale ale genelor, purtătorii genotipului *MTHFR 1298AA* domină în rândul femeilor cu pierderi reproductive (50%), comparativ cu femeile sănătoase (45%) (OR=1.20, 95%CI=0.73-1.99), la fel și în cazul genotipului *MTRR 66GG* (25% femei din grupul de cercetare și 19% femei din grupul control), (OR=1.36, 95%CI=0.74-2.52) (tabelul 2). Dar se constată că nu există diferențe statistice semnificative între distribuția tuturor polimorfismelor în grupurile control și de cercetare ($p > 0.05$), probabil, din cauza grupurilor mici incluse în cercetare.

Tabelul 2.

Distribuția polimorfismului în grupul control și cel de cercetare

Genotip	Grupul de cercetare		Grupul control		χ^2		P	OR	
	N=166	%	N=108	%	χ^2	df		OR	95% CI
MTHFR 677CC	64	38	48	44	0.95	2	0.62	1.28	0.78–2.08
MTHFR 677CT	86	52	51	47				0.83	0.51–1.35
MTHFR 677TT	16	10	9	8				0.85	0.36–2.00
MTHFR 1298AA	83	50	44	45	0.57	2	0.75	1.20	0.73–1.99
MTHFR 1298AC	73	44	46	42				0.87	0.53–1.44
MTHFR 1298CC	10	6	7	7				0.82	0.30–2.24
MTR 2756AA	102	61	69	67	1.71	2	0.43	0.79	0.47–1.32
MTR 2756AG	60	36	30	29				1.38	0.81–2.34
MTR 2756GG	4	2	4	4				0.61	0.15–2.50
MTRR 66GG	41	25	19	19	1.07	2	0.59	1.36	0.74–2.52
MTRR 66GA	121	73	77	79				0.73	0.41–1.32
MTRR 66AA	4	2	2	2				1.19	0.21–6.59

Distribuția polimorfismului genei MTHFR

La nivelul genei *MTHFR* au fost studiate 2 polimorfisme: *C677T* și *A1298C*. Fiecare a fost supus testului Hardy-Weinberg, rezultatele cărora sunt

înregistrate în tabelele 3 și 4. Datele obținute au fost comparate cu cele teoretic așteptate, iar deviația statistic semnificativă de la echilibrul Hardy-Weinberg nu a fost înregistrată ($\chi^2 < 5$, $p > 0.05$).

Tabelul 3

Testul Hardy-Weinberg pentru grupul control și de cercetare pentru gena *MTHFR*

Genotip	Control	HWE	χ^2	P
MTHFR 677CC	0.444	0.463	0.40	0.53
MTHFR 677CT	0.472	0.435		
MTHFR 677TT	0.083	0.102		
Genotip	Cercetare	HWE	χ^2	P
MTHFR 677CC	0.386	0.415	1.48	0.22
MTHFR 677CT	0.518	0.458		
MTHFR 677TT	0.096	0.126		

Tabelul 4

Testul Hardy-Weinberg pentru grupul control și de cercetare pentru gena *MTHFR*

Genotip	Control	HWE	χ^2	P
MTHFR 1298AA	0.454	0.477	0.58	0.45
MTHFR 1298AC	0.474	0.427		
MTHFR 1298CC	0.072	0.096		
Genotip	Cercetare	HWE	χ^2	P
MTHFR 1298AA	0.500	0.518	0.70	0.40
MTHFR 1298AC	0.440	0.403		
MTHFR 1298CC	0.060	0.078		

Distribuția polimorfismului genelor MTR și MTRR
La compararea repartiției frecvenței genotipurilor observate și celor teoretic așteptate, în cazul polimorfismului *MTR A2756G*, nu s-a elucidat o deviație statistic semnificativă de la echilibrul Hardy-Weinberg pentru grupul control și de cercetare ($\chi^2=0.01$, $p=0.91$ și respectiv $\chi^2=1.18$, $p=0.28$) (tabelul 5). Frecvența genotipică a polimorfismului genei *MTRR* în grupul control este:

Tabelul 5

Testul Hardy-Weinberg pentru grupul control și de cercetare pentru gena *MTR A2756G*

Genotip	Control	HWE	χ^2	P
MTR 2756AA	0.670	0.665	0.01	0.91
MTR 2756AG	0.291	0.301		
MTR 2756GG	0.039	0.034		
Genotip	Cercetare	HWE	χ^2	P
MTR 2756AA	0.614	0.632	1.18	0.28
MTR 2756AG	0.361	0.326		
MTR 2756GG	0.024	0.042		

$p^2(GG)=0.194$, $2pq(GA)=0.786$, $q^2(AA)=0.020$. Aceste date sunt diferite de cele teoretic așteptate, provocând o deviație statistic semnificativă de la echilibrul Hardy-Weinberg ($\chi^2=22.81$, $p=0.000$). În grupul de cercetare, la fel, se constată diferențe statistic semnificative între frecvența genotipică observată și cea teoretic așteptată ($\chi^2=28.31$, $p=0.000$) (tabelul 6).

Tabelul 6

Testul Hardy-Weinberg pentru grupul control și de cercetare pentru gena *MTRR*

Genotip	Control	HWE	χ^2	P
MTRR 66GG	0.194	0.344	22.81	0.000
MTRR 66GA	0.786	0.485		
MTRR 66AA	0.020	0.171		
Genotip	Cercetare	HWE	χ^2	P
MTRR 66GG	0.247	0.374	28.31	0.0000
MTRR 66GA	0.729	0.475		
MTRR 66AA	0.024	0.151		

Cercetarea noastră a demonstrat rolul polimorfismelor genelor ciclului folat și metioninic (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR*) în etiologia pierderilor reproductive la femei din Republica Moldova. Rezultatele arată că genele ciclului metioninic (*MTR*, *MTRR*) au o asociere mai pronunțată cu pierderea de sarcină, în special genotipul heterozigot *MTR 2756AG* și cel mutant *MTRR 66AA*. Aceste polimorfisme determină nivelul de homocisteină și hipometilarea ADN-ului, fiind asociate cu risc crescut de a dezvolta hiperhomocisteinemie și anumite complicații ale sarcinii.

Concluzii

1. Rezultatele cercetării au demonstrat că distribuția polimorfismelor *MTHFR C677T*, *MTHFR A1298C*, *MTR A2756G*, *MTRR G66A* în grupul control și în rândul pacienților nu a prezentat diferențe statistic semnificative ($p > 0.05$).
 2. A fost aplicat testul Hardy-Weinberg pentru grupul control și de cercetare. La compararea frecvențelor genotipice observate și cele teoretic așteptate pentru polimorfismele *MTHFR C677T*, *MTHFR A1298C*, *MTR A2756G*, nu s-au observat diferențe statistic semnificative ($p > 0.05$). În cazul polimorfismului *MTRR G66A*, frecvențele genotipice observate și cele teoretic așteptate deviază de la echilibrul Hardy-Weinberg pentru grupul control și cel de cercetare ($\chi^2 = 22.81$, $p = 0.000$ și respectiv $\chi^2 = 28.31$, $p = 0.000$).
 3. Nu a fost stabilită asocierea polimorfismelor genelor *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* cu pierderile reproductive ($\chi^2 < 5$, $p > 0.05$), dar riscul este mai mare pentru femei purtătoare a genotipului *MTR AG*, OR=1.38, 95%CI [0.81-2.34], precum și a genotipului *MTRR 66AA* (OR=1.19, 95%CI [0.21-6.59]), însă rezultatele nu sunt statistic semnificative.
1. bibliografie Frosst P., Blom H., Milos R., Goyette P., Sheppard C., Matthews R. *et al.* 1995 A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.* 10, 111–113
 2. Hiroyuki Morita, Hiroki Kurihara, Takao Sugiyama, Chikuma Hamada, Yukiko Kurihara, Takayuki Shindo, Yoshio Oh-hashii and Yoshio Yazaki Arterioscler, *Polymorphism of the Methionine Synthase Gene: Association With Homocysteine Metabolism and Late-Onset Vascular Diseases in the Japanese Population.*

Thromb. Vasc. Biol., 1999; 19:298-302.

3. Ivy Altomare, Alan Adler, and Louis M Aledort. The 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and risk of fetal loss: a case series and review of the literature. In *Thromb. J.* 2007; 5:17.
4. Leclerc D., Campeau E., Goyette P., Adjalla C., Christensen B., Ross M. *et al.* 1996 Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1867–1874
5. Marchal C., Redondo M., Reyes-Engel A., Perea-Milla E., Gaitan M., Machuca J. *et al.* 2008 Association between polymorphisms of folate-metabolizing enzymes and risk of prostate cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* 34, 805–810.
6. R.A. Popp, A.P. Trifa, Mariela Militaru, Tania Octavia Crisan, Felicia Petrisor, M.F. Farcas, F.A. Csernik, I.V. POOP, Methionine synthase reductase (*MTRR*) gene 66G>A polymorphism as a possible risk factor for recurrent spontaneous abortion, *Annals of RSCB*, Vol. XIV, Issue 1.
7. Radu Anghel Popp, Aspecte genetice în cazul cuplurilor cu eșecuri reproductive, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, teză de doctorat.
8. Sharma P., Senthilkumar R.D., Brahmachari V., Sundaramoorthy E., Mahajan A., Sharma A. And Sengupta S., Mining literature for a comprehensive pathway analysis: A case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies, *Lipids in Health and Disease*, 5, 1, 2006.
9. Victoria Sacară, Vitalie Scurtu, Maria Duca, Stanislav Groppa, *Analiza asociativă a genelor ciclurilor folat, metioninic și genei sintezei endoteliale NO la bolnavii de Miodiostrofie Duchenne și la populația sănătoasă din Republica Moldova.*
10. Weisberg I., Jacques P., Selhub J., Bostom A., Chen Z., Curtiss Ellison R. *et al.* 2001 The 1298A→C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 156, 409–415.
11. Willianne L.D.M. Nelen and Henk J. Blom. Pregnancy Complications. In *MTHFR Polymorphisms and Disease*. Edited by: Per Magne Ueland, 2005.