

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

**Determinación del polimorfismo (C677T) de la MTHFR en
pacientes con cáncer de colon metastásico y su efecto en el
tratamiento con 5-fluorouracilo y ácido folínico**

TESIS DE POSTGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN

ONCOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA

DR. OMAR ORLANDO CASTILLO FERNÁNDEZ

TUTOR

DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO

MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

AUTORIZACIONES

DR. EDUARDO CERVERA CEBALLOS
SUBDIRECTOR DE EDUCACIÓN MÉDICA

DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
TUTOR

OMAR ORLANDO CASTILLO FERNÁNDEZ
RESIDENTE DE 3er. AÑO ONCOLOGÍA MÉDICA

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Tratamiento del cáncer de colon: el uso de fluoropirimidinas.....	7
1.2 Modo de acción del 5FU.....	8
1.3 Polimorfismo C677T de la MTHFR	9
1.3.1 Polimorfismo C677T y actividad de la MTHFR.....	10
1.4 Asociación del polimorfismo C677T con enfermedades malignas	13
1.5 El polimorfismo C677T y la respuesta al tratamiento con fluoropirimidinas.....	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	15
4. HIPÓTESIS.....	15
5. OBJETIVO GENERAL.....	16
5.1 Objetivos secundarios.....	16
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
6.1 Diseño.....	16
6.2 Población.....	16
6.2.1 Criterios de inclusión.....	17
6.2.2 Criterios de exclusión.....	17
6.2.3 Criterios de eliminación.....	17
6.3 Variables.....	17
6.3.1 Independiente.....	17
6.3.2 Dependiente.....	17
6.4 Detección del polimorfismo.....	18

6.4.1 Muestras de tejido en parafina.....	18
6.4.2 Aislamiento del DNA de las muestras de parafina.....	18
6.4.3 Amplificación de la enzima MTHFR.....	19
6.4.4 Digestión con la enzima de restricción Hinf. I.....	19
6.5 Estadística.....	19
7.RESULTADOS.....	21
8. DISCUSIÓN.....	27
9. CONCLUSIONES.....	31
9. REFERENCIAS.....	32

PALABRAS CLAVES: Polimorfismo, metilentetrahidrofolato reductasa, 5-Fluorouracilo, ácido folínico, cáncer de colon metastático, tiempo para la progresión.

RESUMEN

La quimioterapia basada en fluoropirimidinas es la más empleada en pacientes con cáncer de colon, principalmente la combinación de 5 fluorouracilo (5FU) y ácido folínico (AF). A pesar de que existen otras alternativas terapéuticas, un 57% de los pacientes que son atendidos en nuestro medio no las pueden pagar, y en ellos el régimen empleado es el de 5FU/AF. En la actualidad carecemos de marcadores biológicos que predigan la respuesta a 5FU/AF y nos permitan tener una base para la selección del tratamiento. La enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) juega un papel importante en el metabolismo del folato. El sustrato de dicha enzima es requerido para la formación de un complejo terciario con el 5FU y la timidilato sintetasa que inhibirá la síntesis de timina. Una mutación en la MTHFR ha sido identificada como uno de los polimorfismos más comunes en la población mexicana (cambio de citosina por timina en la posición 677 del gen). Esta variante se ha correlacionado con una disminución de la actividad de la enzima e incremento en las concentraciones de su sustrato, lo que potenciaría el efecto del 5FU. El objetivo del estudio fue evaluar la presencia del polimorfismo C677T de la MTHFR y su relación con la sobrevida libre de progresión en pacientes con cáncer de colon metastásico tratados con 5FU y AF. Se estudiaron 29 pacientes con cáncer de colon metastásico tratados con 5FU/AF en el Instituto Nacional de Cancerología, utilizándose bloques de parafina que incluyeran mucosa sana para extraer el DNA y determinar el polimorfismo C677T mediante PCR y una digestión alelo específica. Se encontró una proporción de 27% de homócigos CC, 52% de heterócigos CT y 21% de homócigos TT. No hubo diferencias con respecto al sexo, estado funcional, grado de diferenciación del tumor sitio y número de metástasis entre los tres grupos. La mediana de progresión para los grupos fue CC 3.43 meses, CT 4.77 meses y TT 4.80 meses ($p= 0.047$ log rank). Al comparar los grupos no polimórficos

(CC) con los polimórficos (CT y TT) observamos un mayor tiempo para la progresión: 4.80 meses contra 3.43 meses en el grupo polimórfico ($p = 0.031$ log rank). Nuestros hallazgos son los primeros en sugerir un papel del polimorfismo C577T de la MTHFR como un marcador predictivo de sobrevida libre de progresión en el tratamiento con 5FU/AF en pacientes con cáncer de colon metastásico

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En vista de que en nuestra institución un porcentaje importante de pacientes son tratados con 5FU y AF por razones económicas, cobra vital importancia poder valorar la presencia del polimorfismo C677T de la MTHFR y su efecto en el tratamiento del cáncer de colon metastásico de manera que podamos seleccionar los pacientes que tendrán mayor beneficio con este tratamiento

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tratamiento del cáncer de colon: el uso de fluoropirimidinas

El cáncer de colon es la tercera causa de muerte por cáncer alrededor del mundo. En el 2005 aproximadamente 105,000 casos fueron diagnosticados en los Estados Unidos [1]. El número de casos anuales de esta patología en México es de 3,157 y representa la sexta causa de muerte por cáncer en los hombres y la séptima en mujeres [2]. Con respecto a su forma de presentación, un 30% de los pacientes tendrá enfermedad metastásica al momento del diagnóstico [3]. En estos pacientes con enfermedad avanzada, la terapia con 5-fluorouracilo (5FU) y ácido folínico (AF) ha sido la piedra fundamental del tratamiento hasta fechas recientes.

El manejo actual de pacientes con enfermedad metastásica y/o recurrente incluye el uso de varias drogas activas, ya sea como agentes únicos o más comúnmente en combinaciones dentro de las cuales se incluyen 5FU/AF, Irinotecán, Oxaliplatino, Capecitabina, Bevacizumab y Cetuximab [4-8]. La sobrevida libre de progresión ha mejorado de 4 meses con 5FU/AF hasta cerca de 8 meses con la combinación de 5FU/AF/Oxaliplatino (FOLFOX) o con 5FU/AF/Irinotecán (FOLFIRI) con una sobrevida global de 20 meses con agentes de quimioterapia y hasta de 25 meses añadiendo terapia biológica [4,9].

La incorporación de nuevas drogas además aportar un beneficio clínico ha traído como consecuencia un aumento dramático en el costo del tratamiento, siendo esto motivo de recientes investigaciones y debates [10-12]. Considerando sólo los costos de la terapia actual usada de manera secuencial, tres líneas hasta progresión, el costo se estima entre 44,000 y 160,000 dólares al año de tratamiento en los Estados Unidos [10]. El impacto

económico de la terapia en México no ha sido determinado, sin embargo, en el Instituto Nacional de Cancerología la mayoría de los pacientes no pueden pagar los esquemas que incluyen al menos una de las nuevas drogas. En el año 2004 sólo un 43% de todos los pacientes con cáncer de colon recibieron uno de estos agentes en algún momento del tratamiento. De manera que una proporción importante de nuestros pacientes reciben 5FU/AF como tratamiento de primera línea por razones económicas.

Las respuestas que se obtienen con la combinación de 5FU/AF son de aproximadamente 25% [13], lo que significa que la mayoría de los pacientes sometidos a este esquema no presentarán disminución en el volumen de su enfermedad medible y probablemente sólo experimentarán algún grado de toxicidad, sin poder, hasta el momento, identificar *a priori* a los pacientes que presentarán un beneficio con dicho tratamiento.

En la actualidad carecemos de marcadores biológicos confiables que predigan la respuesta al tratamiento basado en fluoropirimidinas y nos permitan tener una base racional para la selección del mismo, esto es extensivo incluso en pacientes que reciben esquemas con nuevas drogas combinadas con 5FU/AF (FOLFOX y/o FOLFIRI).

1.2 Modo de acción del 5FU

El 5FU sufre una conversión a fluorodesoxiuridina-monofosfato, la cual inhibe a la enzima timidilato sintetasa previniendo la formación de timidilato (timidina-5-monofosfato) un precursor esencial de timidina-5-trifosfato [14], el cual se requiere para la síntesis y reparación del DNA en las células tumorales. La presencia de fluorodesoxiuridina-monofosfato induce la formación de un complejo terciario entre la timidilato sintetasa, la fluorodesoxiuridina-monofosfato y el 5-10

metilentetrahidrofolato (5-10-MTHF), donador de grupos metilo, potenciando aún más la inhibición de esta vía metabólica [15]. Estudios experimentales han establecido que este fenómeno inhibitorio es óptimo en concentraciones elevadas de AF un precursor del 5-10-MTHF [16]. El 5-10 MTHF en exceso puede inducir una mayor concentración en la formación del complejo terciario en presencia de 5 FU lo que potenciaría la inhibición de la síntesis de bases necesarias para conformar la estructura del DNA en las células tumorales [14].

En el metabolismo de los folatos, el AF es convertido a 5-10-MTHF, el cual es subsecuentemente transformado en metilentetrahidrofolato y posteriormente reducido a 5-metiltetrahidrofolato (5-metilTHF) por la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) [17]. Este último producto es un sustrato para la conversión de homocisteína a metionina, la precursora de S-adenosilmetionina (SAM), la cual es el donador de grupos metilo más importante en todos los seres vivos y elemento esencial en el proceso de metilación del DNA [18]. Como puede apreciarse la enzima MTHFR juega un papel importante en la activación adecuada del 5FU, y su actividad puede verse afectada de 3 maneras: 1) por la presencia de polimorfismos en la secuencia del gen que afecten la interacción con su cofactor o con su sustrato; 2) por la presencia de una concentración alta de metionina o de SAM, que funcionan como inhibidores de la enzima; o 3) por una baja concentración de su cofactor, flavin-adenin-dinucleótido (FAD) [19].

1.3 Polimorfismo C677T de la MTHFR

El gen de la MTHFR está localizado en el cromosoma 1p36 [20]. Después de la clonación de la MTHFR humana se han descrito alrededor de 18 mutaciones de las

cuales 14 son muy raras, y una de ellas ha sido relacionada con una serie de trastornos metabólicos y citológicos [21]. Esta mutación es el polimorfismo C677T, el cual se localiza en el exón 4 del gen, y consiste en la sustitución de una citosina por una timina en la posición 677, promoviendo la sustitución de alanina por valina en el codón 222 de la proteína [22]. La distribución del polimorfismo C677T del gen de la MTHFR es muy heterogénea a nivel mundial (Cuadros 1-3). La frecuencia más elevada del alelo T ha sido reportada en México, y la más baja en Sudáfrica [23, 24].

Cuadro 1. Frecuencias de los genotipos MTHFR en diferentes poblaciones [25]

País	GENOTIPO (%)		
	CC	CT	TT
Holanda	53	42	5
Irlanda	50.5	43.4	6.1
Estados Unidos	62.4	33	4.6
Italia	34.9	50	15.1
Japón	35	46.3	18.6
México	17.6	47.6	34.8

1.3.1 Polimorfismo C677T y actividad de la MTHFR

El polimorfismo C677T se encuentra en el sitio de unión de la MTHFR con su cofactor FAD y puede detectarse funcionalmente debido a que está asociado con una reducción en la actividad enzimática durante la incubación de los extractos proteicos a 45°C donde la mutación, que es de carácter recesivo, promueve que las células de los individuos homocigos posean una actividad enzimática específica reducida, así como la pérdida de su estabilidad al ser sometida a las condiciones antes mencionadas. Es por ello, que se le

ha designado como “MTHFR termolábil” [28]. El polimorfismo C677T en el gen de la MTHFR reduce la actividad enzimática favoreciendo así un incremento en la disponibilidad de 5-10-MTHF para la síntesis y reparación del DNA acompañado de un decremento en la disponibilidad de 5-metilTHF para su metilación [28]. Esta situación favorece la síntesis de timidilatos sobre la metilación de las citosinas, minimiza la incorporación de uracilo al DNA y por lo tanto los rompimientos cromosómicos resultantes, así como favorece el incremento en las concentraciones de homocisteína [29].

Cuadro 2. Frecuencias del alelo mutante en diferentes poblaciones [25,26]

País	Alelo 677T (%)
Oeste de África	9
Francia	36.1
Italia	47.3
México	58
Holanda	26
Irlanda	28
Estados Unidos	21
Japón	42

La MTHFR mutante presenta expuestos los residuos aminoácidos a los cuales se asocia el FAD, a diferencia de la enzima no mutada donde estos residuos se encuentran embebidos en la estructura en forma de barril de la enzima. La exposición de dichos residuos promueve que se debilite el complejo enzima-cofactor [30]. Recientemente se demostró, en estudios realizados sobre la función de la MTHFR humana, que en el

momento en el cual FAD se disocia de la enzima se da una conversión rápida del dímero en monómeros, lo que acarrea una menor estabilidad. La pérdida de afinidad de la MTHFR por su cofactor resulta en la pérdida de la actividad enzimática [31]. Se ha propuesto que la enzima sufre una serie de cambios conformacionales que se propagan a lo largo de toda su estructura, que surgen con la finalidad de compensar la presencia de la cadena lateral de mayor tamaño de la valina, y que estos cambios son los responsables de alterar la interacción de la MTHFR con FAD en una manera más sutil [32]. Se han comparado las propiedades de la MTHFR con la sustitución Ala222Val con la de la enzima silvestre y se observó que esta mutación reduce la afinidad de la enzima por su cofactor, no obstante no se encontraron diferencias en la cinética de reducción del 5,10-MTHF a 5-metilTHF, es decir la K_M y la V_{max} entre los genotipos no presentan diferencias significativas [33].

Cuadro 3. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo C677T MTHFR en diferentes poblaciones mexicanas [27]

Población	Frecuencia genotípica (%)			Frecuencia alélica (%)	
	CC	CT	TT	C	T
Huichol	16	56	28	44	56
Tarahumara	45	39	16	64	36
Purépecha	19	48	33	43	57
Mestizo	31	50	19	56	44
Europea	45	40	15	65	35

De tal manera que los individuos con un genotipo homocigoto para la mutación (TT) poseen un 30% de la actividad enzimática con respecto a los individuos silvestres (CC),

mientras que los individuos heterocigos poseen un 60% de la actividad a 46 °C [34,35]. A temperatura fisiológica los individuos TT poseen un 40-50% de la actividad específica encontrada en el genotipo silvestre, mientras que los heterocigos poseen una actividad intermedia entre ambos homocigos. [36]

1.4 Asociación del polimorfismo C677T con enfermedades malignas

El polimorfismo C677T en el gen de la enzima MTHFR modula, de manera diferencial, el riesgo a presentar diversas enfermedades en los seres humanos. El polimorfismo C677T ha sido propuesto como un factor de riesgo para el desarrollo de diversas enfermedades incluidas algunas cardiovasculares, trombosis, preeclampsia, neuropatía, defectos del tubo neural, síndrome de Down, así como desordenes psiquiátricos tales como depresión y esquizofrenia [37-42]. Con respecto al cáncer, el polimorfismo C677T parece incrementar el riesgo de desarrollar cáncer de mama, endometrio, pulmón, esófago, estómago [43-47]. En contraste este polimorfismo parece reducir, bajo condiciones adecuadas de ácido fólico, el riesgo a desarrollar cáncer colorrectal, prostático, leucemia linfocítica aguda, algunas leucemias en niños y adultos y linfomas [48-51]. Si las concentraciones de ácido fólico son inadecuadas, el efecto protector del polimorfismo se pierde. Una posible explicación de este fenómeno es que la presencia del polimorfismo C677T promueve un efecto positivo en la síntesis de nucleótidos por medio del incremento en los niveles de 5-10-MTHFR, lo cual se ve reflejado en una síntesis correcta de DNA y por lo tanto una división celular normal. Sin embargo, a bajas concentraciones de folatos, el polimorfismo C667T origina que tanto la metilación, así como la síntesis y reparación del DNA se vean comprometidas, incrementando la inestabilidad cromosómica y por lo tanto el riesgo de la transformación maligna [52,53]. De la misma manera, se ha propuesto que la capacidad

del polimorfismo C677T de promover de manera diferencial el riesgo a desarrollar diferentes tipos de cáncer se debe a que en algunos casos, la prevención que brinda el polimorfismo reduciendo los rompimientos cromosómicos puede ser el mecanismo más relevante para disminuir el riesgo. Sin embargo, en otros casos la prevención de la hipometilación del DNA asociada con pérdidas cromosómicas, es necesaria para reducir el riesgo, principalmente en aquellas causadas por la integración y expresión de DNA parasítico, o causado por aneuploidías [54]. Otra teoría propone que en los cánceres APRA, en los cuales la MTHFR promueve un incremento de riesgo, el decremento en los niveles de metilación del DNA activan oncogenes, y éste es su principal mecanismo de carcinogénesis, sin embargo, en aquellos en los que brinda protección, se debe a que esta hipometilación protege contra la hipermetilación de genes supresores de tumores [55]. Finalmente se ha propuesto que este efecto brindado por la MTHFR se debe a un requerimiento diferencial de folato entre los tejidos, y por lo tanto una diferente susceptibilidad a la deficiencia de éste [56].

1.5 El polimorfismo C677T y la respuesta al tratamiento con fluoropirimidinas

Existen pocos estudios que han valorado el efecto clínico del polimorfismo en pacientes con cáncer de colon tratados con fluoropirimidinas, obteniendo resultados variables, Cohen y colaboradores [57] estudiando la frecuencia alélica del gen mutado en 43 pacientes con cáncer de colon metastásico, encontraron que la presencia de por lo menos un alelo mutado (T) se asoció con una respuesta estadísticamente significativa en el 77% versus 55% en portadores de alelos normales. Jakobsen [58] reportó respuestas globales del 67% en pacientes tratados con 5FU y AF con los dos alelos mutados (TT).

Otros investigadores han estudiado este polimorfismo y su efecto en la supervivencia global de los pacientes con cáncer de colon avanzado sin encontrar diferencias estadísticamente significativas [59]. Hasta el momento ningún estudio ha valorado el efecto de este polimorfismo sobre el tiempo para la progresión, motivo principal de la realización de nuestro estudio.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la presencia del polimorfismo C677T del gen de la MTHFR se asocia con un mayor tiempo para la progresión en pacientes con cáncer de colon metastático tratados con 5FU y AF.

Objetivos secundarios

- a) Valorar la distribución del polimorfismo C677T en los pacientes analizados;
- b) Describir en la población estudiada el género, edad, sitio, número de metástasis, estado funcional, tipo histológico, presencia de componente mucinoso, grado de diferenciación y resección del tumor primario;
- c) Relacionar las variables género, edad, sitio, número de metástasis, estado funcional, tipo histológico, presencia de componente mucinoso, grado de diferenciación y resección del tumor primario con el polimorfismo C677T.

HIPÓTESIS

La presencia de por lo menos un alelo mutado en la posición 677 del gen de la MTHFR se asocia con una diferencia de por lo menos dos meses en el tiempo para la progresión en los pacientes con cáncer de colon metastático tratados con 5FU y AF.

JUSTIFICACIÓN

En vista de que en nuestra institución un porcentaje importante de pacientes son tratados con 5FU y AF por razones económicas, cobra vital importancia poder valorar la presencia del polimorfismo C677T de la MTHFR y su efecto en el tratamiento del cáncer de colon metastático de manera que podamos seleccionar los pacientes que tendrán mayor beneficio con este tratamiento.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Influirá el polimorfismo C677T del gen de la MTHFR en el tiempo para la progresión en pacientes con cáncer de colon metastásico tratados con 5FUy AF?

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño

Para contestar la pregunta de investigación se realizó un estudio de tipo observacional analítico de carácter retrospectivo.

Población

Nuestra población de estudio estuvo constituida por todos los pacientes con cáncer de colon metastásico que fueron tratados dentro del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) con quimioterapia con 5FU/AF como primera línea, desde el 1 enero de 1998 hasta el 31 de diciembre del 2004

Criterios de inclusión

- a) Pacientes con cáncer de colon metastásico que hayan recibido tratamiento con 5FU/AF de primera línea por lo menos durante dos ciclos.
- b) Pacientes que tengan bloques de parafina disponible para la valoración del polimorfismo.

Criterios de exclusión

Pacientes con segundas neoplasias

Criterios de eliminación

Pacientes con muestra de DNA insuficiente o en estado no apto para la determinación del polimorfismo

Variables

Independiente

Polimorfismo: en base a su genotipo analizado en muestras de mucosa colónica normal los pacientes se agruparon en homocigos normales (CC), homocigos mutantes (TT) o heterocigos (CT). Operacionalmente consideramos a los pacientes homocigos normales como no polimórficos y a los pacientes portadores de por lo menos un alelo mutado (CT, TT) como polimórficos.

Dependiente

Tiempo para la progresión: período (meses) comprendido entre el inicio del tratamiento y la documentación de progresión de la enfermedad, ya sea por criterios clínicos, de laboratorio o de imagen.

Detección del polimorfismo

Muestras de tejido en parafina

Una vez obtenidos los datos del expediente, se solicitaron al Departamento de Patología del INCAN las muestras de mucosa de colon embebidas en parafina de los pacientes que cumplían con los criterios de inclusión. El tamaño de las muestras fue de 20 µm, se solicitaron al menos cinco cortes por cada paciente.

Aislamiento del DNA de las muestras de parafina

Se realizó la extracción de DNA a partir de las muestras de parafina mediante el siguiente protocolo. Se colocaron 100 µm de tejido embebido en parafina en un microtubo de 1.5 mL, se agregó 1 mL de octano para disolver la parafina y se agitó el tubo en el vortex. Posteriormente se calentó a 50°C durante 10 minutos en un termoblock, se centrifugó a 13000 rpm a una temperatura de 40°C y se eliminó el sobrenadante, repitiendo estos pasos dos veces. Posteriormente se agregó etanol al

100% al tejido que quedó en el microtubo agitándolo manualmente. Se centrifugó a 12000 rpm a 25°C y se repitió este paso dos veces. Se retiró el sobrenadante y se eliminó. Al residuo que quedó en el fondo del microtubo se le agregó etanol al 70% y se centrifugó durante 3 minutos a 12000 rpm a una temperatura de 25°C, se repitió este último paso y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se secó a 50°C durante 5 minutos. Una vez evaporado el etanol, se agregaron a la pastilla 300 µl de buffer de lisis (50mM de Tris HCL pH 8.5, 1mM de EDTA, Tween 20 0.5% y 200 µg/mL de proteinasa K) a 55°C durante 3 horas. Transcurridas las tres horas de incubación con el buffer de lisis, se inactivó la proteinasa K calentando a 90°C durante 10 minutos. Se centrifugó a 12,000 rpm 10 minutos, y se recuperó el sobrenadante que contenía el DNA. Una vez extraído el DNA se cuantificó mediante un espectrofotómetro, valorando la relación proteínas-DNA que se encontraba en la solución.

Amplificación de la enzima MTHFR

La mezcla para la amplificación de la enzima constó de los siguientes reactivos: buffer sin Mg para PCR (10x) 1 µl, dNTP mezcla (10 mM) 0.2 microlitros, MgCl₂ (50 mM) 0.3 µl, mezcla cebadores 0.4 µl, Taq DNA polimerasa 0.1 µl, templado DNA 2 µl, agua para PCR 6 µl. Para un total de 10 µl por muestra. Se colocó la muestra en el termociclador con las siguientes condiciones: un ciclo de dos minutos a 94°C, 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 62°C y 72°C respectivamente, y finalmente un ciclo de 7 minutos a 72°C. Se verificó la amplificación de la enzima, mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%. Con un marcador de peso molecular de 100 pares de bases.

Digestión con la enzima de restricción Hinf. I

Se agregó al producto de la amplificación la enzima Hinf I, agua y buffer React 2, se dejó digerir durante 3 horas. Las cantidades se citan a continuación: Buffer 10 x React 2: 0.8 µl, Hinf I 0.2 µl, agua 4 µl, muestra de amplificación 3 µl, para un volumen total de 8 µl por muestra. La sustitución de T por C de la forma mutante crea un sitio de restricción para la enzima Hinf I, por lo que el producto de 198pb se divide en un fragmento de 175pb y otro de 23pb. El producto digerido se colocó en electroforesis en geles de agarosa al 3%.

Estadística

Para el cálculo de la muestra utilizamos la fórmula de diferencia de media con valores de $\alpha/2$: 0.025, β : 80%, $Z_{\alpha/2}$: 1.96 Z_{β} : 0.84, para detectar una diferencia de 2 meses en el tiempo para la progresión entre los grupos polimórficos y no polimórficos, la elección de dos meses se realizó por conveniencia. Tomamos un valor de 51 días como desviación estándar mediante un análisis preliminar al completar los primeros 20 pacientes.

$$n: \frac{2s^2 (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2}{d^2}$$

Obteniendo un total de 12 pacientes en cada grupo.

Las variables continuas se expresaron como mediana \pm error estándar, las variables cualitativas como proporciones. Las comparaciones para las variables cualitativas se realizaron mediante prueba exacta de Fisher y para las variables continuas usamos el

método de U de Mann-Whitney. La sobrevida se valoró por curvas de Kaplan Meier y analizadas por log rank, considerando estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Se revisaron 415 expedientes de pacientes con diagnóstico de cáncer de colon atendidos en el INCAN en el período comprendido entre el 1 de enero de 1998 al 31 de diciembre del 2004, de los cuales 45 cumplieron con los criterios de inclusión. Se excluyeron 11 pacientes por las siguientes razones: tres pacientes sin material histológico disponible, dos sin mucosa normal, y en seis no amplificó su DNA.

Se determinó el polimorfismo en 34 pacientes (12 hombres y 22 mujeres), 8 casos (24%) homocigos normales (CC), 9 (26%) homocigos mutantes (TT) y 17 (50%) heterocigos (CT). Se excluyeron del análisis final 5 pacientes (2 homocigos mutantes TT y 3 heterocigos CT) debido a que se les realizó resección quirúrgica de toda la enfermedad metastásica.

El análisis final de los casos se llevó a cabo en 29 pacientes, 11 hombres y 18 mujeres. Con una distribución del polimorfismo de la siguiente manera: 8 homocigos normales CC (27%), 15 heterocigos CT (52%) y 6 homocigos mutantes TT (21%). Figura 1

Los pacientes se dividieron en dos grupos, los polimórficos (homocigos mutantes y heterocigos) y los no polimórficos (homocigos normales) resultando 21 y 8 individuos respectivamente (Cuadro 4).

La mediana de edad de ambos grupos fue de 53.2 ± 11.7 años para los no polimórficos y de 56.9 ± 10.4 años para los polimórficos ($p=0.32$). Todos los pacientes presentaron un estado funcional ente 0 y 1, la resección del tumor primario se realizó con igual proporción en ambos grupos.

Cuadro 4. Características generales de los pacientes

	No polimórficos n= 8	Polimórficos n= 21	p
Edad	53.2 ± 11.7 años	56.9 ± 10.4 años	0.32
Sexo Masculino/Femenino	3/5	8/13	1.0
ECOG 0/ 1	2/6	2/19	0.30
Resección del primario	6	18	1.0
Grado de diferenciación Moderado	5	16	0.64
Pobre	3	5	
Componente mucinoso	3	7	1.0
Número de metástasis Única	0	5	0.28
Múltiple	8	16	
Metástasis hepática	5	8	0.40
Número de ciclos	3.0 ± 1.0	4.6 ± 1.5	0.012**

Con respecto a las características histopatológicas del tumor todos los pacientes presentaron el tipo histológico adenocarcinoma, 63% de los tumores en el grupo no polimórfico se reportó como moderadamente diferenciado y 37% como poco diferenciado. En el grupo polimórfico 76% correspondieron al moderadamente

diferenciado y 24% al poco diferenciado. El componente mucinoso se reportó en 3 pacientes no polimórficos (38%) y en 7 pacientes polimórficos (33%).

El hígado fue el sitio de metástasis en 13 pacientes (45%), 5 pacientes no polimórficos (62%) y en 8 pacientes polimórficos (31%). El segundo sitio de metástasis fue el peritoneo (retroperitoneo y carcinomatosis peritoneal) en el 34% de los casos, 3 pacientes no polimórficos (37%) y 7 pacientes polimórficos (33%). Sólo se reportaron metástasis pulmonares en pacientes polimórficos (3 casos) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Distribución según sitio de metástasis

	No polimórficos n= 8	Polimórficos n= 21	Total
Hepática	5	8	13
Pulmonar	0	3	3
Peritoneal	3	7	10
Otra	0	3	3
Total	8	21	29

Todos los pacientes no polimórficos tenían múltiples metástasis, mientras que en los polimórficos 5 pacientes presentaban un solo sitio de metástasis y en 16 pacientes (76%) se reportaron múltiples metástasis.

La mediana de tiempo para la progresión para todo el grupo fue de 4.63 ± 0.43 meses. Los homocigos normales CC tuvieron una mediana de tiempo para la progresión de 3.43 ± 0.62 meses, los heterocigos CT 4.70 ± 0.26 meses y los homocigos mutantes de 4.87 ± 1.37 (Figura 1). Al agrupar a los pacientes en polimorficos (CT, TT) y no polimorficos (CC), observamos una mediana de tiempo para la progresión de 3.43 ± 0.62 meses y para los polimorficos (CT, TT) de 4.80 ± 0.18 meses, log rank p: 0.031.

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa

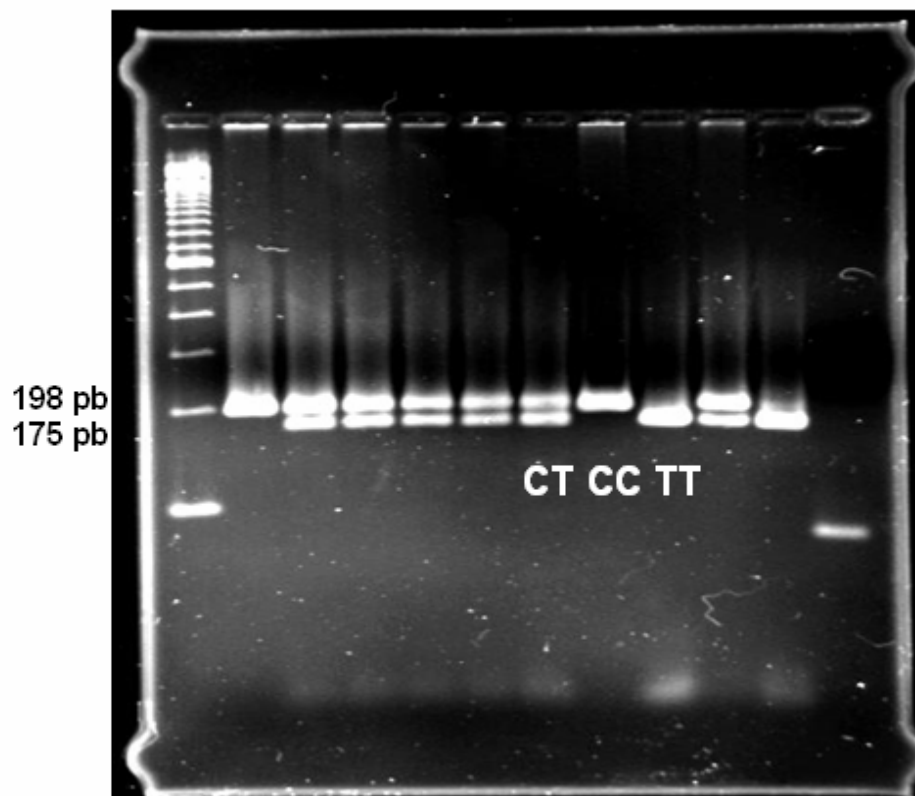
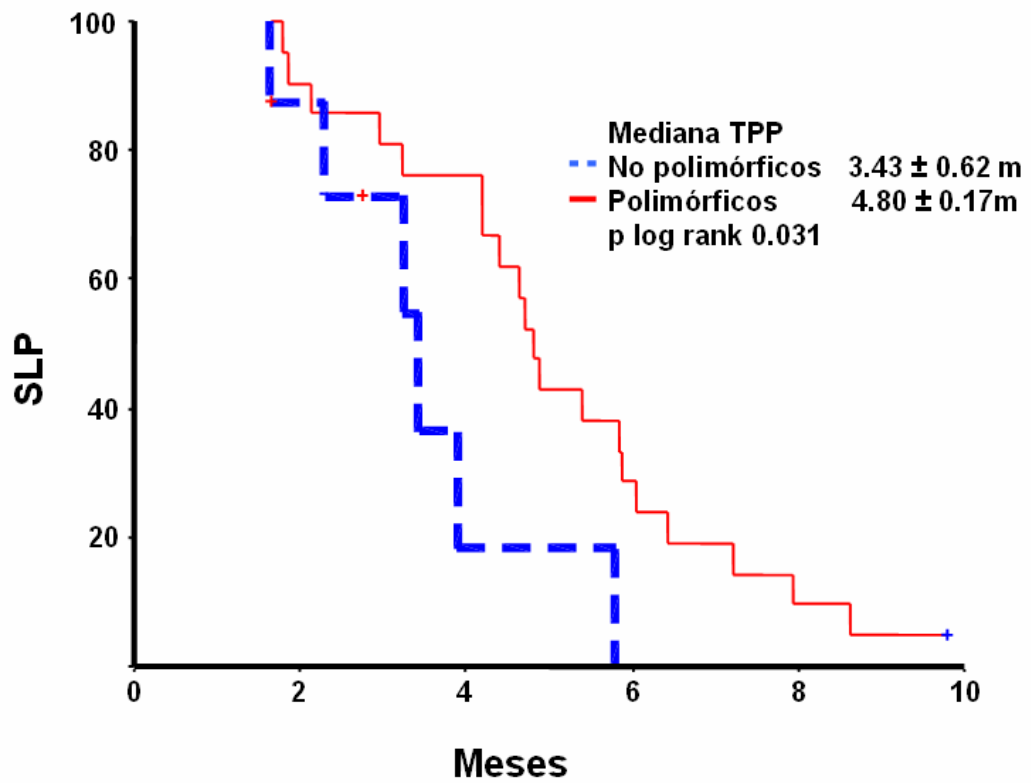


Figura 2. Tiempo para la progresión según grupo

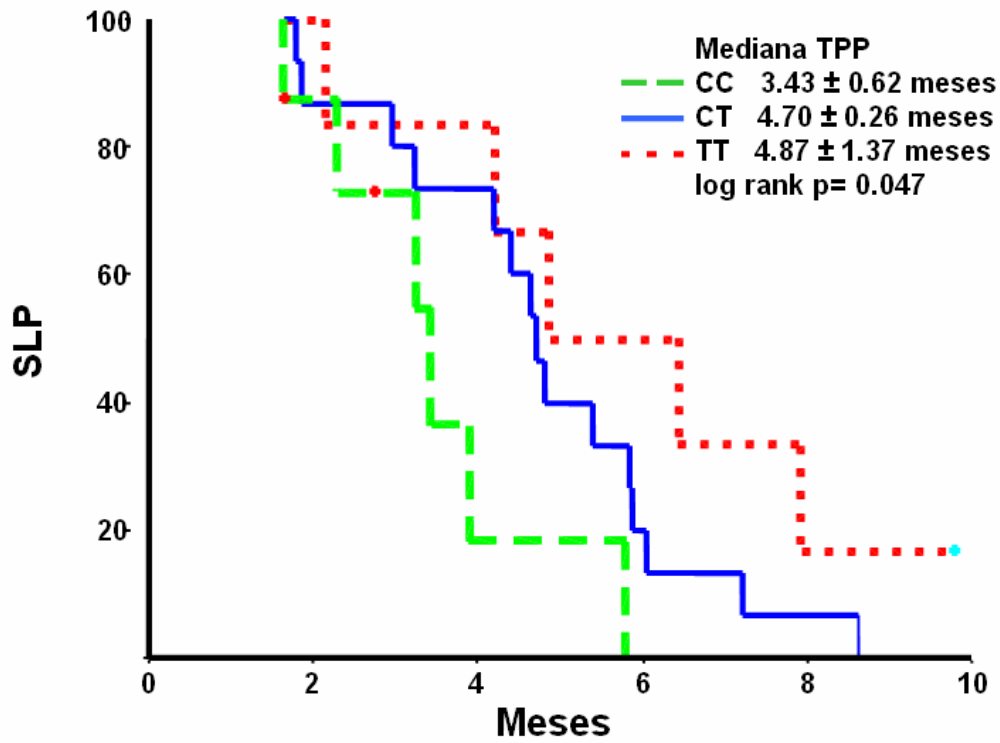


Individuos en riesgo:

	0 meses	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses
Polimórficos	21	19	9	6	2	0
No polimórficos	8	6	1	0	0	0

SLP: Sobrevida Libre de Progresión; TPP: Tiempo para la progresión

Figura 3. Tiempo para la progresión según polimorfismo



Individuos en riesgo

	0 meses	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses
CC	8	6	1	0	0	0
CT	15	13	10	2	1	0
TT	6	6	5	3	1	0

SLP: Sobrevida Libre de Progresión; TPP: Tiempo para la progresión

DISCUSIÓN

El 76% de los pacientes con cáncer de colon estudiados presentaron por lo menos un alelo mutado, esta alta prevalencia de la mutación es similar a la reportada en México

tanto en individuos sin neoplasias como en pacientes con cáncer lo que significa que el hecho de presentar el polimorfismo C677T no representa aparentemente ningún riesgo para el desarrollo de esta neoplasia, lo que concuerda con estudios reportados por otros investigadores [24, 25,60].

El cambio de C por T en el gen de la MTHFR codifica una enzima con una actividad reducida de hasta el 70% en individuos homocigos [28]. La disminución de la actividad enzimática trae como una consecuencia esperable el aumento de las concentraciones de 5-10-MTHF. Kawakami ha reportado mayores concentraciones de este producto en líneas tumorales gastrointestinales portadoras de la mutación comparadas con células malignas no mutantes [61].

El efecto inhibitorio óptimo del 5FU sobre su enzima blanco, la timidilato sintetasa, se produce con concentraciones elevadas de 5-10-MTHF, esto ha sido ampliamente demostrado tanto en estudios *in vitro* como en estudios clínicos. Este hecho ha incentivado el estudio de la mutación de la MTHFR y su efecto en la terapia con fluoropirimidinas, Sohn y cols [62] han reportado una mayor eficacia terapéutica del 5FU en modelos tumorales de colon y mama mutados en comparación con aquellos tumores homocigos silvestres.

Algunos estudios clínicos han valorado el polimorfismo C677T han tenido como punto primario de evaluación la respuesta tumoral. Cohen [57] observó una respuesta de 100% en pacientes homocigos mutantes en 43 pacientes con cáncer de colon metastásico tratados con fluoropirimidinas (38 pacientes con 5FU y AF), sin embargo, el número de pacientes con este polimorfismo fue pequeño (n=5). Recientemente Jakobsen y cols

[58] identificaron el genotipo TT como factor predictivo de respuesta (67%) en 51 pacientes en etapa IV tratados con 5FU y AF, no obstante, no encontró respuesta estadísticamente significativa en pacientes con un alelo mutado. Etienne [63] valoró el polimorfismo C677T y la actividad de la timidilato sintetasa en 98 pacientes con cáncer colorrectal con metástasis hepáticas obteniendo respuestas globales de 40, 21 y 56% en individuos homocigos normales, heterocigos y homocigos mutantes respectivamente ($p= 0.04$). No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la sobrevida entre los grupos. Esta discrepancia entre respuesta y sobrevida con el uso de 5FU y AF es ampliamente conocida en la literatura y reportada en meta-análisis, considerándose la respuesta como un marcador poco fidedigno de la sobrevida [13]. Wisotzkey [59] estudiando 51 pacientes con cáncer de colon en etapa III observó una mediana de sobrevida de 27 meses en individuos heterocigos CT ($n=7$) y de 43 meses en pacientes homocigos mutantes TT ($n = 5$) log rank $p = 0.045$. Este hallazgo aunque limitado por el número de pacientes sugiere que podría existir un subgrupo de pacientes con un beneficio clínico del polimorfismo.

El objetivo de nuestro trabajo fue valorar la sobrevida libre de progresión en los grupos polimórficos y no polimórficos. Encontramos una diferencia de 1.37 meses favoreciendo al grupo polimórfico (log rank $p = 0.037$; Fig. 2). Al valorar los tres grupos según el polimorfismo, el grupo homocigo silvestre presentó el mayor tiempo para la progresión seguido por los heterocigos y el menor tiempo correspondió a los homocigos silvestres (Fig. 3). Existen limitaciones que anotar con respecto a los resultados de nuestro estudio, la más importante tiene que ver con el número de individuos analizados. Debido a la baja prevalencia del genotipo homocigo silvestre CC no completamos el número esperado en este grupo con la consecuente sobre-

representación de los individuos del grupo polimórfico, y aunque esta observación no invalida nuestros resultados si se afecta el poder del estudio.

El mayor tiempo para la progresión en pacientes homócigos mutantes y el menor en los homócigos silvestres puede ser un reflejo del mayor grado de afección enzimática en homócigos mutantes, con la consecuente acumulación intracelular de 5-10-MTHF para ejercer su acción con el 5FU, lo que nos permite suponer que la presencia de por lo menos un alelo mutado muy probablemente tenga un mayor efecto citotóxico que se traduzca en el mayor tiempo de progresión en portadores de la mutación. Además de la actividad enzimática alterada, se han asociado a este polimorfismo la predisposición a la inestabilidad de microsatélites, Shannon [64] encontró casi el doble de inestabilidad microsatelital en muestras de pacientes homócigos mutantes de edad avanzada comparados con pacientes no mutantes, lo que puede reflejar una alteración en el patrón de metilación del DNA, suceso muy frecuente en tumores con inestabilidad microsatelital [65]. La presencia de inestabilidad microsatelital en tumores colónicos se ha asociado con mejor pronóstico [66] y mayor sensibilidad a la terapia adyuvante con fluoropirimidinas [67]. Sin embargo, otros estudios han demostrado resultados opuestos [68]. Es probable que la expresión o no de la estabilidad microsatelital esté influida por factores nutricionales. Allison y cols [69] demostraron una menor proporción de inestabilidad microsatelital en individuos homócigos silvestres con adecuada ingesta de folato, lo que probablemente es reflejo de un mecanismo de síntesis y reparación del DNA más eficiente.

No encontramos impacto de las otras variables en el tiempo para la progresión, excepto el número de ciclos de quimioterapia recibida, lo cual relacionamos con el mayor

tiempo de progresión en el grupo mutado y no a un efecto de los ciclos por si mismos, probablemente debido a que mientras más tiempo tarde en progresar un paciente con enfermedad metastásica la conducta médica es administrar más ciclos de quimioterapia.

Los resultados de este estudio sugieren que es probable que un grupo de pacientes se beneficie del análisis de la mutación del gen de la MTHFR. Se recomienda realizar estudios subsecuentes para identificar las condiciones clínicas óptimas que podrían potenciar el beneficio encontrado además de su papel con nuevas drogas tales como Irinotecán y Oxaliplatino y otras modalidades de tratamiento incluidas la adyuvancia en cáncer de colon y el tratamiento concomitante de quimioterapia con 5 FU/AF y radioterapia.

CONCLUSIONES:

El polimorfismo C766T de la metilentetrahidrofolato reductasa tiene un alta prevalencia en nuestra población estudiada.

Los pacientes polimórficos presentaron el mayor tiempo para la progresión en comparación con los no polimórficos.

Los pacientes con genotipo TT tuvieron el mayor tiempo para la progresión seguido de los pacientes CT y TT respectivamente, lo que indirectamente explica el menor grado de actividad enzimática.

No hubo diferencia entre los grupos polimórficos y no polimórficos con respecto a variables como sexo, edad, estado funcional, resección del tumor primario, grado de diferenciación, presencia de componente mucinoso, número de metástasis, presencia de metástasis.

Sólo el polimorfismo C766T de la metilentetrahidrofolato reductasa se asoció de manera estadísticamente significativa con mejoría en el tiempo para la progresión.

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa

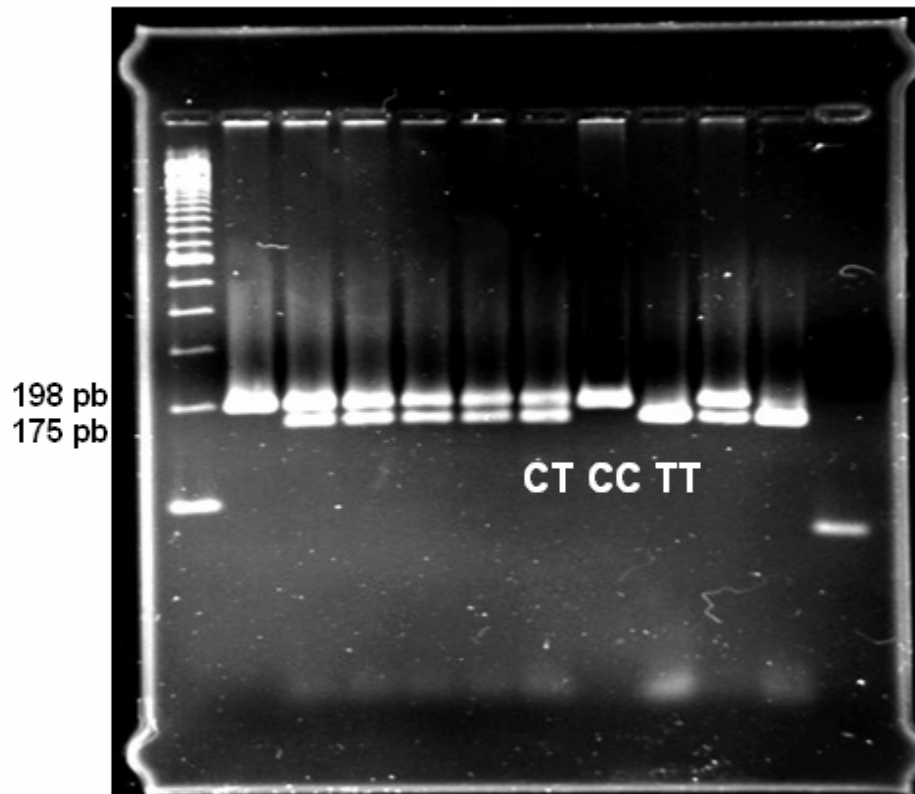
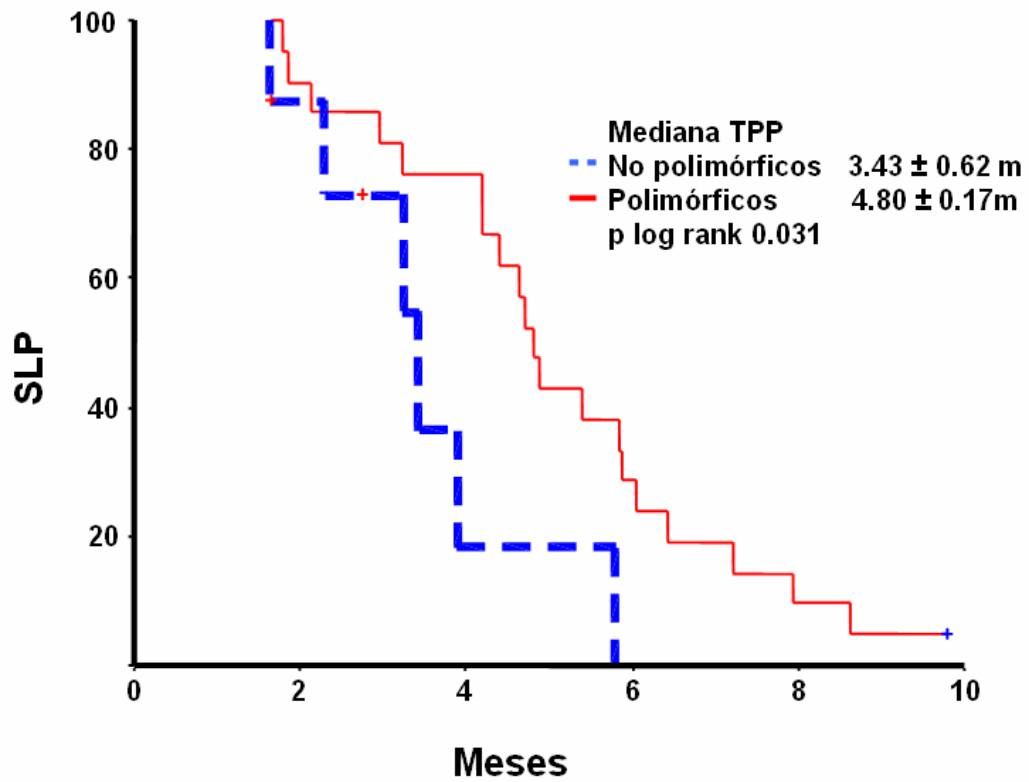


Figura 2. Tiempo para la progresión según grupo

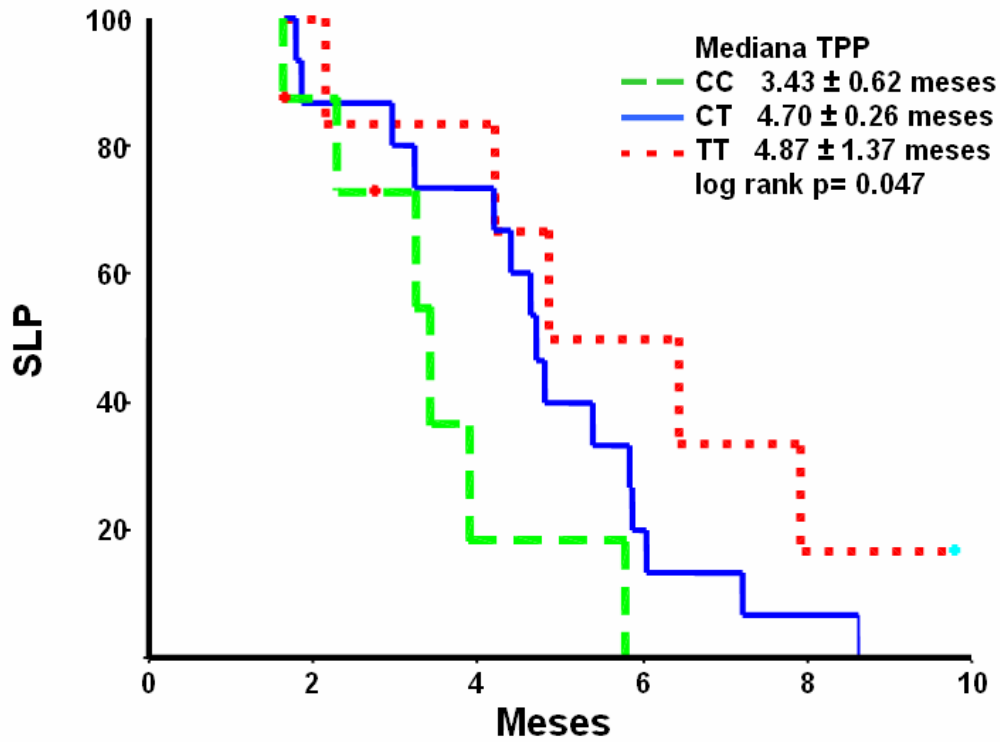


Individuos en riesgo:

	0 meses	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses
Polimórficos	21	19	9	6	2	0
No polimórficos	8	6	1	0	0	0

SLP: Sobrevida Libre de Progresión; TPP: Tiempo para la progresión

Figura 3. Tiempo para la progresión según polimorfismo



Individuos en riesgo

	0 meses	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses
CC	8	6	1	0	0	0
CT	15	13	10	2	1	0
TT	6	6	5	3	1	0

SLP: Sobrevida Libre de Progresión; TPP: Tiempo para la progresión

REFERENCIAS

1. Jemal A, Murria T, Ward E, et al. Cancer statistic, 2005, CA Cancer J Clin 2005; 55: 10-30
2. Registro Histopatológico de Neoplasias en México 2000
3. De Vita, Hellman, Rosenberg. Cancer Principles and Practice of Oncology. 7th edition. Lippincott Williams and Wilkins 2005
4. Nelly H, Goldberg R. Systemic Therapy for Metastatic Colorectal Cancer: Current Options, Current Evidence. J Clin Oncol. 2005; 23(20):4553-4560
5. de Gramont A, Figer A, Seymour M et al. Leucovorin and fluoruracil with or without oxaliplatin as first line treatment in advanced colorectal cancer. J Clin Oncol 2000; 18: 2938-2947
6. Saltz L, Cox J, Blanke C et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 2000; 343:905-914
7. Douillard J, Roth A, Navarro M et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. Lancet 2000; 355: 1041-1047
8. Cassidy J, Taberero J, Twelves C, et al. XELOX: active first line therapy for patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2004; 22(11):2084-2091
9. Kohne C, Folprecht G. Current perspectives in the treatment of metastatic colorectal cancer. Ann Oncol 2004; Suppl 4:iv43-iv53
10. Wong Y, Meropol N, Sargent D et al. Direct cost survival analysis of therapy for metastatic colorectal cancer. Proc Am S Clin Oncol 2006; 24: 149s
11. Ferro S, Cosler L, Wolff D et al. Variation in the cost of treatment for colorectal cancer. Proc Am S Clin Oncol 2006; 24: 176s

12. Sanatani M, Vincent M. Mathematization of risk and benefit for first line treatment of metastatic colorectal cancer : A graphical decision aid for patients and physicians. *Proc Am S Clin Oncol* 2006; 24: 177s
13. The Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. Modulation of Fluoruracil by Leucovorin in Patients with Advanced Colorectal Cancer: Evidence in Terms of Response Rate. *J Clin Oncol* 1992; 10: 986-903
14. Green J. 5-Fluoropyrimidines, in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*. Fourth Edition 2006 Lippincott Williams and Wilkins
15. Kuhn J. Fluorouracil and the new oral fluorinated pyrimidines. *Annals of Pharmacotherapy* 2001; 35: 217-227
16. Cheradame S, Etienne M, Chazal M, Guillot T, Fischel J, Formento P, Milano G. Relevance of tumoral folypolyglutamate synthetase and reduced folates for optimal 5-fluorouracil efficacy: experimental data. *Eur J Cancer* 1997; 33: 950-959
17. Rosenblatt D. Methylenetetrahydrofolate reductase. *Clin Invest Med* 2001; 24(1):56-59
18. Scott J, Weir D. Folate/vitamin B12 inter-relationships. *Essays Biochem* 1994; 28:63-72
19. Friso S, Choi S, Girelli D, Mason J, Dolnikowsky G, Bagley P, et al. A common mutation in the 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2002; 99: 5606-5611
20. Goyette P, Pai A, et al, (1998) Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), *Mamm. Genome* 9:652-56

21. Fodinger M, Hori WH, et al. Molecular Biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, *J. of Nephrology* 2000; 13: 20-33
22. Homberger A, Linnebank M et al. Genomic Structure and Transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene, *Eur J of Human Genetics* 2000; 8: 725-729
23. Loktionov A, Vorster H, O'Neill K, et al. Apolipoprotein E and methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism in relation to other risk factor for cardiovascular disease in UK Caucasians and Black South Africans. *Atherosclerosis* 1999; 145: 125-135
24. Delgado I, Martínez S, Rojas A, Ortiz R, Bósquez F, Calderón A, Zarate M, Barrera H. Mutación 677T del gen MTHFR en adenomas y cáncer colorrectal en una muestra de la población del noreste de México. Resultados preliminares 2001 *Rev Gastroenterol Mex* 2001; 66: 32-37
25. Mutchinick O, López M, Luna L, Waxman J, Babinsky V. High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: A country with a very high prevalence of neural tube defects. *Mol Genet Metab* 1999; 68: 461-467
26. Franco R, Araujo A, Guerreiro J, et al. Analysis of the 677C→T mutation of the methylentetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost* 1998; 79:119-121
27. Davalos I, Olivares N, Castillo M, et al. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Ann Genet.* 2000; 43: 89-92.
28. Weisberg I, Tran P, Christensen B, et al. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase gene associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64:169-172

29. Matthews RG, Sheppard C, Goulding C . Methylenetetrahydrofolate Reductase and Methionine Synthase: Biochemistry And Molecular Biology. *Eur J Pediatr* 1998; 2: 54-59
30. Homberger A, Linnebank M et al. Genomic Structure and Transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene, *Eur J of Human Genetics* 2000; 8: 725-729
31. Friso S, Choi S. Gene-Nutrient interactions in one carbon metabolism, *Curr Drug Metb* 2005; 6:37-46
32. How folate fights disease, *Nature Struc Biol* 1999; 6(4): 293-294, editorial
33. Yamada Kazuhiro, Chen Z, et. Al. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase, *Nat. Struct. Biol.* 1999; 6:359-365
34. Kimura M, Umegaki K, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. *J Nutr* 2004; 134:48-56
35. Boot L, Yang Q. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: A HuGE review, *Am J Epidemiol* 2000; 151:862-877
36. Rozen R. Genetic Predisposition to hyperhomocysteinemia: Deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Throm Hemaes* 1997; 78(1): 523-526
37. Cho S, Hong S, Shin G, Chung W. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene mutation is associated with hyperhomocysteinemia, cardiovascular disease and plasma B type natriuretic peptide levels in Korea. *Clin Chem lab Med* 2006; 44:1070-7075

38. Barada K, Azar C, Ortack Z. Budd-Chiari syndrome with underlying homozygous factor V Leiden and heterozygous methylenetetrahydrofolate reductase mutations. *J Gastroenterol.* 2005; 40: 1002-1003
39. Dávalos I, Morán M, Martínez Abundis E, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and Factor V Leiden variant in Mexican women with preeclampsia/eclampsia. *Blood Cells Mol Dis.* 2005; 35:66-69.
40. Glueck C, Wang P, Bell H et al. Nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy: associations with homozygosity for the C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *J Lab Clin Med.* 2004; 143: 184-192.
41. Gueant J, Anello G, Bosco P et al. Homocysteine and related genetic polymorphisms in Down's syndrome IQ. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005; 76: 706-709
42. Zintzaras E. C677T and A1298C methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in schizophrenia, bipolar disorder and depression: a meta-analysis of genetic association studies. *Psychiatr Genet.* 2006; 16: 105-115.
43. Zintzaras E. Methylenetetrahydrofolate reductase gene and susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. *Clin Genet.* 2006; 69: 327-36.
44. Esteller M, García A, Martínez Palones J, et al. Germ line polymorphisms in cytochrome-P450 1A1 (C4887 CYP1A1) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes and endometrial cancer susceptibility. *Carcinogenesis.* 1997; 18: 2307-2311.
45. Shi Q, Zhang Z, Li G et al. Sex differences in risk of lung cancer associated with methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14: 1477-1484.

46. Zintzaras E. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms with genetic susceptibility to gastric cancer: a meta-analysis. *Hum Genet.* 2006; 51: 618-624.
47. Wang L, Guo R, Fan Z et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase promoter polymorphisms with genetic susceptibility to esophageal and cardia cancer in a Chinese high-risk population. *Dis Esophagus.* 2005; 18: 177-84
48. Le Marchand L, Wilkens L, Kolonel L, Henderson B. The MTHFR C677T polymorphism and colorectal cancer: the multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14: 1198-1203.
49. Singal R, Ferdinand L, Das P et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and prostate cancer risk. *Int J Oncol.* 2004 Nov; 25: 1465-1471
50. Lightfoot T, Skibola C, Willett E et al. Risk of non-Hodgkin lymphoma associated with polymorphisms in folate-metabolizing genes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14: 2999-3003.
51. Krajcinovic M, Lamothe S, Labuda D, et al. MTHFR genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004; 103: 252-257
52. Kim Y. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism, Folate and Cancer Risk: A paradigm of Gene nutrient interactions In *Carcinogenesis.* *Nutr. Rev* 2000; 58: 205-290
53. Bailey L, Gregory J. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement, *J Nutr* 1999; 129: 919-922

54. Kimura M, Umegaki K, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes, *J Nutr* 2004;134:48-56
55. Paz M, Ávila S, Fraga M et al. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res.* 2002; 62: 4519-24.
56. Sharp L, Little J. Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 2004; 159: 423 –443
57. Cohen V, Panet Raymond, Sabbaghian N, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in advanced colorectal cancer: A novel genomic predictor of clinical response to fluoropyrimidine based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9:1611-1615
58. Jakobsen A, Nederby N, Gydenkerne N, Linderberg J. Thymidylate Synthase and Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphism in Normal Tissue As Predictor of Fluorouracil Sensitivity. *J Clin Oncol* 2005; 23:1365-1369
59. Wisotzkey J, Toman J, Bell T, et al. MTHFR (C677T) Polymorphism and Stage III Colon Cancer: Response to Therapy. *Mol Diag* 1999; 4: 95-99
60. Lacasaña Navarro M, Galvan Portillo M, Chen J, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and gastric cancer susceptibility in Mexico *Eur J Cancer* 2006 ; 42 : 528-533
61. Kawakami K, Omura K, Kaneheira E, Watanabe G. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism is associated with folate pool gastrointestinal cancer tissue. *Anticancer Res* 2001 ; 21 : 285-289
62. Sohn K, Croxford R, Yates Z, Lucock M, In Kim Y. Effect of the methylenetretrahydrofolate reductase C677T polymorphism in chemosensitivity of

colon and breast cancer cells to 5 fluorouracil and methotrexate. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 134-144

63. Etienne M, Formento J, Chazal M et al. Methylentetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and response to fluorouracil based treatment in advanced colorectal cancer patients. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 785-792

64. Shannon B, Gnanasampanthan S, Beilby J, Lacopetta B. A polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene predispose to colorectal cancers with microsatellite instability. *Gut* 2002; 50 :520-524

65. Meningatti M, Di Gegrorio C, Borghi F, et al. Methylation pattern of different regions of the MLH1 promoter and silencing of gene expression in hereditary and sporadic colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 3: 357-361

66. Gryfe R, Kim H, Hsieh E et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 66-77

67. Elsaleh H, Iacopetta B. Microsatellite instability is a predictive marker for survival benefit from adjuvant chemotherapy in a population based series of stage III colorectal carcinoma. *Clin Colorectal Cancer* 2001; 2: 104-109

68. Carethers J, Smith E, Behling C, et al Use of 5 fluorouracil and survival in patients with microsatellite unstable colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004; 126: 394-401

69. Allison E, Sandler R, Carethers J et al. 5,10 Methylentetrahydrofolate reductase 677 and 1298 polymorphism, folate intake and microsatellite instability in colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2023-2029