

Polimorfismo C677T del gen MTHFR y el riesgo al desarrollo de cáncer gástrico distal en una población mexicana

*Dr. Jaime Raúl Zúñiga-Noriega, **Dra. María del Roble Velazco-Campos, **Q.C.B. Alejandra Aguirre-Rodríguez, **Dra. Laura Martínez-de Villarreal, ***Dra. Elvira Garza-González, *Dr. Héctor Jesús Maldonado-Garza, *Dr. Francisco Javier Bosques-Padilla

* Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" Universidad Autónoma de Nuevo León. ** Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. *** Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Correspondencia: Dr. Francisco Bosques Padilla. Av. Madero y Gonzalitos s/n. Col. Mitras Centro. Monterrey, N.L. C.P. 64460. Tel.: (52+) 81833-33664. Fax: (52+) 81833-33664. Correo electrónico: fbosques58@hotmail.com

Recibido para publicación: 28 de febrero de 2008.

Aceptado para publicación: 10 de marzo de 2008.

RESUMEN Antecedentes: el polimorfismo C677T de la enzima 5, 10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) se ha asociado a un mayor riesgo al desarrollo de cáncer gástrico proximal. **Objetivo:** estudiar el papel del polimorfismo MTHFR C677T como factor de riesgo al desarrollo de cáncer gástrico distal (CGD) en una población mexicana. **Pacientes y métodos:** se estudiaron 51 pacientes con CGD (edad promedio 57.6, femenino:masculino = 0.76) y 83 controles sin cáncer gástrico étnicamente similares (edad promedio: 51.5, femenino:masculino = 0.59). El polimorfismo MTHFR C677T se tipificó por PCR-RFLP. La infección por *Helicobacter pylori* se definió por el resultado positivo de al menos dos de las siguientes pruebas diagnósticas: histología, prueba rápida de ureasa y cultivo. **Resultados:** entre los pacientes con CGD, 16 (31.4%) fueron homocigotos para C y 23 (45.1%) fueron CT. Entre los pacientes control sin cáncer gástrico, 17 (20.5%) fueron CC y 49 (59%) fueron CT. No se encontró diferencia entre la frecuencia del genotipo C677T MTHFR entre los pacientes con CGD y los controles (23.5% vs. 20.5%, respectivamente) ($p = 0.84$; razón de momios = 1.19, intervalo de confianza del 95% = 0.48-2.98). La frecuencia del genotipo MTHFR 677TT en ambos grupos no fue influenciada por la presencia de *H. pylori*. **Conclusión:** el genotipo 677TT MTHFR es frecuente en la población mexicana. Este estudio proporciona evidencia de que no hay asociación entre el polimorfismo MTHFR C677T y el desarrollo de CGD en la población mexicana estudiada.

Palabras clave: MTHFR, *Helicobacter pylori*, metilentetrahidrofolato reductasa, cáncer gástrico.

SUMMARY Background: The 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C→T polymorphism has been associated to a higher risk to develop proximal gastric cancer. **Aim:** To study the role of the MTHFR C677T polymorphism as a risk factor for the development of distal gastric cancer (DGC) in a Mexican population. **Patients and methods:** Fifty-one histologically confirmed DGC (mean age = 57.6y, F:M = 0.76) and 83 ethnically matched non-GC controls (mean age 51.5y, F:M = 0.59) were studied. The MTHFR C677T polymorphism was typed by PCR-RFLP. The infection by *Helicobacter pylori* was defined by the positive result of at least two of the next diagnostic tests: histology, rapid urease test and culture. **Results:** Among the GC patients, 16 (31.4%) were homozygous for C and 23 (45.1%) were CT. Among the non-cancer control patients 17 (20.5%) were CC and 49 (59%) were CT. No difference was found in the frequency of the mutated variant MTHFR 677T between the GC cases and the non-cancer control patients (23.5% vs. 20.5% respectively) ($p = 0.84$; odds ratio: 1.19, 95% confidence interval: 0.48-2.98). The frequency of MTHFR 677TT genotype was not influenced by the infection by *H. pylori*. **Conclusion:** The mutated genotype TT of the MTHFR is frequent in Mexican population. Our study provides evidence that there is no association between the MTHFR C677T polymorphism and the development of gastric cancer in the Mexican population studied.

Key words: MTHFR, *Helicobacter pylori*, methylenetetrahydrofolate reductase, gastric cancer.

ANTECEDENTES

La enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) interviene en el metabolismo de los folatos. Esta enzima tiene un papel importante en el aporte de grupos metilo para la reducción de 5, 10-metilen-tetrahidrofolato a 5-metil-tetrahidrofolato, la cual es la forma predominante de folato circulante y sirve como sustrato para la metilación de homocisteína a metionina con producción de S-adenosilmetionina. Esta última es considerada como el donador universal de grupos metilos requeridos para la metilación del ADN.^{1,2}

Los niveles bajos de folatos plasmáticos interfieren con la síntesis y reparación del ADN, produciendo hipometilación del ADN, la cual se ha involucrado en la carcinogénesis gástrica, ya que se asocia con activación de oncogenes y con pérdida de la función de genes supresores de tumores.^{3,4}

Los portadores homocigotos del polimorfismo 5,10-(MTHFR) 677 C → T presentan 30% de actividad enzimática con respecto al polimorfismo nativo mientras que los heterocigotos MTHFR 677CT preservan 65% de la actividad.⁵ Los portadores homocigotos del polimorfismo MTHFR TT han sido asociados con cáncer de mama en pacientes premenopáusicas, cáncer colorrectal, displasia cervico-uterina y adenocarcinoma gástrico proximal.⁶⁻¹⁰

El objetivo de este trabajo fue estudiar el papel del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* como un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico distal en una población mexicana.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se estudiaron 51 pacientes con cáncer gástrico distal histológicamente confirmado (edad promedio 57.6, femenino:masculino = 0.76, rango de edad 32-80, mediana = 60). El cáncer se consideró como distal cuando estaba localizado en el tercio inferior del estómago. Se estudiaron además 83 controles sin cáncer gástrico étnicamente similares (edad promedio: 51.5, femenino:masculino = 0.59, rango de edad 19-93, mediana = 51). Los controles tenían indicación de una endoscopia superior por síntomas dispépticos. Todos los pacientes fueron captados en el Hospital Universitario, "Dr. José Eleuterio González", Universidad Autónoma de Nuevo León. Ninguno de ellos tenía parentesco entre sí.

Examen histopatológico

Todos los pacientes y controles fueron sometidos a endoscopia y durante el procedimiento se tomaron ocho

biopsias para detección de infección por *H. pylori* y evaluación histológica: dos de la curvatura menor, dos de la curvatura mayor, dos de la incisura angular y dos de la región prepilórica. A los pacientes con cáncer gástrico distal se les tomaron por lo menos ocho biopsias del tumor. Todas las biopsias fueron fijadas en formol al 10%, embebidas en parafina y posteriormente se realizaron múltiples cortes histológicos de 4 µm de espesor, los cuales se tiñeron con hematoxilina y eosina para evaluación por un patólogo especializado.

Análisis del polimorfismo MTHFR C677T

Se colectó una muestra de sangre venosa, y se obtuvo el ADN por medio de extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y precipitación con etanol. El polimorfismo *MTHFR* 677C → T fue detectado por el método reacción encadena de la polimerasa-polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP). Se prepararon mezclas de reacción de 25 µL que contenían 200 ng de ADN genómico humano, 50 ng de cada iniciador (F: 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' y R: 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'), Tris HCl 10 mM (pH 8.3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, cada dNTP a concentración 200 µM, y 1.5 U de Taq ADN polimerasa. Para la PCR se emplearon las siguientes condiciones: 5 min a 94 °C seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 59 °C y 1 min a 72 °C. Esto fue seguido por extensión final de 7 min a 72 °C. La digestión se realizó empleando la enzima de restricción *Hinf I* con incubación a 37 °C durante 12 h. Los productos de digestión se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 3% y tinción con bromuro de etidio. El genotipo 677CC produjo una sola banda de 198 pb. El tipo heterocigoto 677CT produjo fragmentos 198, 175, y 23 pb. Los mutantes homocigotos 677TT produjeron fragmentos 175 y 23 pb.

Diagnóstico de infección por *H. pylori*. La infección por *H. pylori* se consideró como variable confusora y se determinó por el resultado positivo de al menos dos de las siguientes pruebas diagnósticas: prueba rápida de ureasa, cultivo y detección de la bacteria por medio de análisis histológico.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó utilizando un programa computacional (Epi-Info 2000 versión 1.0.5; Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.). Se realizó prueba de Ji cuadrada con corrección de Yates

CUADRO 1

DISTRIBUCIÓN DE LOS GENOTIPOS DE LA MUTACIÓN C677T MTHFR ENTRE CASOS DE CÁNCER GÁSTRICO Y CONTROLES SELECCIONADOS

	CC n(%)	CT n(%)	TT (n%)
Casos (cáncer) (n = 51)	16 (31.4)	23 (49.1)	12 (23.5)
Controles (n = 83)	17 (20.5)	49 (59)	17 (20.5)
Controles (sólo gastritis) (n = 52)	9 (17.3)	30 (57.7)	13 (25)
Controles apareados por edad (n = 67)	15 (22.4)	38 (56.7)	14 (20.9)

CUADRO 2

VALORES DE RAZÓN DE MOMIOS CON SU RESPECTIVO INTERVALO DE CONFIANZA (IC) DEL 95% LA COMPARACIÓN DE LA FRECUENCIA DEL GENOTIPO MTHFR 677 TT ENTRE LOS PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO DISTAL Y EL GRUPO CONTROL Y LOS SUBGRUPOS FORMADOS.

	Razón de momios	ICs del 95%
Casos vs. subgrupo sin cáncer	1.19	0.48-2.98
Casos vs. subgrupo control con hallazgo histológico de sólo gastritis	0.92	0.34-2.49
Casos vs. subgrupo control apareados por edad	1.16	0.44-3.04

para evaluar diferencias en las proporciones de los genotipos de *MTHFR* entre los casos y los controles. Un valor de probabilidad (p) < 0.05 se consideró estadísticamente significativo. Se estimaron además los valores de razón de momios (RM) con sus respectivos intervalos de confianza (IC) del 95%. La población control se examinó para evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg.

RESULTADOS

Distribución de la mutación C677T *MTHFR* en los casos y controles y análisis del riesgo del genotipo 677TT *MTHFR* (Cuadro 1)

El grupo control se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg en locus polimórfico estudiado (pHW [HW subscript] = 0.135). Las frecuencias del polimorfismo C677T *MTHFR* en los 51 pacientes con cáncer gástrico distal y los 83 pacientes control se muestran en el cuadro 2. La frecuencia de genotipo *MTHFR* 677 TT se comparó entre los pacientes con cáncer gástrico distal y la totalidad de los pacientes sin cáncer gástrico incluidos en este trabajo (n = 83), así como con los subgrupos control definidos por el hallazgo histológico de sólo gastritis (n = 52) y el apareamiento por edad (n = 67). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la

comparación de los casos con la totalidad de controles ni con los subgrupos control definidos (Cuadro 2).

Análisis del riesgo del genotipo *MTHFR* 677 TT en los pacientes infectados con *H. pylori*

Se eliminó la posible participación de la infección por *H. pylori* como variable confusora en el riesgo al desarrollo de cáncer gástrico distal por la definición de un grupo de casos (n = 22) y un grupo de controles sin cáncer (n = 51) infectados con *H. pylori*. Al realizar este ajuste, se observó poca diferencia para la estimación de riesgo (RM = 2.18, IC 95% = 0.6-7.96, p = 0.30).

DISCUSIÓN

La metilen tetrahidriofolato reductasa participa en la síntesis del ADN. La mutación C677T *MTHFR* disminuye sustancialmente la actividad de la enzima por lo que se de esperarse que las rutas metabólicas en las que participa también se vean afectadas. La presencia de esta mutación ha sido asociada a diversos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer gástrico proximal.⁴

En este trabajo se estudió la mutación *MTHFR* C677T y su posible asociación con el desarrollo de cáncer gástrico distal. Se encontró que la frecuencia de la mutación

C677T *MTHFR* fue similar a lo reportado en la literatura mundial¹⁻⁴ y no se observó asociación considerando la comparación entre los casos de cáncer gástrico distal y la totalidad de los controles así como tampoco en los subgrupos definidos por el hallazgo histológico de gastritis, apareando el grupo control por edad, así como por la eliminación de la infección por *H. pylori* como variable confusora.

Se ha descrito que el folato es una de los micronutrientes clave para mantener un suministro adecuado de donadores de grupos metilo. La disminución de la actividad de la *MTHFR* produce limitación de este mecanismo, hipometilación del ADN y expresión de oncogenes.⁹

Se ha sugerido que la baja ingesta de folatos y los niveles séricos bajos de los mismos incrementan el riesgo al desarrollo de cáncer por un mecanismo no bien dilucidado, probablemente por el incremento en el contenido de uracilo en el ADN, por la incorporación de desoxiuridiltrifosfato (dUTP) en lugar de desoxitimidiltrifosfato (dTTP) en la molécula de ADN.¹⁰ Luego de un suministro adecuado de folatos, el nivel sérico de los mismos se incrementa 203% y en el epitelio gástrico se incrementa 525%.⁵ Esto podría definir una mayor biodisponibilidad de folatos en el epitelio gástrico, contrarrestar la posible baja actividad de la enzima *MTHFR* y explicar, al menos en parte, la falta de asociación con el desarrollo de cáncer gástrico distal que se encontró en este trabajo, no así con la asociación positiva de este polimorfismo descrito con diversas neoplasias tales como el cáncer cérvico-uterino, el cáncer de mama en pacientes premenopáusicas y el cáncer colorrectal.

Si bien es cierto que la baja actividad de la *MTHFR* se ha asociado con el cáncer gástrico proximal, el cáncer gástrico distal es etiopatogénicamente diferente y es de esperarse una participación relativa de otros factores que hasta ahora se han asociado al desarrollo de cáncer distal, además, se puede especular que la biodisponibilidad de folatos no se incrementa en la porción proximal del estómago, ya que se tiene poco tiempo de contacto con los nutrientes por la fisiología y anatomía del estómago.

Un reporte previo investigó el polimorfismo C677T *MTHFR* en el riesgo al desarrollo de cáncer gástrico y su relación con factores de la dieta tales como la ingesta de ácido fólico, y el consumo de alcohol en una población mexicana.¹¹ En este estudio se incluyeron 201 casos y 427 controles y se encontró un incremento en el cáncer gástrico entre los portadores de genotipo homocigoto mutado (677TT) comparado con el genotipo homocigoto

silvestre (677CC), sin embargo, el IC fue no significativo (RM = 1.62, 95% CI = 1-2.59). No se encontró relación entre el polimorfismo de la *MTHFR* y el consumo de folatos y alcohol. Los resultados de nuestro trabajo, al parecer confirman los hallazgos de este reporte, al menos en lo relacionado con el polimorfismo C677T *MTHFR*.

En resumen, en este trabajo se encontró que el genotipo 677TT *MTHFR* es frecuente en la población Mexicana y se proporciona evidencia de que no hay asociación entre el polimorfismo *MTHFR* C677T y el desarrollo de cáncer gástrico distal, al menos en la población estudiada.

REFERENCIAS

1. Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B, Wilkens LR, Bertram CC, Killeen J, Le Marchand L, Selhub J, Murphy S, Donlon TA Association of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and dietary folate with the risk of cervical dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 1275-80.
2. Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, Olivieri O, Jacques PF, Rosemberg IH, Correcher R, Selhub J. A common Mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 5606-611.
3. Delgado-Enciso I, Martinez-Garza SG, Rojas-Martinez A, Ortiz-Lopez R, Bosques-Padilla F, Calderon-Garciduenas AL, Zarate-Gomez M, Barrera-Saldana HA. 677T mutation of the *MTHFR* gene in adenomas and colorectal cancer in a population sample from the Northeastern Mexico. Preliminary results. *Rev Gastroenterol Mex* 2001; 66: 332-7.
4. Shen H, Xu Y, Zheng Y, Qian Y, Yu R, Qin Y, Wang X, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and risk of gastric cancer in a Chinese population: a case-control study. *Int J Cancer* 2001; 95: 332-6.
5. Xiao SD, Meng XJ, Shi Y, Hu YB, Zhu SS, Wang CW. Interventional study of high dose folic acid in gastric carcinogenesis in beagles. *Gut* 2002; 50: 61-4.
6. Semenza JC, Delfino RJ, Ziogas A, Anton-Culver H. Breast cancer risk and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 77: 217-23.
7. Cohen V, Panet-Raymond V, Sabbaghian N, Morin I, Batist G, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism in Advanced Colorectal Cancer: A Novel Genomic Predictor of Clinical Response to Fluoropyrimidine-based Chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1611-15.
8. Lambropoulos AF, Agorastos T, Foka ZI, Chrisafi S, Constantinidis TC, Bontis J, Kotsis A. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T is not associated to the risk of cervical dysplasia. *Cancer Lett* 2003; 10: 187-91.
9. Pufulete M, Al-Ghnam R, Leather AJ, Appleby P, Gout S, Terry C, Emery PW, Sanders TA. Folate status, genomic DNA hypomethylation, and risk of colorectal adenoma and cancer: A case control study. *Gastroenterology* 2003; 124: 1240-8.
10. Ren J, Ulvik A, Refsum H, Ueland PM. Uracil in Human DNA from Subjects with normal and impaired folate status as determined by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2002; 74: 295-9.
11. Lacasaña-Navarro M, Galván-Portillo M, Chen J, López-Cervantes M, López-Carrillo L. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C > T polymorphism and gastric cancer susceptibility in Mexico. *Eur J Cancer* 2006; 42: 528-33.