

Nuestros resultados: **frecuencia 0.215, odds ratio 0.698 (IC95% 0.479-0.917) y $P < 0.05$, reflejan una asociación significativa reveladora de protección y P significativa**, son contrarios a lo sugerido en el informe de la IARC 1999, de asociación con riesgo en los tumores distales de colon.

Un análisis más detallado de las evidencias disponibles, junto a los resultados de nuestro estudio hacen reconsiderar el efecto de riesgo del genotipo nulo de ***GSTM1*** al menos con relación a los tumores colorrectales.

En primer lugar, no se tiene un completo conocimiento del sustrato o sustratos sobre el que actúa esta transferasa in vivo y la única evidencia disponible de su actividad detoxificadora es frente al carcinógeno trans-óxido de estilbena (Seidegard et al 1988) y un metabolito carcinogénico del benzo(a)pireno llamado benzo(a)pireno-7,8-diol-9,10 epóxido.

Por otra parte los conocimientos sobre la expresión de esta familia son limitados. Coles et al (2002) estudia en humanos los patrones de expresión en el tracto gastrointestinal (estómago-colon) de proteínas con actividad (*GSTP1*, *GSTA1*, *GSTA2*, *GSTM1*, *GSTM3*). Comprueba la gran variabilidad órgano específica e interindividual en su expresión, siendo en general *GSTP1*, *GSTA1* y *GSTA3* componentes mayoritarios y *GSTM1* y *GSTM3* minoritarios. El gen ***MGST-1*** que pertenece al grupo de los genes microsomales también se ha demostrado su expresión en colon (Lee et al 1999).

Se conoce la existencia de dos variantes alélicas **GSTM1*A** y **GSTM1*B** sin diferentes propiedades catalíticas, así como la existencia de hemicígotos nulos **GSTM1*A/*0** y **GSTM1*B/*0** que no pueden ser identificados con la técnica analítica empleada en este trabajo y cuyas consecuencias fisiológicas se desconocen. Puede suceder que la actividad detoxificadora sea dependiente de la cantidad de proteína y que el efecto sea significativo al tener en cuenta los hemicígotos nulos.

También puede suceder que la actividad de conjugación provoque la aparición de intermediarios metabólicos con actividad tóxica, como sucede en el caso de **GSTT1** que puede activar al diclorometano (DCM) para formar por conjugación con GSH S-cloro metilglutation (Sherratt et al 1997).

Existen evidencias que revelan una regulación compleja en este gen; otro miembro de esta familia, el gen **GSTM3**, también polimórfico, puede modular los efectos de GSTM1 según demuestran estudios realizados sobre CCR. El gen **GSTM3** tiene dos alelos **GSTM3*A** y **GSTM3*B**, la diferencia estriba en que este último presenta una delección de 3bp en el intrón 6 que crea una secuencia de reconocimiento para el factor de transcripción **YY1** (Ying Yang 1) y está ligado al alelo GSTM1*A. Este factor está ampliamente expresado y regula la expresión de muchos genes, sugiriendo que GSTM3*A y GSTM3*B presentan diferentes niveles de expresión que afecta de una forma distinta a la conjugación de carcinógenos.

Por ello quizá para asegurar la influencia del genotipo de GSTM1 en el riesgo frente al CCR sea necesario tener en cuenta el genotipo en GSTM3. Loktionov et al (2001) describen que la combinación de GSTM1*0 con GSTM3*B (A*/B* o B*/B*) se asocia significativamente a riesgo en pacientes con tumores proximales y distales (**OR=2.12**, IC95% 1.24-3.63) pero especialmente en distales (**OR=2.75**, IC95%1.56-4.84) y en varones (**OR=3.57** IC95% 1.73-7.36).

Quizá la hipótesis de que el genotipo nulo de GSTM1 confiera un incremento del riesgo sea demasiado simplista, dado que los alelos GSTM1*A y GSTM1*B a pesar de tener propiedades catalíticas similares in vitro tienen efectos diferentes en la susceptibilidad a patologías como el cáncer de vejiga, enfermedad de Crohn y carcinoma de células basales donde GSTM1A/B es protector pero no lo es GSTM1*A o GSTM1*B. Los mecanismos responsables de estos efectos no se conocen bien. GSTM1 es uno de los 5 genes de la familia mu (M1-M5). Las proteínas que codifican presentan una actividad solapante respecto al sustrato, por lo que el producto de uno de ellos puede compensar funcionalmente la ausencia de otros miembros. Trabajos realizados sobre cáncer de pulmón sugieren la expresión coordinada de miembros de la familia mu, los homocigotos GSTM1*0 expresan menos GSTM3 que los sujetos portadores de otros genotipos en GSTM1, el mecanismo que subyace a este efecto es desconocido (Nakajima et al 1995).

Los monómeros codificados por GSTM1*A y GSTM1*B forman enzimas homodiméricas y heterodiméricas que catalizan la detoxificación de moléculas electrofílicas, incluidos epóxidos y ciertos productos de especies reactivas de oxígeno que atacan al ADN, sugiriendo que estas isoformas desempeña también un papel en la reparación del ADN.

Parece claro que el efecto protector o de riesgo de este genotipo depende de la acción de la sustancia que conjuga y facilita su excreción y que entre estos compuestos se encuentran tanto carcinógenos como sustancias anticarcinogénicas presentes en los alimentos. Lin et al (1998) estudian el papel preventivo del brócoli sobre el CCR, su efecto es mayor en portadores del genotipo nulo. Comparando los sujetos con el cuartil más bajo de ingesta que eran nulos tenían un RR 0.36 (CI 95% 0.19-0.68) y aquellos en el cuartil mas alto de ingesta que eran GSTM1 positivos tenían un RR de 0.74 (95% CI 0.40-0.99) siendo la interacción estadísticamente significativa $P=0.01$. Ya que una ingesta elevada de crucíferas está asociada con una disminución del riesgo en colon y especialmente en recto. Este efecto de las crucíferas es debido a las propiedades anticarcinogénicas de los isotiocianatos que son potentes inductores de enzimas de detoxificación de mutágenos (Prochaska et al 1992). Los genotipos GSTM1*1 A o B actuarían facilitando la excreción de isotiocianatos y por eso supondría riesgo, frente al genotipo nulo en el que la no eliminación de los isotiocianatos conferiría un papel protector. Lampe et al (2000) confirman en su trabajo los resultados de Lin et al (1998), comparan el efecto en hombres y mujeres (20-40 años), no fumadores de

dietas controladas sin vegetales y suplementadas con especies vegetales de los géneros brassica, allium y apiaceous. Miden la actividad de GST y la concentración sérica de GST- α , encuentran que la ingesta de vegetales del género brassica incrementa significativamente la actividad de GST- α pero sólo en los portadores del genotipo GSTM1 nulo (especialmente en mujeres), sugiriendo que el efecto protector de las crucíferas se debe al menos en parte a la ausencia de actividad GSTM1.

5.10.- Discusión polimorfismo en GSTT1.

Hay una menor dispersión en las frecuencias en las diferentes etnias, variando entre **0.11-0.18** en Caucásicos, **0.24-0.38** (Afroamericanos-Africanos) y **0.16-0.58** en Asiáticos, siendo Chinos (Singapore) aquellos que presentan una mayor frecuencia del genotipo nulo. En general hay una menor frecuencia absoluta de los homocigotos nulos en comparación con **GSTM1**.

Los estudios sobre el polimorfismo nulo de **GSTT1** son menos abundantes que los de **GSTM1**. En la revisión de Jong et al (2002) de un conjunto de estudios sobre polimorfismos en genes de baja penetrancia implicados en la susceptibilidad al cáncer colorrectal, el polimorfismo nulo en **GSTT1** es uno de los cuatro asociados a riesgo (**GSTT1, NAT2, HRAS1 y ALDH2**). Recogen resultados de 11 estudios sobre **GSTT1**, la frecuencia es de **0.21** sobre una población de casos de 1.490 personas (varias etnias) y 2.026 controles y el odds ratio es de **1.37 (IC95% 1.17-1.60)** con valores de P significativos por lo que el genotipo nulo en **GSTT1** confiere riesgo.

Este valor es menor que el encontrado en nuestra serie que es de **3.092**, aunque no superior al valor más alto publicado en la serie de Zhang et al (1999) de **4.49 (IC95% 2.42-8.34)** significativo de asociación.

Los resultados de los 11 estudios recogidos en el trabajo de Jong et al (2002) son bastante homogéneos con relación a la asociación de este genotipo nulo con riesgo en tumores colorrectales.

De los polimorfismos conocidos en los dos miembros de la familia theta, el nulo en GSTT1 es con diferencia el más extensamente estudiado, aunque menos que el nulo de GSTM1. No se ha descrito desequilibrio de ligamiento con otros miembros, ni unión a ligandos de receptores hormonales nucleares como algunos miembros de la familias alpha y mu (Listowsky et al 1988). Algunas transferasas están implicadas en la biosíntesis de ligandos de receptores de la superficie celular y también pueden inactivar ligandos de receptores celulares o inactivar moléculas que actúan como agonistas de rutas de señalización de respuesta al estrés, también pueden interactuar con protein kinasas como parte de las vías de transducción de señales, por todo ello es probable que los polimorfismos en estos genes tengan otras consecuencias más allá de los mecanismos de conjugación como parte de los mecanismos de detoxificación.

Es de reseñar el trabajo de Chen et al (1996), sobre el incremento de riesgo de los portadores del genotipo nulo **GSTT1*0** en los síndromes mielodisplásicos con uno de los odds ratio más alto de los citados en la literatura **4.3 (IC95% 2.5-7.4)** que los autores

atribuyen a la disminución de los procesos de detoxificación frente a carcinógenos ambientales o endógenos.

Como queda patente en los trabajos citados, la mayoría de los estudios sobre polimorfismos y riesgo frente a patologías son de casos y controles, con un número reducido de sujetos, poco valor estadístico, con odds ratio para asociaciones entre 1,2-2,5. Cuando alcanzan significancia estadística, los valores revelan un reducido impacto biológico. Sin embargo, hay excepciones que muestran el gran significado biológico que tienen algunos polimorfismos en ciertos subgrupos de población. Es el caso de **GSTT1*0** en carcinomas de células basales, referido a los patrones de presentación, velocidad de crecimiento tumoral y lugares de desarrollo. Heterogeneidad que no es debida a diferencias en la exposición a UV. Aunque la mayoría de los pacientes con CCB (carcinoma células basales) tienen un sola lesión, alrededor de un 15% de los casos presentan clusters de CCB en la primera o posteriores presentaciones, es lo que Hayes et al (2000) denomina en su trabajo Múltiple Cluster MPP, frente a Single Cluster MPP (SPP). Los pacientes SPP no desarrollan tumores con posterioridad al 1º o si aparecen es sólo un CCB, mientras que los MPP tienen más tumores, con una media de 5.4 CCB. Sin embargo, estos pacientes no han estado expuestos a mayores dosis de radiación UV. Se cree que estos pacientes tienen alterados sus mecanismos de protección frente a la radiación. Dentro de los pacientes MPP existe heterogeneidad. Los MPP cluster sólo tienen un cluster de tumores, mientras que los Múltiple cluster MPP tienen entre 2-5 clusters y cabe esperar que este grupo desarrollen numerosos CCB $11,3 \pm 6.8$ frente a 3.7 ± 1.8 .

Se han investigado los factores de predisposición frente a este riesgo, se han estudiado los genes GSTT1, CYP2D6, VDR, IL-10 y TNF-alpha. Los genotipos GSTT1*0 y CYP2D6 EM están aumentados en los múltiple cluster comparados con los single cluster, siendo los odds ratio para ello relativamente grandes 7.4 para el nulo de GSTT1 y 15.5 para CYP2D6 EM, con P significativas en ambos casos 0.004 y 0.028 respectivamente, por ello aunque el mecanismo de la asociación no sea claro lo que es evidente es el efecto biológico que la carencia de la proteína codificada por GSTT1 tiene sobre la sensibilidad frente a las radiaciones UV.

5.11.- Discusión polimorfismos en CYP1A1 alelos, CYP1A1*2 y CYP1A1*3

Alelo CYP1A1*2

La mayoría de los trabajos sobre polimorfismos de riesgo en el gen **CYP1A1**, se han realizado en adenocarcinomas y carcinomas de células escamosas de pulmón. Se reflejan en la **tabla XXXVIII**, datos de los dos trabajos recogidos por Vineis et al 1999 para IARC: el de Sivaraman et al 1994 (Caucásicos Americanos) y Kawajiri et al 1993 (Asiáticos-Japoneses) referidos al CCR. La frecuencia difiere de la encontrada en Japoneses que es del 0.106 y está mas cerca al 0.04 encontrada en Americanos

Tabla XXXVIII.- Comparación de frecuencias en los genotipos de *CYP1A1 Msp I* en la serie de casos y controles estudiada y otros estudios descritos en la bibliografía

<i>CYP1A1</i>	Casos frecuencia Tesis	Casos frecuencia Estudios	Controles frecuencia Tesis	Controles frecuencia Estudios
<i>CYP1A1*</i>	0.698		0.709	0.49 0.443*
<i>CYP1A1*2</i>	0.01	0.05-0.11 *0.11 Media	0	0.04 0.106*
<i>CYP1A1*1/*2</i>	0.29		0.29	0.47 0.451*
*Valor medio de población blancos+asiáticos				

Jong et al (2002) recogen datos de 5 estudios sobre poblaciones de raza blanca y asiática estudiando el efecto tanto sobre adenocarcinomas como sobre adenomas colorrectales; el valor de odds ratio para ***CYP1A1*2*** con una frecuencia del **20%**, es de **0,93 (IC95% 0.71-1.22)** sin alcanzar significado ni la asociación, ni el valor de P. La frecuencia de este genotipo es por tanto notablemente superior al encontrado en nuestra serie que es del 1,1%, aunque por el odds ratio se asocia a riesgo 2,32 el valor de P no es significativo. En los heterocigotos ***CYP1A1*1/*2*** sucede lo mismo aunque el odds ratio se asocia a riesgo 1,692 (IC 95% 1,058-2,326) el valor de P no es significativo.

Alelo *CYP1A1*3*

Se expone en la **tabla XL**, datos de los dos trabajos recogidos por P.Vineis 1999 para IARC, el de Sivaraman 1994 (caucásicos americanos) y Kawajiri 1993 (asiáticos-japoneses) referidos a CCR.

Tabla XL.- Comparación de frecuencias en los genotipos de *CYP1A1* ASO en la serie de casos y controles estudiada y otros estudios descritos en la bibliografía

<i>CYP1A1</i>	Casos frecuencia Tesis	Casos frecuencia Estudios	Controles frecuencia Tesis	Controles frecuencia Estudios
<i>CYP1A1</i> *1	0.92		0.89	0.702 0.0651*
<i>CYP1A1</i> *3	0.03	0.09-0.2 *0.14	0.034	0.0 0.047*
<i>CYP1A1</i> *1/*3	0.04		0.077	0.298 0.302*
*Valor medio de población blancos+asiáticos				

Al igual que sucede con el polimorfismo de corte Msp I de *CYP1A1*, la mayoría de los trabajos sobre el polimorfismo A462G del Exon 7 se han realizado en afectados con adenocarcinomas y carcinomas de células escamosas de pulmón, esófago, laringe, boca, cabeza, cuello, vejiga y riñones. A Diferencia del polimorfismo de corte Msp I cuyo significado funcional no es bien conocido, en el caso de este polimorfismo A462G se sabe que supone un incremento en la actividad enzimática de la proteína.

Según Smith et al 1995, los polimorfismos en *CYP1A1*, Msp I (*CYP1A1**2) y A462G Exon 7 (*CYP1A1**3) se encuentran en la etnia caucásica en desequilibrio de ligamiento, lo que no sucede en nuestra serie: *CYP1A1**2, un paciente y *CYP1A1**3, tres pacientes. Y en la población de controles *CYP1A1**2 , ninguna persona frente a cuatro con el genotipo *CYP1A1**3.

Con respecto a **CYP1A1*3**, Jong et al (2002) recogen datos de 4 estudios sobre poblaciones Caucásica y Asiática, estudiando el efecto sobre adenocarcinomas; el valor del odds ratio para una frecuencia del genotipo de riesgo del **14%**, es del **0.96 (IC95% 0.48-1.95)** sin significado ni la asociación, ni el valor de P. La frecuencia en nuestra serie es del **3,2%**, el odds ratio de **2.787 (IC95% -0.31-5.848)** y valor de P no significativo. Lo mismo sucede con relación a los heterocigotos.

Sería necesario obtener un mayor número de casos y controles con genotipos de riesgo, emparejando poblaciones de casos y controles de fumadores para poder comprobar si la asociación entre los genotipos CYP1A1*2 y *3 y CCR comporta riesgo frente al CCR.

5.12.- Discusión polimorfismo en MTHFR*2 . Folatos y carcinogénesis colónica.

Recogemos datos de frecuencia de dos revisiones: la ya mencionada de Jong et al (2002), con resultados de 8 estudios en Caucásicos y Asiáticos y la de Sharp et al (2004) que recogen resultados de 10 (tres comunes con el trabajo de Jong, 5 en EU, dos en UK y uno en cada uno de los tres países siguientes: Australia, Méjico y Corea).

Las frecuencias se refieren a población de casos de CCR, con valores en general inferiores a 0.2. En el estudio Australiano los homocigotos TT son el **0.11**, en Korea **0.16**, Méjico **0.21**, UK **0,08** -

0.12 y en los EU varia desde **0.06** (población casos: 38% Africanos y 62% de caucásicos), pasando por **0.13**, **0.15**, **0.11** y **0.16** (población 59% japoneses, 27% caucasianos y 14% Hawaianos).

La población de casos en nuestra serie se encuentra dentro de los valores publicados por Sharp et al (2004) estando más próximos a las frecuencias más altas descritas. Sin embargo, está por debajo del límite inferior del pool publicado por Jong et al (2002). En esta revisión **Tabla L**, se publica un odds ratio de **0.74** (IC95% 0.61-0.89) con un valor de P para el conjunto de estudios significativo y por consiguiente asociado a protección.

Tabla LI.- Relación de estudios sobre MTHFR (C677T) y CCR Jong et al (2002)					
Autor -año	Frec.alelo riesgo	Genotipo	OR	IC 95%	Sig.
Ma 1997	0.35 blancos	W/V	1.10	0.76-1.60	NS
		V/V	0.58	0.32-1.06	NS
Park 1999	0.43 asiáticos	W/V	0.94	0.65-1.36	NS
		V/V	0.81	0.48-1.38	NS
Slattery 1999	0.33 blancos	W/V	1.03	0.89-1.19	NS
		V/V	0.83	0.65-1.05	NS
Total	0.35	W/V V/V	1.01 0.74	0.90-1.14 0.61-0.89	NS S

Aunque individualmente en ninguno de los tres trabajos: Ma (1997), Park et al (1999) y Slattery et al (1999) se obtienen valores significativos de P

En la reciente revisión de Sharp et al (2004), con 10 estudios, siete son consistentes con una disminución del riesgo para este genotipo, aunque tampoco alcanzan significancia estadística, **Tabla LII.**

Tabla LII.- Relación de estudios sobre MTHFR (C677T) y CCR Sharp et al (2004)					
Autor -año	Frec.alelo Riesgo TT	Genotipo	OR	IC 95%	Sig.
Shannon 2002	0.11 australianos	TT vs CC	1.03	0.71-1.49	NS
Park 1999	0.16 coreanos	TT vs CC	0.81	0.46-1.42	NS
		CT vs CC	0.75	0.60-0.95	S
Delgado-Enciso 2001	0.218 mejicanos	TT vs CC	1.61	0.62-4.19	NS
		CT vs CC	0.94	0.64-1.39	NS
Sharp 2001	0.119 escoceses	TT vs CC	0.93	0.66-1.32	NS
Sachse 2002	0.083	TT vs CC	1.23	0.81-1.88	NS
		CT vs CC	0.72	0.41-1.28	NS
Chen 1996	0.134 americanos	TT vs CC	0.57	0.30-1.06	NS
		CT vs CC	0.83	0.65-1.07	NS
Ma 1997	0.15 americanos	TT vs CC	0.45	0.24-0.86	NS
Keku 2002	0.066 americanos	TT vs CC	0.8	0.5-1.4	NS
		CT vs CC	0.98	0.67-1.45	NS
Slattery 1999	0.114 americanos	TT vs CC	0.9	0.7-1.1	NS
		CT vs CC	1.1	0.9-1.4	NS
Le Marchand 2002	0.159 hawai	TT vs CC	0.7	0.5-1.0	NS

Sobre la base de los efectos biológicos del polimorfismo, los homocigotos **TT** con un 70% de reducción en la actividad reductasa, teniendo presente la asociación inversa entre niveles de folatos y enfermedad colorrectal, cabría esperar que este genotipo estuviera asociado con un incremento del riesgo, como es el caso de lo que sucede en nuestro trabajo.

La explicación que dan aquellos autores, es que **el efecto de este polimorfismo sobre la carcinogénesis colónica depende de los niveles de folatos**. Si la ingesta cubre las necesidades basales, posiblemente sea el caso de la mayoría de los trabajos, **este polimorfismo TT no confiere riesgo o si acaso una cierta protección, aunque pequeña**. Sin embargo **este polimorfismo TT confiere riesgo**, si la ingesta es baja o si los requerimientos fisiológicos (envejecimiento) patológicos, (colitis ulcerosa) o prepatológicos (exposición a carcinógenos) están aumentados.

Es nuestro trabajo, el primero en la literatura internacional que con resultados estadísticamente significativos, apoya la hipótesis del papel de riesgo que confiere el ser portador del genotipo TT (**MTHFR C677T**) con relación al cáncer colorrectal.

Con relación a otros órganos, hay evidencias preliminares que sugieren que los individuos con genotipo TT tienen una disminución del riesgo de leucemia aguda en el adulto y un incremento del riesgo en tumores de endometrio, cervicales y de mama (Kim et al 2000).

Trabajos previos nos llevan a considerar que la población estudiada probablemente presenta una ingesta insuficiente de folatos. Aunque también pueden existir otros mecanismos que conduzcan a niveles basales bajos, como una menor biodisponibilidad de los mismos determinada genéticamente o ligada a interacciones con otros nutrientes.

En el estudio “ La Dieta Mediterránea y Alicante” basado en encuestas nutricionales, J.Medrano et al (1994) reflejan que los aportes medios de vitaminas son muy ajustados a la ingesta recomendada. El universo de la muestra fue población empadronada en la Ciudad de Alicante con edades comprendidas entre 20 y 60 años. En lo referente a la ingesta de ácido fólico el riesgo de ingesta inadecuada alcanzaba el 41% de los varones y al 42% de las mujeres. En otras regiones de nuestra geografía sabemos que también es inadecuada la ingesta del mismo. En una encuesta nutricional del País Vasco, Aranceta et al (1990), se evidenció una ingesta insuficiente de folatos en el 20% de los varones y en el 30% de las mujeres. Se confirmó la reducida ingesta, mediante mediciones de indicadores bioquímicos; se encontraron niveles de folatos séricos subóptimos en el 14% de las mujeres y en el 19,5 % de los hombres, afectando principalmente a los grupos de edades más jóvenes. Los folatos a nivel eritrocitario presentaban valores subóptimos en el 46% de los hombres y en el 42% de las mujeres.

En otro estudio nutricional realizado en Reus, (Salas et al 1988), ningún grupo de edad o sexo cubría las ingestas de Vitamina B 9 que se recomiendan en el Reino Unido (300 mg) excepto los niños de 2 a 4 años.

Esta situación no es exclusiva de nuestro país, Duthie (1999) refiere que la deficiencia de folatos es la más común de las deficiencias vitamínicas, afectando en USA al 10% de la población adulta,

alcanzando el 65% en la población juvenil o en la de ancianos con bajo nivel socio-económico.

El extraordinario avance acontecido en estos últimos años en la comprensión de los mecanismos por los que las deficiencias de folatos conducen al cáncer en general y de una forma particular al colorrectal, justifica que profundicemos en ellos en esta discusión.

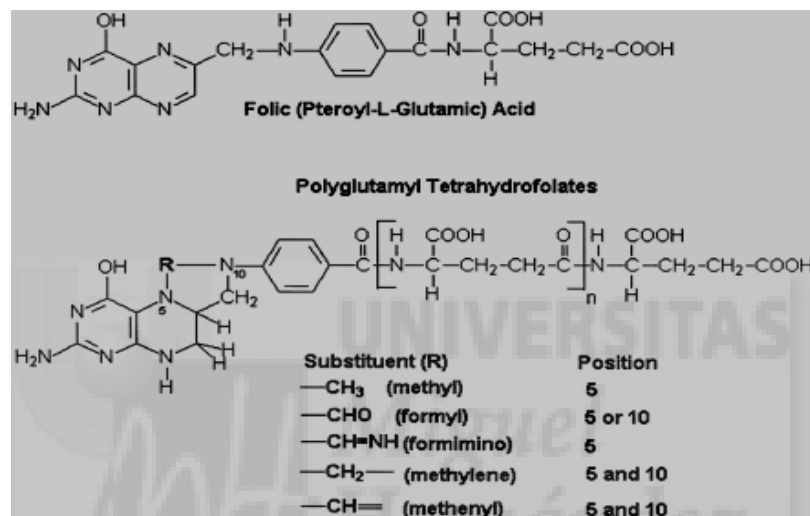


Figura 26.-Fórmula química del ácido fólico, pteroil glutámico

El ácido fólico, folacina o vitamina B9 se considera esencial para la salud humana. En los últimos años han aumentado los estudios relacionados con esta vitamina debido a su relación con el riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares (Boushey et al 1995), determinados tipos de cáncer, como los de: cérvix, pulmón, esófago, páncreas, mama, cerebro y colorrectal (Giovanucci et al 1993, Kim et al 1999) y síndromes del sistema nervioso, (Czeizel et al 1992). Los mamíferos carecemos de la capacidad de sintetizar ácido fólico de novo y por ello debemos tomarlo de la dieta.

Es un hecho conocido que la ingesta inadecuada de folatos provoca anemia megaloblástica y que su carencia durante el embarazo está relacionada con defectos del tubo neural en recién nacidos.

La fuente principal de folatos son las verduras, también están presentes en hígado, frutas y pan. Las recomendaciones diarias para esta vitamina son de 200-400 ug/día, correspondiendo el valor más alto a los periodos periconcepcional , gestación y lactancia. En muchos casos no se llega a ingerir esta cantidad. Hay que tener en cuenta que parte de la vitamina ingerida no es absorbida por el intestino y por tanto no es biodisponible (Melse-Boonstra et al 2004). Además la biodisponibilidad se ve afectada negativamente en casos de trastornos del tracto gastrointestinal.

Los folatos presentes de forma natural en los alimentos son las formas poliglutámicas, que deben ser hidrolizadas hasta monoglutámicas en el intestino. Esta hidrólisis está catalizada por la γ -glutamihidrolasa localizada en el borde en cepillo de la mucosa intestinal y codificada por el gen polimórfico (con variante de actividad reducida) de la carboxipeptidasa II. La actividad de la carboxipeptidasa es dependiente del pH (óptimo 6,5-7,0) y puede ser inhibida por tomate, zumo de naranja y citrato. El alcohol también puede inhibir la absorción de folatos. Esta enzima necesita zinc para ser activa, la biodisponibilidad de los folatos poliglutamatos depende de la cantidad de zinc presente en la dieta (Gregory 1997).

Evidencias epidemiológicas, estudios en animales y en el hombre sugieren que los niveles de folatos modulan el riesgo de desarrollo de tumores en ciertos tejidos y de forma particular los CCR, la depleción de folatos parece aumentar la carcinogénesis mientras que la suplementación por encima de lo que actualmente se consideran requerimientos basales parece proporcionar un efecto protector. Los ensayos clínicos en humanos diseñados para determinar si las personas con un riesgo aumentado de cáncer ven reducido su riesgo por dosis suprafisiológicas se han desarrollado casi exclusivamente con relación a los cánceres de cervix y colorrectal. Los ensayos en cervix han sido inconsistentes (Butterworth et al 1992). Los ocho ensayos randomizados conducidos sobre neoplasias colorrectales han sido muy prometedores (Kim et al 1999).

El folato juega un papel central en la formación de SAM que es el dador universal de grupos metilo, así como también en la formación de purina y timidina necesarias para la síntesis de ADN y ARN. Los mecanismos estudiados hasta la fecha se centran en las alteraciones sobre la metilación de ADN, la alteración de su integridad y en su reparación. Todos ellos afectados como consecuencia de la depleción de folatos.

El folato juega un papel esencial en la transferencia de compuestos monocarbonados implicando la remetilación de homocisteína a metionina, precursor de la S-adenosilmetionina, el dador de grupos metilo primario de la mayor parte de las reacciones biológicas de metilación. La metilación del ADN es un mecanismo epigenético determinante de la expresión génica, mantenimiento de la integridad

y estabilidad del ADN, modificaciones cromosómicas y desarrollo de mutaciones. El conjunto de evidencias de los estudios en animales, en el hombre e in vitro sugieren que los efectos de la deficiencia sobre la metilación del ADN son muy complejas, parecen dependientes del tipo celular, órgano diana y estadio de la transformación y son específicas de ciertos genes y locus. Parece que la secuencia específica de alteraciones en la metilación del ADN en genes críticos relacionados con el cáncer pueda estar mecanísticamente mediada en la carcinogénesis colónica por la deficiencia de folatos.

Cada uno de los tres derivados del THF está asociado a una determinada ruta metabólica de particular importancia para esa forma de la vitamina: el metil THF es necesario para la síntesis de metionina (que es necesaria para la metilación del ADN), el 5,10 metilene THF para la síntesis de timina y el 10 formiltetrahidrofolato para la síntesis de purinas.

La deficiencia de folatos provoca una masiva incorporación de uracilos en el ADN humano (4 millones por célula) y roturas cromosómicas (Blount et al 1997). El mecanismo probable es la deficiente metilación del dUMP a dTMP y la subsiguiente incorporación de uracilos en la doble hélice, durante la reparación de los uracilos se forman muescas en las hebras y dos muescas opuestas en cadenas complementarias podría provocar una rotura a nivel cromosómico.

Tanto los niveles aumentados de uracilos en el ADN como la elevada frecuencia de micronúcleos (una medida de roturas cromosómicas) se revierten tras la administración de folatos. Nagothu et al (2003) describen la atenuación en la pérdida de heterocigosidad en DCC en adenomas colorrectales con ácido fólico. Los resultados proporcionan una fuerte evidencia de que los niveles de folatos pueden ser un elemento determinante de las roturas de las hebras de ADN, provocando inestabilidad genética (Branda et al 1993) e incremento del riesgo frente al cáncer (Solomon et al 1991).

Otra evidencia a tener en cuenta es, el papel que el insuficiente aporte de folatos en el dieta tiene con relación a los mecanismos de reparación de lesiones en el ADN causadas por xenobióticos o endobióticos, como queda reflejado por el odds ratio en aquellos sujetos con genotipo nulo en GSTT1 y homocigotos TT en el gen MTHFR obtenido en nuestro estudio.

La síntesis y el turnover de los niveles celulares de dNTPs está fuertemente acoplada a la síntesis de ADN ya que estos son los sustratos inmediatos para las polimerasas implicadas en la replicación y reparación del ADN. La fidelidad en la síntesis del ADN depende críticamente de un balance correcto y de la disponibilidad de desoxinucleótidos. Los fragmentos monocarbonados derivados de folatos son esenciales para la síntesis de novo de la pirimidina, timina así como también de purinas. En las células de mamíferos la síntesis de novo de timidilato a partir de deoxiuridilato es la etapa

limitante para la síntesis de ADN y requiere 5,10 metilentetrahidrofolato como coenzima (Choi et al 2000).

Cuando el suministro dietario de metilos es insuficiente, como el debido a la depleción de folatos, la participación de las formas coenzimáticas de folatos para las reacciones de metilación compiten con las de síntesis de nucleótidos, comprometiendo por tanto la síntesis de novo (Miller et al 1994).

Folatos y alteración de la metilación del ADN

En el genoma de los vertebrados , aproximadamente un 4% de las citosinas están modificadas postsintéticamente a 5-metilcitosina (5mC), la mayoría se encuentran en secuencias CpG. Las células mantienen estrictamente los patrones de restos metilados y estos patrones se heredan con la mitosis.

Numerosas evidencias muestran que la metilación anómala del ADN desempeña un papel importante en la carcinogénesis. Una metilación disminuida en el genoma es un hallazgo casi universal en la carcinogénesis; se ha observado en cánceres de colon, estómago, cervix, próstata, tiroides y mama (Kim et al 1999). Es un evento temprano que parece preceder a las mutaciones y deleciones que tienen lugar más tarde en la evolución del proceso maligno. La hipometilación genómica también se ha observado en modelos animales de carcinogénesis (Wainfan et al 1989). La hipometilación específica de ciertos genes puede ocurrir incluso en ausencia de hipometilación genómica y quizá sea más importante en la carcinogénesis ya que las teorías prevalentes enfatizan el daño

que tiene lugar en locus específicos . Algo sorprendente es que los patrones de metilación fielmente mantenidos a nivel celular parecen ser susceptibles en ciertas condiciones a perturbaciones creadas por alteraciones en los niveles de folatos dietarios tanto en animales como en el hombre. La inducción de hipometilación genómica en el ADN de linfocitos humanos se ha demostrado en voluntarios humanos sanos sometidos a dietas deficientes en folatos, revirtiéndose este efecto con la suplementación (Jacob et al 1998).

Se ha demostrado que la depleción de folatos induce hipometilación en la región codificante del gen supresor p53, incluso en ausencia de hipometilación genómica, (Kim et al 1997) e inversamente, se ha visto que la suplementación de folatos revierte la hipometilación de esta región en asociación con la carcinogénesis química (Kim 1996). Esta región del gen p53 particularmente susceptible a la hipometilación por depleción de folatos o carcinógenos químicos (exones 5-8) es precisamente la región más frecuentemente mutada en tumores humanos.

Los trabajos de Yebra et al (1995) revelan porqué los cambios en sitios específicos de metilación pueden estar relacionados con una mutación posterior en ese lugar. La 5mC es más inestable que su homóloga no metilada. La desaminación hidrolítica de 5mC lleva a un emparejamiento erróneo G/T y subsiguientemente si no es reparado a una mutación por transición C→T . Ello probablemente explica el porqué lugares de metilación, son puntos calientes frente a mutaciones en muchos tumores humanos.

Paradójicamente los restos de citosina no metilados también pueden sufrir una desaminación para dar lugar a uracilo, de una forma especial bajo condiciones de bajas concentraciones celulares de SAM (deficiencias de folatos) (Shen et al 1992).

La represión transcripcional por hipermetilación de secuencias en promotores también se ha discutido extensamente como mecanismo alternativo en la inactivación de genes supresores de tumores en cáncer, las alteraciones inducidas por metilación en la conformación local de ciertos genes puede hacerlos inaccesibles y transcripcionalmente inactivos. Se ha descrito la hipermetilación entre otros de los promotores de p16, calcitonina y el gen receptor de estrógenos en tejidos neoplásicos. Estudios recientes sugieren que ello es debido a un incremento de la actividad ADNmetiltransferasa en tumores. Paradójicamente una dieta deficiente lipotropa puede inducir hipermetilación en determinadas regiones del genoma. Una hipometilación progresiva exon específica del gen p53 hepático se ha visto en animales alimentados con una dieta deficiente en folatos, B12, metionina y colina seguido por una hipermetilación rebote en un periodo posterior cuando los focos neoplásicos se han evidenciado histológicamente en el hígado (Pogribny et al 1997).

Issa et al (1994) describen por primera vez la metilación de novo de islas CpG en el gen receptor de estrógenos en neoplasias colónicas, incrementando este proceso en relación directa con la edad, lo que conduce a una disminución o supresión de la expresión de este gen y como consecuencia a una marcada supresión del crecimiento.

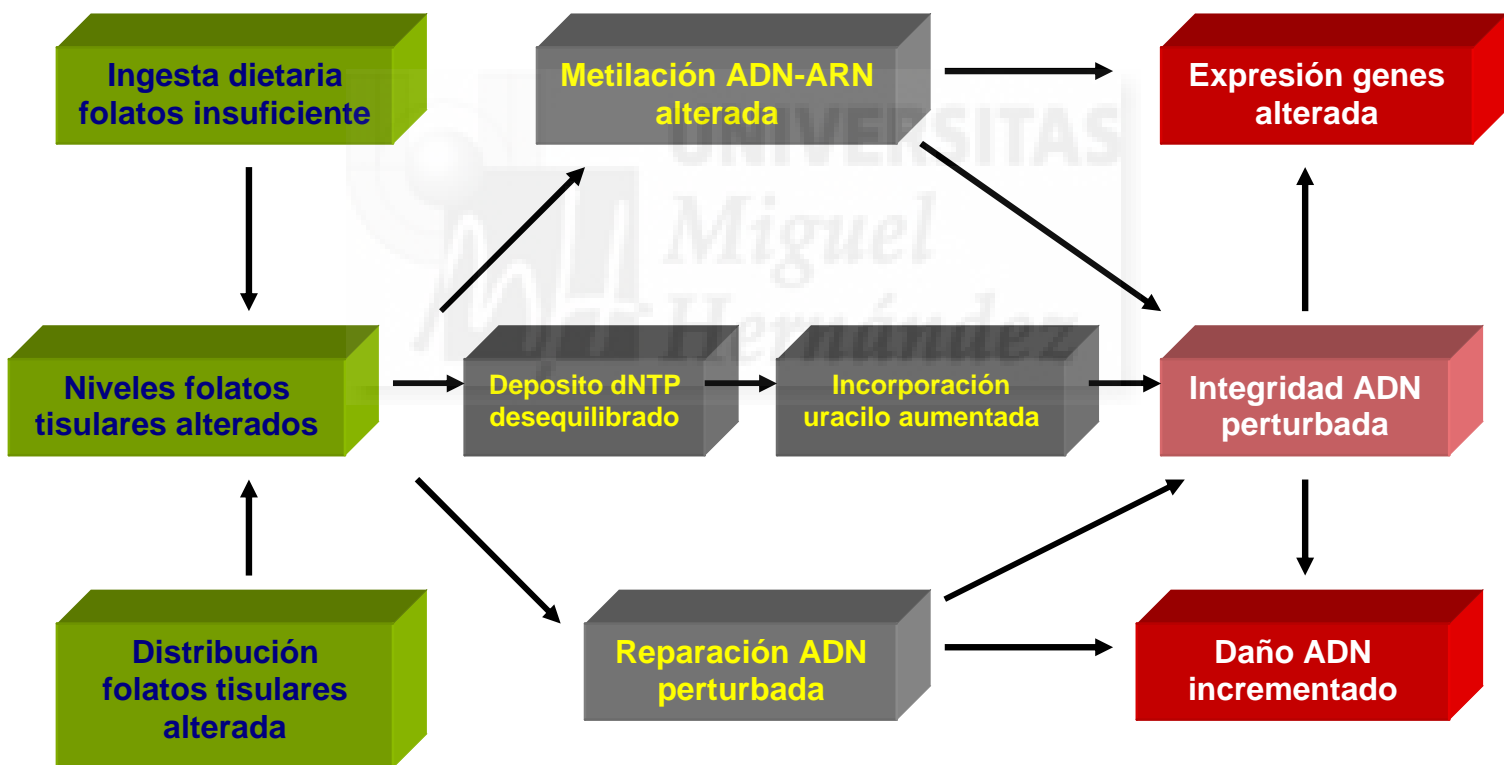


Figura 27.-Efectos moleculares de la depleción de folatos. La alteración de la expresión genética y el incremento en el daño en el ADN se enmarcan en rojo para remarcar el concepto que estas son las dos vías o rutas por las que la carcinógenesis aumenta

5.13.- Discusión de presencia de neoplasia colorrectal por asociación de dos variables.

5.13.1- Discusión de presencia de neoplasia colorrectal por la asociación de dos y tres genotipos de riesgo

Hasta el presente numerosos estudios de casos y controles han identificado asociaciones significativas entre polimorfismos (principalmente en enzimas de detoxificación) y susceptibilidad al cáncer. Aunque pocos con la suficiente fuerza para ser de utilidad clínica. Los odds ratio habituales se encuentran entre 2-3. Por ello, comienzan a estudiarse con interés combinaciones de alelos de riesgo, con la esperanza de identificar haplotipos con el suficiente impacto biológico (>10-15) como para merecer posteriores estudios clínicos. Fryer y Jones (1999) sugieren que el estudio de la interacciones entre genotipos de riesgo debe basarse en asociaciones con un sentido biológico. Así, son clásicas las investigaciones con la visión de las enzimas que intervienen en las fases I y II de metabolización, con especificidades de sustrato solapantes o las que detoxifican moléculas que proceden del mismo agente causal (nitrosaminas e hidrocarburos policíclicos aromáticos y tabaco).

En lo relativo al CCR, los estudios que analizan los efectos de más de un genotipo, son escasos. La mayoría como se reflejan en la **tabla LX** se centran en el estudio de dos genes de detoxificación como ***GSTM1/GSTT1/GSTP1*** y ***NAT1/2***, con odds ratios no significativos de asociación, a excepción de los trabajos de Lang et

al (1994) que estudian polimorfismos en un gen de activación y uno de detoxificación (**CYP1A2-NAT2**) y Welfare et al (1999) con dos genes de detoxificación (**GSTT1-NAT2**). Sólo hay un trabajo, el de Kiss et al (2000) que se estudia la acción de polimorfismos en tres genes, dos de activación y uno de detoxificación **CYP1A1/CYP2E1/GSTM1**, que también se refleja en la **tabla LIII**.

Tabla LIII.- Asociación de polimorfismos en diferentes genes				
GEN	GEN	ODDS	IC 95%	
<i>CYP1A2</i>	<i>NAT2</i>	2.77	1.54-5.06	Lang 1994
<i>GSTT1</i>	<i>NAT2</i>	2.33	1.15-4.72	Welfare 1999
<i>CYP1A1</i>	<i>GSTM1</i>	NA	No Asociación	Marchand 1999
<i>GSTM1</i>	<i>NAT 1</i>	NA		Inoue 2000
<i>GSTM1</i>	<i>NAT 2</i>	NA		Slattery 1998
<i>GSTP1</i>	<i>NAT 1</i>	NA		Yoshioka 1999
<i>GSTT1</i>	<i>NAT 1</i>	NA		Yoshioka 1999
<i>GSTM1</i>	<i>L-myc</i>	NA		Chevenix-Trench 1995
<i>HFE</i>	<i>TFR</i>	NA		Beckman 1999
<i>CYP1A1</i>	<i>CYP2E1</i>	<i>GSTM1</i>	4.62 1.29-16.54	Kiss 2000

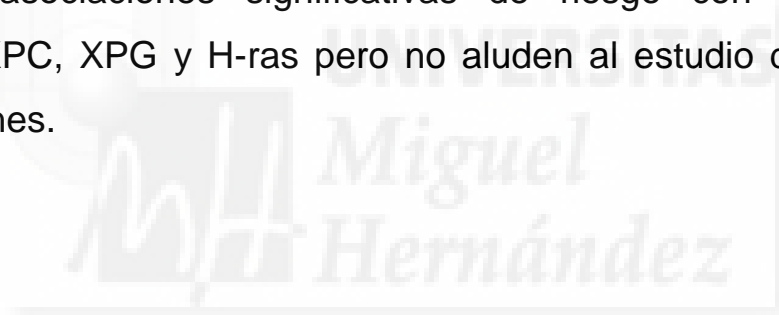
En nuestro estudio, hemos realizado una contribución preliminar significativa al estudiar las interacciones entre polimorfismos no sólo en genes de activación (*CYP1A1*2* y *CYP1A1*3*) y detoxificación *GSTM1* y *GSTT1* sino que, además, hemos investigados sus posibles interacciones con el polimorfismo C677T de *MTHFR*, clave en los mecanismos de síntesis, reparación y metilación del ADN, mecanismos todos ellos de importancia en la carcinogénesis colónica y de otros órganos.

Pensamos a la hora de realizar el diseño experimental que presumiblemente aquellos sujetos con capacidades aumentadas de activación de metabolitos con potencial carcinogénico o mermadas de eliminación de los mismos, con unos niveles previsiblemente aumentados de aductos-ADN requerirían unos sistemas eficaces de reparación y síntesis de nucleótidos y que en aquellos sujetos que no cumplieran esta premisa tendrían un mayor riesgo biológico en base a su genotipo. Esta premisa que nos movió a abordar el estudio del polimorfismo C677T de MTHFR, junto a los de GSTM1, GSTT1 y CYP1A1, se confirma en nuestra serie a la vista de los resultados obtenidos tabla **XLVII**.

Quizás esta interacción en la carcinogénesis colorrectal debe producirse también entre *MTHFR* y otros polimorfismos de riesgo en genes de detoxificación, como por ejemplo NAT-2 o UGT1A7, SULT, OGG1, MYH, etc variando su significado según el tipo de sustancia carcinogénica a la que esté expuesto el sujeto o la población.

El efecto biológico posiblemente sea mayor en aquellos órganos con una mitosis activa per se como el epitelio colónico, piel, tejido hematopoyético o en aquellas situaciones en que el daño producido requiera una activa síntesis tisular, también cabría esperar un efecto significativo en aquellos tejidos, como el nervioso, en el que la escasa o no división celular como mecanismo homeostático de eliminación de células dañadas requiera un perfecto funcionamiento de los mecanismos de reparación del ADN, síntesis nucleotídica e integridad genómica.

En dos trabajos recientes, se estudian estos genotipos de riesgo en GSTT1 y MTHFR. En el de Balta et al (2003) sobre población pediátrica turca, investigando polimorfismos en MTHFR, GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP1A1. La asociación entre ellos y el riesgo frente a la leucemia aguda linfoblástica y no linfoblástica tan sólo encuentra asociación entre el genotipo nulo GSTT1 y CYP1A1. En el de Sanyal et al (2004) con población sueca, estudiando con relación al cáncer de vejiga, polimorfismos en los genes XPC, XPD, XPG, XRCC1, XRCC3, NBS1, MTHFR, NQO1, H-ras, GSTT1, reportan asociaciones significativas de riesgo con relación a GSTT1, XPC, XPG y H-ras pero no aluden al estudio de posibles asociaciones.



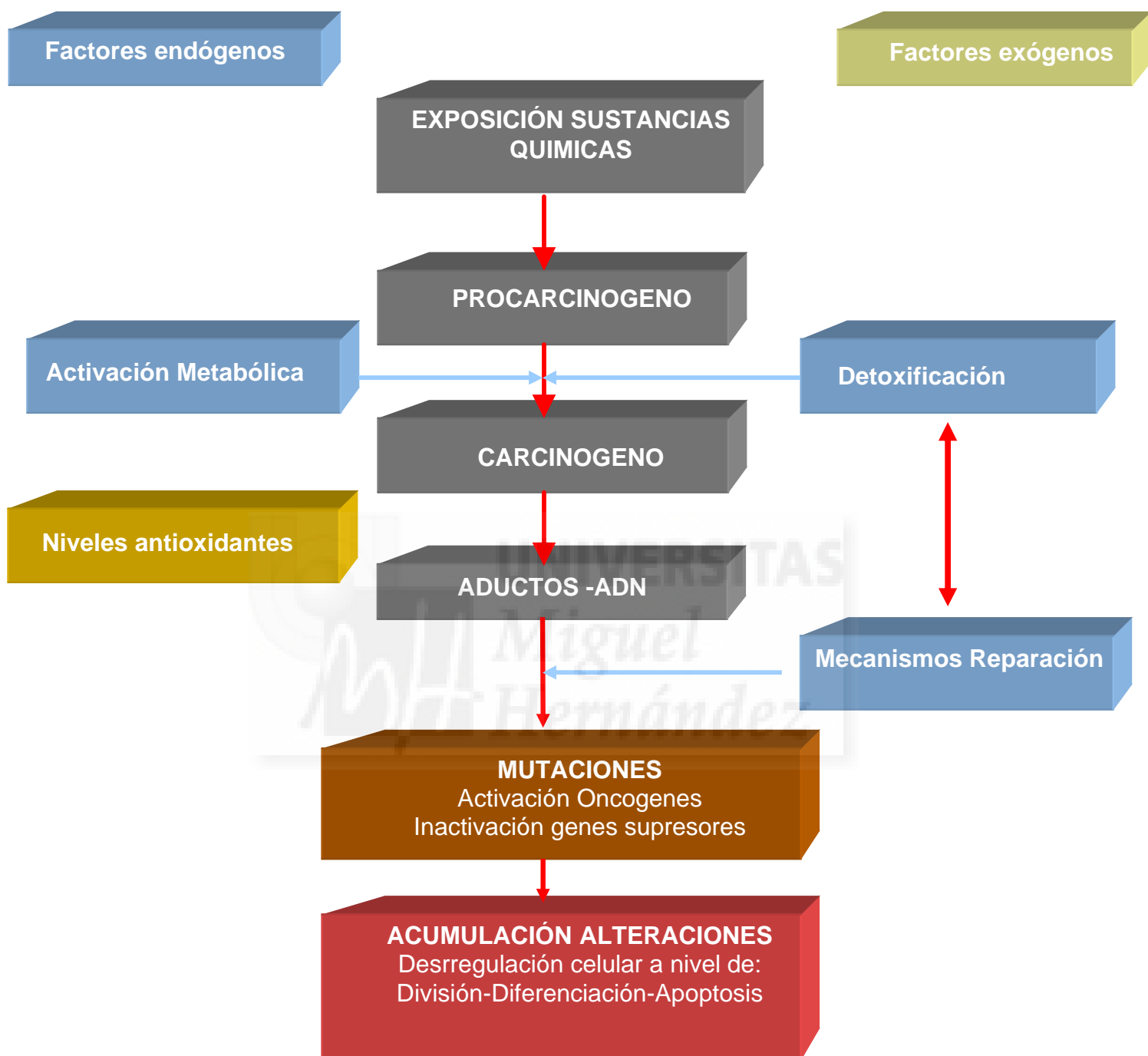


Figura 27.- Eventos en la carcinogénesis, actuación de factores endógenos y exógenos (WCRF-AICR 1997) modificada.

5.13.2.- Discusión de presencia de neoplasia colorrectal por asociación entre un genotipo de riesgo y una variable de riesgo epidemiológico

En nuestra serie, no se ha encontrado correlación estadísticamente significativa entre ingesta alcohólica y tumores colorrectales, ni siquiera en aquellos individuos con genotipo MTHFR*2, ni en los genotipos nulos GSTM1*0 y GSTT1*0, P entre 0.1 y 0.7. Aunque como ya comentamos, la población de bebedores severos y moderados es pequeña.

Sería interesante el estudio de los polimorfismos en ALDH2 directamente implicados en la metabolización del etanol. Este gen ALDH2 codifica una enzima mitocondrial responsable de la oxidación del acetaldehído generado en la metabolización del etanol. El acetaldehído induce citotoxicidad (Wickramasinghe et al 1986) y daño en el ADN (Fang et al 1995). Un polimorfismo en el codon 487 disminuye la actividad de la enzima (Bosron et al 1986), aunque al parecer sólo es prevalente en asiáticos. Los estudios sobre este polimorfismo revelan un incremento del riesgo frente al CCR tanto en heterocigotos como homocigotos portadores del alelo de riesgo (Yokoyama et al 1998).

Tampoco encontramos asociación significativa entre hábito tabáquico y genotipos de riesgo, siendo el valor de P más bajo el de **GSTT1*0 P=0.24**, aunque la muestra de fumadores es pequeña tanto en los casos **8** (4 de +20 cig/día), como en los controles **25**

(7 de + 20 cig/día). Phillips et al (2004) describen diferencias significativas en los niveles de aductos-ADN en el epitelio anal de fumadores frente a no fumadores. Slattery et al (2000) encuentran asociaciones significativas entre fumadores de mas de 20 cig/día y tumores colorrectales con inestabilidad en microsatélites tanto en hombres 1,6 como en mujeres 2,2.

El índice de masa corporal no se asocia a riesgo en nuestra serie, tampoco el valor de P es significativo al analizar el IMC en los portadores del genotipo MTHFR*2.

5.14.- Discusión Odds ratio en función de los grupos de edad de genotipos de riesgo aisladamente o por combinación.

La edad es el principal factor de riesgo en la aparición de neoplasias esporádicas; las colorrectales no son una excepción, Las bases celulares y moleculares subyacentes al envejecimiento patológico son poco conocidas e investigadas.

El único trabajo encontrado con relación a la edad y genotipos de riesgo es el de Pesch et al (2004), que estudiando polimorfismos en los genes *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* y *CYP1B1* en octogenarios con cáncer y sin él, encuentran valores positivos de asociación para ***GSTT1* nulo**, con una frecuencia en octogenarios sanos de 0.12 versus 0.27 en octogenarios con cáncer, odds ratio **2,81** (IC 95% 1.00-7.38) inferior al valor de nuestra serie.

En el resto de trabajos revisados no se estudia en aquellos polimorfismos asociados significativamente con riesgo, el efecto de la edad. Estimamos que este tipo de estudios de asociación por grupos de edad debería hacerse sistemáticamente a la vista de los resultados obtenidos en nuestra serie.

Los mecanismos que en el hombre o en animales relacionan a nivel molecular el proceso del envejecimiento con la carcinogénesis colónica los podemos agrupar en los siguientes grupos:

A.- Mecanismos epigenéticos: Variaciones de los patrones de metilación a nivel genómico, hipometilación y metilación de promotores de genes supresores con supresión de la expresión.

B.- Mecanismos de reparación genómica: Fallos en los mecanismos de reparación del ADN, tanto de los errores de replicación, como de las mutaciones nucleares y mitocondriales que se van acumulando a lo largo de la vida como consecuencia de la acción de agentes endógenos y exógenos.

C.- Disfunciones teloméricas. En células humanas en cultivo, unos niveles insuficientes de telomerasa conducen a la pérdida gradual de estos extremos cromosómicos; situación que posiblemente se da in vivo durante el envejecimiento y la tumorigénesis colorrectal, como reseñan Hastie et al (1990) y Chadeneau et al (1995). La relación telómeros-carcinoma parece relevante con relación al espectro de tumores epiteliales en el adulto y las alteraciones citogenéticas (DePinho et al 2000).

D.- Acumulación de mutaciones somáticas nucleares y mitocondriales El ADN mitocondrial es especialmente susceptible al daño químico por compuestos que intervienen en la carcinogénesis colónica como hidrocarburos policíclicos aromáticos (Allen et al 1980), nitrosaminas (Takayama et al 1969), estos carcinógenos lipofílicos se acumulan en las membranas internas y externas mitocondriales y pueden provocar un elevado número de mutaciones en el mtADN. Sabemos por ejemplo que el carcinógeno benzo(a)pireno se une covalentemente y modifica al mtADN más que al ADN nuclear (Backer et al 1980).

Polyak et al (1998), describen la acumulación de mutaciones somáticas mitocondriales en el 70% de las líneas celulares tumorales colorrectales, la mayoría transiciones en purinas, ligadas directamente con el daño producido por especies reactivas de oxígeno (ROS). Taylor et al (2003) revelan la acumulación de mutaciones mtADN en las células madres de las criptas colónicas humanas, con una tasa de mutaciones de 5×10^{-5} /genoma/día sustancialmente mayor que la nuclear, 6×10^{-11} mutaciones. Aunque no existe la certidumbre de si estas mutaciones en el mtADN y los defectos bioquímicos asociados están implicados en el desarrollo tumoral, hay precedentes de que defectos en el metabolismo oxidativo causado por mutaciones nucleares pueden dar lugar al desarrollo de tumores (Neumann et al 2002 y Tomlinson et al 2002).

Con relación a los folatos, estudios en ratas revelan alteraciones en su metabolismo con el envejecimiento, su contenido a nivel hepático

disminuye en un un 50%, disminuyendo también significativamente el ratio s-adenosilmetionina / adenosylhomocisteina y aumentando la longitud de la cadena de glutamatos, (Varela-Moreiras 1994).

En ratas wistar alimentadas durante 4 semanas con dietas deplecionadas en folatos, no se observó disminución en los niveles de los dos antioxidantes hepáticos mayoritarios, el glutatión reducido y el tocoferol, pero sí provocó una disminución en las actividades de la superóxido dismutasa Cu-Zn y peroxidasa (Huang 2001). SOD2 es un gen clave en los mecanismos de lucha contra el estrés oxidativo y está muy regulado entre otros mecanismos por metilación.

Choi et al (2003) estudian en ratas Sprague-Dawley, los efectos de la edad a nivel de mucosa colónica de dietas con diferentes contenidos de ácido fólico (0-4,5-18 $\mu\text{mol/Kg}$). Valoran la distribución de los diferentes metabolitos, la incorporación de uracilos y los niveles de metilación genómica en ratas amantadas y de 1 año. Comunican que en estas últimas la concentración de folato es de un 30-45% inferior (dietas 0-4,5 $\mu\text{mol/Kg}$) con respecto a las jóvenes; en las mayores con estas mismas dietas se incorporó un 50% más de uracilo en el ADN.

En el hombre adulto es frecuente una ingesta insuficiente de folatos, la atrofia gástrica frecuente con el envejecimiento conlleva una disminución de la secreción gástrica y de pepsinógeno y por tanto una disminución en la digestión y absorción intestinal de folatos y vitamina B12 (Wolters et al 2004).

La recuperación de los niveles hemáticos de folatos como consecuencia de la ingesta de dietas ricas (200-425 ug/día) durante 7 semanas, tras un periodo de 7 semanas con ingestas reducidas (118 ug/día) se enlentece en mujeres de edad (60-85) como señalan Rampersaud et al (2000) que emplean como indicador los niveles de metilación en el ADN. Kauwell et al (2000) en una experiencia en humanos similar buscando los niveles de suplementación adecuados, señalan que la normalización en los niveles de folatos sólo se consigue con las ingestas mayores (415 ug/día) en forma de dieta más ácido fólico o con éste más zumo de naranja, Kauwell et al (2000) miden en su estudio los niveles de folatos séricos, folatos en hematíes y concentraciones de homocisteína en plasma.

Parece a la vista de las evidencias expuestas que los valores incrementados de la asociación de los genotipos de riesgo **GSTT1*0 y MTHFR*2** en el grupo de >65 años con relación al de 44-64 años puede estar relacionado con unos niveles de folatos insuficientes para poder reparar con eficacia el daño en los ácidos nucleicos producidos por carcinógenos. Estos niveles inferiores pueden ser debidos a una menor ingesta, cambios fisiológicos en la mucosa intestinal asociados con la edad o factores genéticos determinantes del proceso de absorción.

5.15.- Técnicas analíticas

Las técnicas analíticas de biología molecular empleadas PCR-RFLP-ASO, permiten una vez puestas a punto, con controles de

amplificación y digestión, procesar un gran número de muestras. Son susceptibles de aplicación con un reducido número de casos y son lo suficientemente rápidas como para permitir dentro de un entorno clínico su utilización rutinaria. Los aparatos empleados: termociclador convencional, fuente de alimentación y cubetas de electroforesis son de bajo coste y el aprendizaje de las técnicas no es difícil. Las técnicas descritas por otros autores en sus trabajos son las mismas que nosotros hemos empleado.

Empiezan a aparecer en las publicaciones los primeros trabajos con otras técnicas de biología molecular que permiten el análisis simultáneo de un mayor número de polimorfismos como los arrays de ADN (Landi et al 2003), pirosecuenciado y MALDI-TOF con una gran capacidad de procesamiento de muestras, con mayor coste por genotipo, mayores inversiones en equipamiento y mayores requerimientos de optimización (Zak et al 2002). Una alternativa que estimamos de gran desarrollo clínico es la PCR en tiempo real que reduce considerablemente el tiempo en la obtención de resultados (1-2 horas), tiene gran capacidad de procesamiento de muestras y admite el multiplexado de las mismas.

Desde el punto de vista de técnicas analíticas de las 1150 determinaciones moleculares correspondientes a los 5 polimorfismos de los 4 genes analizados, tan sólo no fue posible obtener resultados en 5 determinaciones, siendo un **0,4%** el porcentaje de fallos analíticos presumiblemente debidos a la muestra.

5.16.- Diseño del estudio

Un planteamiento que realizamos en el diseño experimental fue la cuestión de la importancia del emparejamiento de las poblaciones con relación a la edad y género y la elección del tipo de población control (pacientes hospitalarios versus población general sana) al objeto de evitar sesgos. Nuestra decisión se apoyó en el trabajo de Garte et al (2001) en el que utilizando la base de datos del **Proyecto Internacional sobre Susceptibilidad Genética a Carcinógenos ambientales (GSEC)** que recoge información de 15.000 controles (12.525 caucásicos) con frecuencias alélicas en CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6, GSTM1, GSTT1, NAT2, GSTP Y EPHX, no encuentran diferencias en las frecuencias alélicas en razón del sexo, edad y tipo de controles. No emparejando por ello la población de casos y controles por edad y género.

La homogeneidad en la constitución genética de la población de casos y controles se garantizó excluyendo individuos de origen étnico distinto al caucásico. Y la homogeneidad en cuanto a la exposición a factores de riesgo ambientales por la pertenencia a la misma área geográfica.

6.-CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo parecen validar la hipótesis de partida ya que el análisis de ciertos polimorfismos en genes que intervienen en la carcinogénesis nos puede permitir determinar qué personas tienen un riesgo aumentado de padecer una neoplasia colorrectal.

Como resumen del trabajado realizado podemos establecer las siguientes conclusiones:

1ª.- El genotipo ***GSTM1*1*** parece conferir riesgo significativo frente al cáncer colorrectal en la población estudiada.

2ª.- El genotipo ***GSTT1*0*** confiere riesgo significativo frente al cáncer colorrectal en la población estudiada.

3ª.- Los genotipos ***CYP1A1*2*** y ***CYP1A1*3*** no se asocian significativamente a riesgo frente al cáncer colorrectal en nuestra serie.

4ª.- El genotipo ***MTHFR*2*** se asocia significativamente a riesgo frente al cáncer colorrectal en la población estudiada.

5ª.- Las interacciones entre los polimorfismos de riesgo ***GSTM1*1 + GSTT1*0***, ***GSTM1*1 + MTHFR*2***, ***GSTT1*0 + MTHFR*2*** y por último ***GSTM1*1 + GSTT1*0 + MTHFR*2*** si se asocian significativamente a riesgo en el grupo de > 65 años y ***GSTT1*0+MTHFR*2*** y ***GSTM1*1+GSTT1*0 + MTHFR*2*** también se asocian significativamente a riesgo en el grupo de edad de 45-64 años.

6ª.- No parece existir una asociación significativa entre los genotipos estudiados ***GSTM1*0***, ***GSTT1*0*** y ***MTHFR*2*** y los factores relacionados con el tumor : localización, estadio tumoral y tipo histológico.

7ª.- No apreciamos una asociación significativa entre los genotipos ***GSTM1*1***, ***GSTT1*0***, ***CYP1A1*2***, ***CYP1A1*3*** y ***MTHFR*2*** y los factores relacionados con el paciente: hábito tabáquico, ingesta alcohólica y obesidad.