



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
UNIDAD ACADÉMICA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
UNIDAD ACADÉMICA FACULTAD DE MEDICINA

**“POLIMORFISMOS C677T Y A1298C DE LA  
METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA Y  
RIESGO DE LESIÓN ESCAMOSA INTRAEPITELIAL Y  
CÁNCER CERVICOUTERINO”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :  
VERÓNICA ANTONIO VÉJAR

DIRECTORA DE TESIS: DRA. BERENICE ILLADES AGUIAR.

CHILPANCINGO, GRO., NOVIEMBRE DE 2004.

**“Polimorfismos C677T y A1298C de la metilentetrahidrofolato reductasa y riesgo de lesión escamosa intraepitelial y cáncer cervicouterino”**

---

**Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.**

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco especialmente a mi directora de tesis y tutora, Dra. Berenice Illades Aguiar todo el apoyo que me ha dado, el tiempo que ha dedicado a mi formación profesional, las palabras de aliento que ha tenido para mí siempre que las he necesitado y desde luego la forma en la que me guió durante la realización de este trabajo.

Agradezco también a mis asesores, Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez, Dr. Saúl López Silva, MSP. Eugenia Flores Alfaro, MSP. Eduardo Martínez Sandoval y Dr. Alejandro García Carrancá, por sus valiosas aportaciones y sugerencias a este trabajo y por el tiempo invertido en la revisión del mismo.

---

*Para mis padres con el cariño de siempre...*

---

## CONTENIDO

	<i>Página</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>i</i>
<i>Indice de cuadros</i>	<i>ii</i>
<i>Indice de figuras</i>	<i>iii</i>
<i>Resumen</i>	<i>iv</i>
<i>Abstract</i>	<i>v</i>
I. INTRODUCCION	1
II. MATERIAL Y METODOS	5
III. RESULTADOS	8
IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES	18
V. REFERENCIAS	21

---

## ABREVIATURAS

<b>CaCu</b>	Cáncer cervicouterino
<b>DNA</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>FAD</b>	Flavin adenin dinucleótido
<b>FRA3B</b>	Sitio frágil 3B
<b>IVS</b>	Inicio de la vida sexual
<b>LEI</b>	Lesión escamosa intraepitelial
<b>LEIAG</b>	Lesión escamosa intraepitelial de alto grado
<b>LEIBG</b>	Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado
<b>5-10-metilenTHF</b>	5-10-metilentetrahidrofolato
<b>5-metilTHF</b>	5-metiltetrahidrofolato
<b>MTHFR</b>	Metilentetrahidrofolato reductasa
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RFLPs</b>	Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción
<b>RM</b>	Razón de momios
<b>RNA</b>	Acido ribonucleico
<b>SAM</b>	S-adenosil metionina
<b>VPH</b>	Virus del papiloma humano

## INDICE DE CUADROS

	<i>Página</i>
<b>Cuadro 1.</b> Características generales de los casos de LEIBG, LEIAG y CaCu y controles captados en el Instituto Estatal de Cancerología y en el servicio de detección oportuna de CaCu de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas.	9
<b>Cuadro 2.</b> Descripción de casos y controles y factores asociados a lesión escamosa intraepitelial de bajo grado, lesión escamosa intraepitelial de alto grado y cáncer cervicouterino.	10
<b>Cuadro 3.</b> Frecuencias de los polimorfismos C677T y A1298C <i>MTHFR</i> en casos de lesión escamosa intraepitelial, cáncer cervicouterino y controles.	13
<b>Cuadro 4.</b> Distribución de los genotipos C677T y A1298C <i>MTHFR</i> y frecuencias alélicas en casos de lesión escamosa intraepitelial, cáncer cervicouterino y controles.	14
<b>Cuadro 5.</b> Asociación de los genotipos C677T y A1298C <i>MTHFR</i> con lesión escamosa intraepitelial de bajo grado, lesión escamosa intraepitelial de alto grado y cáncer cervicouterino.	15
<b>Cuadro 6.</b> Asociación de los genotipos C677T y A1298C <i>MTHFR</i> con el riesgo de lesión escamosa intraepitelial y cáncer cervicouterino.	16
<b>Cuadro 7.</b> Interacción de los genotipos C677T y A1298C <i>MTHFR</i> y asociación con lesión intraepitelial escamosa.	17
<b>Cuadro 8.</b> Interacción de los genotipos C677T y A1298C <i>MTHFR</i> y asociación con cáncer cervicouterino.	17



## INDICE DE FIGURAS

		<i>Página</i>
<b>Figura 1.</b>	Polimorfismo C677T <i>MTHFR</i> .	11
<b>Figura 2.</b>	Polimorfismo A1298C <i>MTHFR</i> .	12

## RESUMEN

**OBJETIVO.** Examinar los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* como potenciales marcadores genéticos de susceptibilidad para lesión escamosa intraepitelial (LEI) y cáncer cervicouterino (CaCu). **METODOLOGÍA.** Se hizo un estudio de casos y controles de base no poblacional que incluyó 325 especímenes cervicales de mujeres del estado de Guerrero, México, 50 con diagnóstico histopatológico de lesión escamosa intraepitelial de bajo grado, 29 de alto grado, 50 de CaCu y 196 con citología cervicovaginal normal. La detección y genotipificación de los polimorfismos *MTHFR* se hizo por PCR-RFLPs. Se obtuvieron proporciones, RM no ajustada e IC<sub>95%</sub> y por regresión logística no condicional se obtuvieron RM ajustada, IC<sub>95%</sub>, valores de *P* e interacciones. **RESULTADOS.** El genotipo homocigoto mutante 1298CC se asoció significativamente con LEI (RM ajustada, 17.2; IC<sub>95%</sub>, 1.0-308.3), pero no los genotipos variantes 677CT y 677TT *MTHFR*. Los genotipos heterocigotos 677CT y 1298AC *MTHFR* se asociaron con CaCu (RM ajustada, 2.2; IC<sub>95%</sub>, 0.7-7.1 y RM ajustada 1.4; IC<sub>95%</sub> 0.5-3.7, respectivamente), aunque estas asociaciones no alcanzaron el nivel convencional de 95% de confianza. El haplotipo 677CC/1298CC se asoció significativamente con LEI (RM ajustada 20.9, IC<sub>95%</sub> 1.0-442.0) y 677TT/1298AC se asoció con CaCu (RM 3.7, IC<sub>95%</sub> 0.1-138.3), aunque sin significancia estadística al nivel convencional de 95% de confianza. **CONCLUSIONES.** Estos resultados sugieren que las mujeres con genotipos variantes C677T o A1298C *MTHFR* tienen alto riesgo de LEI y CaCu, por lo que estas mutaciones podrían ser marcadores genéticos de susceptibilidad importantes en la identificación de mujeres en riesgo de desarrollo de LEI y progresión a CaCu.

## ABSTRACT

**OBJECTIVE.** Examine the polymorphisms C677T and A1298C of the *MTHFR* gene as potential genetic markers of susceptibility to squamous intraepithelial lesion (SIL) and cervical cancer. **METHODOLOGY.** A case and control study of a non population base was performed. It included 325 cervical specimens from women of the State of Guerrero, Mexico, 50 with histopathologic diagnostic of low grade SIL, 29 of high grade SIL, 50 of cervical cancer and 196 with normal cervicovaginal cytology. The detection and genotypification of the *MTHFR* polymorphisms was done by PCR-RFLPs. Proportions were obtained, non adjusted OR and CI<sub>95%</sub> and by non conditional logistic regression the adjusted OR, CI<sub>95%</sub> values of *P* and interactions were calculated. **RESULTS.** The homozygous mutant genotype 1298CC was associated significantly to SIL (adjusted OR, 17.2; CI<sub>95%</sub>, 1.0-308.3), unlike the variant genotypes 677CT and 677TT *MTHFR* which were not. The heterozygous genotypes 677CT and 1298AC *MTHFR* were associated with cervical cancer (adjusted OR, 2.2; CI<sub>95%</sub>, 0.7-7.1 and adjusted OR 1.4; CI<sub>95%</sub> 0.5-3.7, respectively), even though these associations did not reach the conventional level of 95% confidence. The haplotype 677CC/1298AC was associated significantly to SIL (adjusted OR 20.9, CI<sub>95%</sub> 1.0-442.0) and 677TT/1298AC was associated with cervical cancer (adjusted OR 3.7, CI<sub>95%</sub> 0.1-138.3), but without statistical significance at the conventional level of 95% confidence. **CONCLUSIONS.** These results suggest that women with variant genotypes C677T or A1298C *MTHFR* have high risk of SIL and cervical cancer, so these mutations could be used as important genetic markers of susceptibility in the identification of women with risk of developing SIL and subsequent progression into cervical cancer.

## I. INTRODUCCION

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el segundo cáncer más común en la mujer a nivel mundial y es el principal cáncer de la mujer en la mayoría de los países en desarrollo, <sup>1,2,3</sup> donde ocurre el 80% de los casos.<sup>1</sup> Las tasas de incidencia más altas se han observado en América Latina, India y África.<sup>4</sup> En América Latina se registran más de 30,000 muertes anuales y en México más de 4,000 por CaCu.<sup>5</sup> El virus del papiloma humano (VPH) es la principal causa de displasia y CaCu, particularmente los genotipos 16, 18, 31 y 35. Se ha sugerido que el VPH genital subclínico puede infectar a casi la mitad de las mujeres jóvenes sexualmente activas<sup>3</sup> y en cáncer cervical se ha determinado una prevalencia de infección de 99.7%, indicando que el VPH es una causa necesaria para el desarrollo de la enfermedad,<sup>6</sup> sin embargo, la variación interindividual en el riesgo de cáncer entre las mujeres infectadas, indica que la infección viral por si sola no es suficiente para causar la enfermedad.<sup>3</sup>

Un aspecto importante en la etiología del CaCu ha sido el posible papel protector del folato, una de las vitaminas B cuyas fuentes principales son las frutas y los vegetales.<sup>7,8</sup> La razón de la posible protección del folato contra el CaCu se basa en su papel en la síntesis, la metilación y la reparación del DNA. La metilación influye en la estabilidad y la expresión genética.<sup>7</sup>

El metabolismo del folato es requerido para la biosíntesis de los nucleótidos adenilato, guanilato, y timidilato. La fidelidad y eficiencia de la síntesis y reparación del DNA dependen de la disponibilidad y el balance de estos. En los mamíferos, la síntesis *de novo* de timidilato desde deoxiuridilato es un paso limitante para la síntesis de DNA y requiere folato en la forma de 5-10 metilentetrahydrofolato (5,10-metilenTHF) como una coenzima. La deficiencia de folato limita la síntesis de timidilato desde deoxiuridilato, lo que origina la incorporación de uracilo en el DNA. Las muescas transitorias formadas durante la escisión del uracilo en el DNA y la subsecuente reparación pueden causar el rompimiento de la cadena de DNA y alteraciones que llevan a daño cromosómico y a la posible carcinogénesis.<sup>8,9,10,11,12</sup>

Se han observado rompimientos cromosomales en sitios frágiles constitutivos en cultivos celulares humanos deficientes de timidina. El sitio frágil FRA3B, el más sensible al estrés por folato, coincide con el sitio de integración del VPH-16 en carcinomas cervicales primarios. Así, los sitios frágiles comunes en presencia de metabolismo del folato ineficiente, podrían proporcionar blancos para la integración del VPH, un paso esencial en la carcinogénesis viral.<sup>7,9</sup>

El metabolismo del folato ineficiente podría también limitar la producción de S-

adenosilmetionina (SAM).<sup>9, 8</sup> El 5-metil-tetrahidrofolato (5-metilTHF) sirve como un donador de metilo en la remetilación de homocisteína a metionina, la cual es convertida a SAM. La SAM dona su grupo metilo en numerosas reacciones enzimáticas que metilan citosinas específicas en el DNA y el RNA. La metilación alterada del DNA juega un papel integral en la carcinogénesis, la hipometilación está asociada con la activación de protooncogenes por un proceso global o gen-específico y la hipermetilación con la pérdida de la función de los genes supresores de tumor.<sup>3,9,13,14</sup> La hipometilación global del DNA se ha encontrado incrementada progresivamente en displasia y cáncer cervical.<sup>9</sup>

La metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es una de las enzimas críticas reguladoras del metabolismo del folato y la metionina.<sup>3, 15, 16</sup> El gen *MTHFR* se localiza en el cromosoma 1 en la región 1p36.3 y el DNA complementario es de 2.2 kilobases de largo y consta de 11 exones. La MTHFR es una flavoproteína catalíticamente activa de 656 aminoácidos y consta de dos subunidades idénticas de aproximadamente 70 kDa con determinantes para la unión de flavin adenin dinucleótido (FAD), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y 5-10-metilenTHF localizadas en la unión N-terminal. El dominio C-terminal regula la actividad de la enzima en respuesta a la demanda de SAM y contiene el sitio de unión para este inhibidor alostérico.<sup>16</sup>

La MTHFR cataliza la reducción biológicamente irreversible del 5,10-metilenTHF a 5-metilTHF.<sup>16, 17, 18</sup> Las células sintetizan MTHFR bajo condiciones de relativa escasez de 5-metilTHF.<sup>19</sup> La actividad normal de la MTHFR puede ayudar a mantener el pool del folato circulante y la metionina y posiblemente previene un aumento de homocisteína.<sup>16</sup>

La MTHFR es altamente polimórfica en la población general,<sup>3</sup> catorce mutaciones raras han sido descritas, las cuales están asociadas con deficiencia enzimática severa y homocisteinuria.<sup>20</sup> Los polimorfismos más comunes son el C677T y A1298C y están asociados con una incrementada termolabilidad y actividad específica de la enzima significativamente disminuida.<sup>13,14,21</sup>

El alelo C677T presenta una transición en la posición 677 en el exón 4 del gen *MTHFR* que cambia una citosina (C) por una timina (T); esta mutación es autosómica recesiva y resulta en la substitución de una alanina por una valina (A222V) en la enzima.<sup>15,16,17,18</sup> Este alelo es comúnmente llamado “termolábil” ya que la actividad de la enzima codificada es reducida a 37°C, y a 46°C es aproximadamente 65% más baja.<sup>11, 16, 20</sup>

Los individuos con el genotipo variante 677TT tienen cerca del 30% de la actividad de la MTHFR *in vitro* y niveles significativamente elevados de homocisteína, lo que indica disminución en la remetilación de homocisteína a metionina en el plasma y en la metilación del DNA genómico,

particularmente cuando la ingesta de folato es inadecuada,<sup>11,16,19,20,21</sup> mientras los heterocigotos (677CT) tienen cerca del 65% de actividad enzimática normal.<sup>13,14</sup>

Los estudios con una forma mutante análoga de la MTHFR de un sistema de expresión bacteriano sugieren que la forma termolábil de la MTHFR libera más fácilmente su coenzima (FAD) que la forma silvestre.<sup>22</sup>

Se ha observado variación en la frecuencia del polimorfismo C677T de la MTHFR entre razas y grupos étnicos. En general, cerca del 15% de la población es homocigota para la variante 677TT. Los caucásicos y asiáticos muestran índices aproximados de 12% para los homocigotos (677TT) y de 50% para los heterocigotos (677CT).<sup>13,14,18</sup> La frecuencia de homocigocidad entre los negros africanos y estadounidenses va de 1% o menos, al 20% o más entre los italianos y los estadounidenses hispánicos. En amerindios de Brazil la frecuencia fue de 21%, pero del 1% en la tribu Tupi Parakana.<sup>16</sup> Parece ser que el polimorfismo MTHFR es significativamente menos frecuente entre los negros en comparación con los blancos y más frecuente entre hispanos comparado con no hispanos.<sup>3</sup> En México Mutchinick y col. analizaron 250 mujeres y encontraron una proporción 677CC de 17.6%, 677CT de 47.6% y 677TT de 34.8%, indicando que la población mexicana presenta una de las frecuencias alélicas más altas del mundo para esta mutación.<sup>23</sup>

En el alelo A1298C, una transversión en la posición 1298 del exón 7, cambia una adenina (A) por una citosina (C) y genera la sustitución de ácido glutámico por alanina (E429A) en la MTHFR.<sup>11,16,17</sup> El polimorfismo A1298C también influye en la actividad específica de la enzima, en los niveles de homocisteína y en la concentración de folato plasmático, pero con una extensión menor que el polimorfismo C677T.<sup>11,13,14,16,17</sup> El polimorfismo C677T afecta el dominio N-terminal catalítico de la enzima mientras que el polimorfismo A1298C se encuentra en el dominio regulador C-terminal. El efecto mayor sobre la actividad de la enzima con el primer polimorfismo puede ser una consecuencia de su localización en la región catalítica. El segundo polimorfismo podría afectar la regulación enzimática, posiblemente por SAM, el inhibidor de la MTHFR, el cual se sabe que se une en la región C-terminal.<sup>20</sup> Algunos estudios han mostrado los efectos conjuntos de los polimorfismos C677T y A1298C y los trastornos resultantes en el metabolismo de folato. Aunque el efecto de la mutación A1298C ya sea en estado homocigoto o heterocigoto no es tan marcado como el de la C677T, se ha observado que los heterocigotos para ambas mutaciones tienen una actividad más baja de la enzima MTHFR (comparable a la observada en la mutación 677TT), elevada homocisteína y niveles plasmáticos de folato disminuidos en comparación con los heterocigotos para una sola mutación.<sup>11, 20, 24</sup>

La frecuencia del alelo A1298C está menos documentada que la del alelo C677T. En Canadá y Holanda se reportan frecuencias de homocigocidad similares para A1298C, aproximadamente de 9%. La frecuencia reportada de heterocigocidad C677T/A1298C es de 15% en Canadá, de 17% en Estados Unidos y de 20% en Holanda.<sup>16</sup>

En México no existen reportes sobre la acción individual o combinada de los polimorfismos C677T y A1298C de la MTHFR en lesiones escamosas intraepiteliales (LEIs) y CaCu, por lo que se llevó a cabo un estudio de casos y controles de base no poblacional con el objetivo de determinar si estos polimorfismos representan potenciales marcadores genéticos de susceptibilidad de progresión a CaCu.

## II. MATERIALES Y METODOS

Durante el período de noviembre de 2002 a octubre de 2003 se realizó un estudio de casos y controles a partir de DNA cervical de mujeres con LEI, CaCu y citología normal que formaron parte de un estudio llevado a cabo para la detección del VPH, en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. Mujeres de cualquier edad, sexualmente activas y sin tratamiento previo para LEI o CaCu se capturaron en el Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega” y en el Servicio de Detección Oportuna de Cáncer Cervicouterino de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. Las mujeres histerectomizadas fueron excluidas del estudio.

**Especímenes.** Para los casos se obtuvieron dos biopsias cervicales dirigidas por colposcopia de las lesiones sospechosas, una para el diagnóstico histopatológico y otra inmediatamente adyacente a la primera para la obtención de DNA. Para los controles se obtuvieron dos muestras de células cervicales exfoliadas para el diagnóstico citológico y para la obtención de DNA.

Se seleccionaron 129 casos: 50 lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LEIBG), 29 lesiones de alto grado (LEIAG) y 50 de CaCu y 196 controles hospitalarios citológicamente normales. De todas las mujeres incluidas en el estudio se contó con un cuestionario con datos sociodemográficos, de salud reproductiva y de comportamiento sexual.

**Extracción de DNA a partir de muestras de tejido y células exfoliadas.** Tanto los fragmentos de tejido como las células exfoliadas fueron tratados con proteinasa K (Sigma, St. Louis Missouri, USA) y fenol-cloroformo-alcohol isoamílico para la extracción del DNA,<sup>25</sup> el cual fue almacenado a -20°C hasta su análisis.

**Análisis del VPH.** La detección y genotipificación del VPH se realizó por PCR/RFLPs con los iniciadores universales MY09 y MY11,<sup>26</sup> los cuales corresponden a la secuencia altamente conservada del gen L1 del genoma viral y amplifican un fragmento aproximado de 450 pb. Este sistema identifica 44 tipos virales genitales, incluyendo los genotipos oncogénicos.

**Genotipificación de los polimorfismos MTHFR.** Los polimorfismos C677T y A1298C MTHFR se determinaron por los métodos de PCR-RFLPs adaptados de Frosst, *et al*<sup>5</sup> y Weisberg, *et al*.<sup>20</sup> Las regiones del genoma que contienen los dos polimorfismos se amplificaron separadamente. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador GenAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA)



**Polimorfismo C677T MTHFR.** La detección del polimorfismo en el nucleótido 677 se hizo utilizando 1  $\mu$ M del iniciador sentido 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' y 1  $\mu$ M del iniciador antisentido 5'-AGGACGGTGCAGGTGAGAGTG-3' para amplificar una región de 198 pb a partir de DNA humano. El volumen final de la mezcla fue de 50  $\mu$ l conteniendo amortiguador para PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, 1.25 U de Ampli Taq Gold™ (Applied Biosystems, Foster City, CA) 200  $\mu$ M de cada dNTP (Invitrogen life technologies, Carlsband, CA) y 1.0  $\mu$ g de DNA. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un período de desnaturalización a 94°C por 10 min y 40 ciclos de: 94°C por 30 s, 60°C por 30 s y 72°C por 30 s, seguidos de una extensión de 7 min a 72°C. Los productos de amplificación fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 3% y tinción con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) y visualizados bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador de geles GeneGenius (SYNGENE, Synoptics Ltd, Cambridge, UK).

La sustitución de C→T crea un sitio de restricción *Hinf*I. La digestión se realizó preparando una mezcla con amortiguador 1X, 3  $\mu$ g de RNasa, 3 U de *Hinf*I (Invitrogen life technologies, Carlsband, CA) y 8  $\mu$ l del producto de PCR que se incubó a 37°C durante 2 h. Los productos de la digestión se analizaron después de la electroforesis en un gel de acrilamida al 10% teñido con bromuro de etidio. Los genotipos homocigotos silvestres (677CC) generaron un fragmento de 198 pb, los heterocigotos (677CT) produjeron fragmentos de 198, 175 y 23 pb y los homocigotos mutantes (677TT) produjeron fragmentos de 175 y 23 pb.<sup>15</sup>

**Polimorfismo A1298C MTHFR.** La presencia del polimorfismo A1298C MTHFR se realizó usando 1  $\mu$ M del iniciador sentido 5'-CCTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC-3' y 1  $\mu$ M del iniciador antisentido 5'-CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG-3' para amplificar una región de 163 pb a partir de DNA humano. La preparación de la mezcla fue la misma que para el otro polimorfismo. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un período de desnaturalización a 94°C por 10 min y 35 ciclos de: 92°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 30 s, seguidos de una extensión de 7 min a 72°C.

La sustitución de A→C elimina el sitio de restricción *Mbo*II. Los productos de amplificación se digirieron con 3 U de la enzima de restricción *Mbo*II (Amersham Biosciences, Brasil), seguido de una electroforesis en gel de acrilamida al 10% y tinción con bromuro de etidio. Los genotipos homocigotos silvestres (1298AA) produjeron cinco fragmentos de 56, 31, 30, 28 y 18 pb, los heterocigotos (1298AC) seis fragmentos de 84, 56, 31, 30, 28 y 18 pb y los homocigotos mutantes (1298CC) cuatro fragmentos de 84, 31, 30 y 18 pb.<sup>20</sup>

**Análisis estadístico.** Para el análisis se utilizó el paquete estadístico STATA versión 8.2 (Stata Corporation, College Station, TX, 2004). En la primera etapa del análisis se describieron las frecuencias simples y relativas de los casos de LEIBG, LEIAG y CaCu y los controles. En la segunda etapa se utilizaron medidas de asociación tipo razón de momios no ajustadas e intervalos de confianza al 95% (IC<sub>95%</sub>) como pruebas de significancia estadística, para evaluar la asociación entre LEIBG, LEIAG y CaCu y la exposición a factores de riesgo potenciales. Finalmente, se efectuó un análisis multivariado de regresión logística no condicional para determinar la asociación entre los polimorfismos C677T y A1298C *MTHFR* y LEIBG, LEIAG y CaCu, obteniendo medidas tipo razón de momios ajustadas e IC<sub>95%</sub> y valores de *P*, como pruebas de significancia estadística e interacciones entre categorías para identificar las asociaciones más fuertes con LEI y CaCu.

### III. RESULTADOS

*Características generales de los casos (LEIBG, LEIAG y CaCu) y los controles citológicamente normales.*

Las características generales de 129 casos de LEIBG, LEIAG y CaCu y 196 controles estudiados se resumen en el cuadro 1. Para el análisis de la distribución de frecuencias de las características seleccionadas, los casos se ubicaron por separado en LEIBG, LEIAG y CaCu, así como para la obtención de RM no ajustadas e IC<sub>95%</sub> para conocer la asociación de las variables de interés y el riesgo de LEI y CaCu. La frecuencia de mujeres de 40 años o más y con 3 o más partos fue mayor en el grupo de CaCu. El inicio de la vida sexual antes de los 16 años fue más frecuente entre el grupo de LEIAG y CaCu. Por otro lado, la frecuencia de infección por el VPH en LEIBG fue de 100%, en LEIAG de 86.2% y en CaCu de 98% mientras que en los controles fue de 53.1%.

El inicio de la vida sexual antes de los 16 años de edad y la infección por el VPH se asociaron significativamente con el riesgo de LEI y CaCu, observándose aumento en el riesgo conforme aumentó el grado de lesión cervical (cuadro 2).

**Cuadro 1.** Características generales de los casos de LEIBG, LEIAG y CaCu y controles captados en el Instituto Estatal de Cancerología y en el servicio de detección oportuna de CaCu de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas.

Características	Casos n=129						Controles n=196	
	LEIBG <sup>c</sup>		LEIAG <sup>d</sup>		CaCu <sup>e</sup>		n	%
	n	%	n	%	n	%		
Edad (años)								
18-39	42	84.0	14	48.3	8	16.0	129	65.8
40 o más	8	16.0	15	51.7	42	84.0	67	34.2
Partos								
Ninguno	5	10.0	1	3.5	0	0.0	33	16.8
1-2	22	44.0	11	37.9	5	10.0	70	35.7
3 o más	23	46.0	17	58.6	45	90.0	93	47.5
Edad de IVS <sup>a</sup> (años)								
> 20	6	12.0	3	10.3	3	6.0	58	29.6
16-20	36	72.0	12	41.4	29	58.0	117	59.7
< 16	8	16.0	14	48.3	18	36.0	21	10.7
DNA del VPH <sup>b</sup>								
Negativo	0	0.0	4	13.8	1	2.0	92	46.9
Positivo	50	100.0	25	86.2	49	98.0	104	53.1

<sup>a</sup> Inicio de la vida sexual.

<sup>b</sup> El DNA del VPH se detectó por PCR (MY09/11).

<sup>c</sup> Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado.

<sup>d</sup> Lesión escamosa intraepitelial de alto grado.

<sup>e</sup> Cáncer cervicouterino.

**Cuadro 2.** Descripción de casos y controles y factores asociados a lesión escamosa intraepitelial de bajo grado, lesión escamosa intraepitelial de alto grado y cáncer cervicouterino.

Características	Controles n=196	Casos n= 129					
		LEIBG <sup>c</sup> n=50	RM <sup>†</sup> (IC <sub>95%</sub> )	LEIAG <sup>d</sup> n=29	RM <sup>†</sup> (IC <sub>95%</sub> )	CaCu <sup>e</sup> n=50	RM <sup>†</sup> (IC <sub>95%</sub> )
Edad (años)							
18-39*	129	42	1.0*	14	1.0*	8	1.0*
40 y más	67	8	0.4 (0.4-0.8)	15	2.1 (0.9-4.6)	42	10.1 (4.2-24.6)
Partos							
Ninguno*	33	5	1.0*	1	1.0*	0	1.0*
1-2	70	22	2.1 (0.7-6.0)	11	5.2 (0.6-43.4)	5	-
3 y más	93	23	1.6 (0.6-4.7)	17	6.0 (0.7-48.8)	45	-
Edad de IVS <sup>a</sup> (años)							
> 20*	58	6	1.0*	3	1.0*	3	1.0*
16-20	117	36	3.0 (1.2-7.6)	12	2.0 (0.5-7.4)	29	4.8 (1.4-16.8)
< 16	21	8	3.7 (1.1-12.4)	14	12.9 (2.9-58.1)	18	16.6 (3.6-76.2)
DNA del VPH <sup>b</sup>							
Negativo*	92	0	1.0*	4	1.0*	1	1.0*
Positivo	104	50	-	25	5.5 (1.8-17.0)	49	43.3 (5.0-375.7)

\* Categoría y valor de referencia.

<sup>a</sup> Inicio de la vida sexual.

<sup>b</sup> El DNA del VPH se detectó por PCR (MY09/11).

<sup>c</sup> Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado.

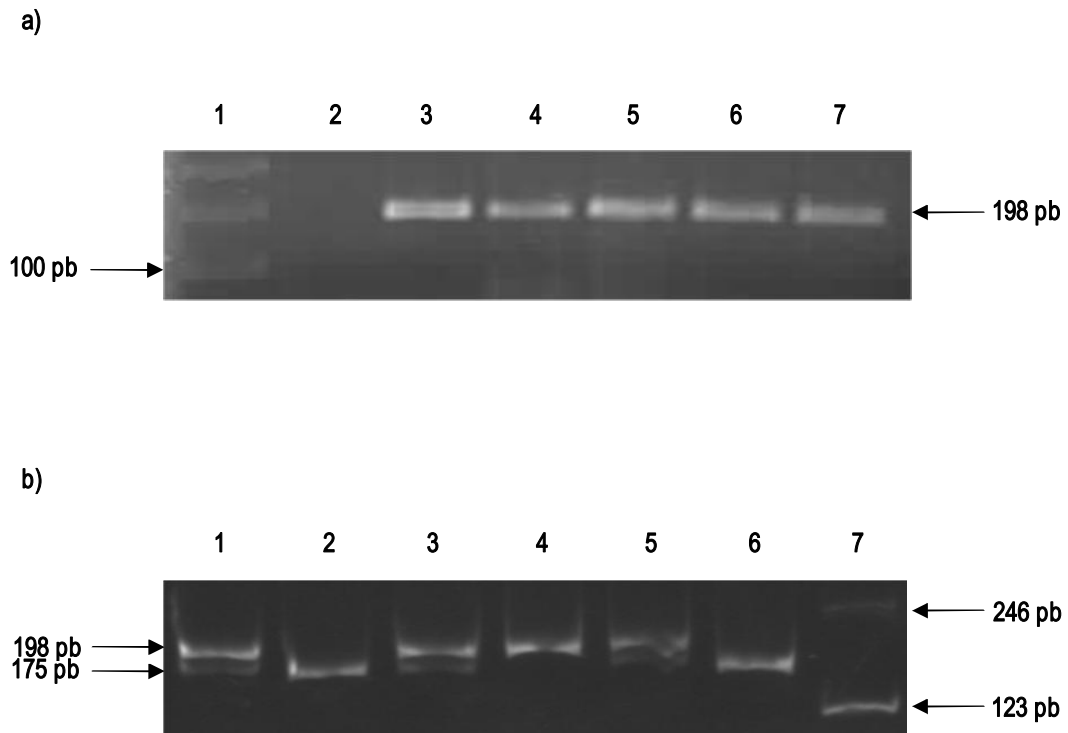
<sup>d</sup> Lesión escamosa intraepitelial de alto grado.

<sup>e</sup> Cáncer cervicouterino.

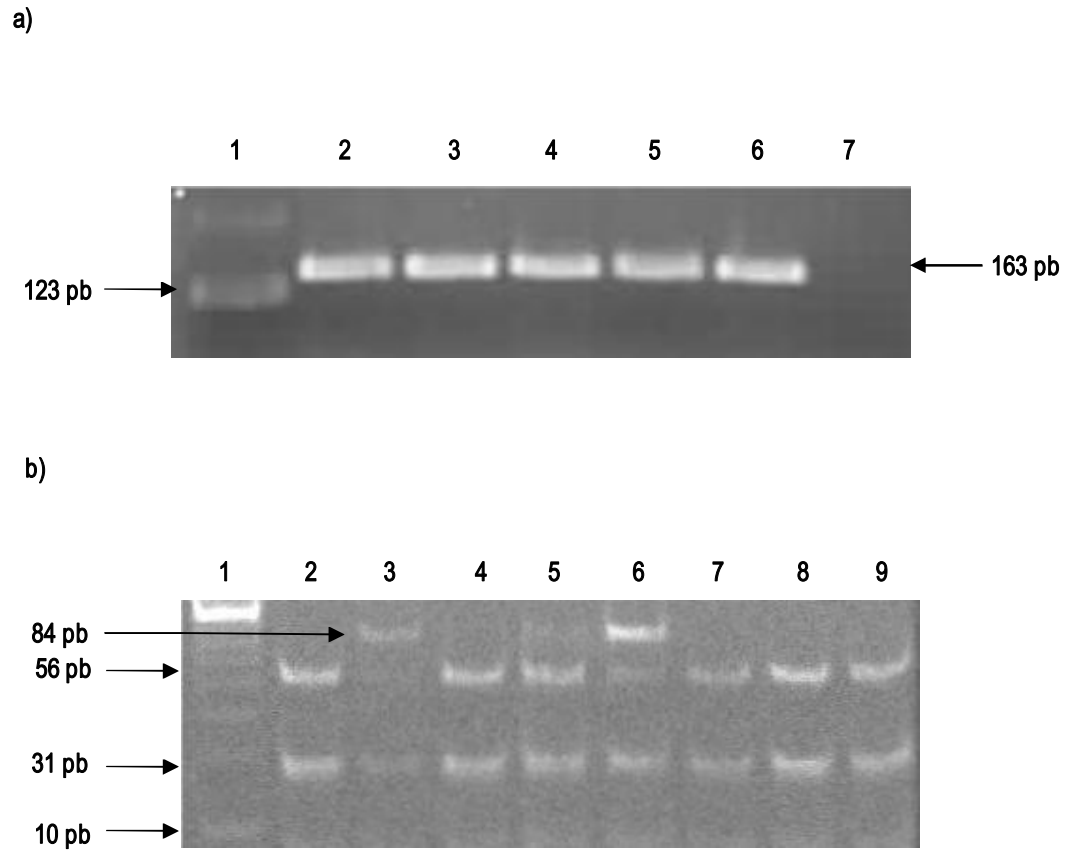
<sup>†</sup> Razón de momios no ajustada.

**Frecuencia de los genotipos C677T y A1298C de la *MTHFR* en casos de LEIBG, LEIAG y CaCu y en los controles correspondientes.**

En las figuras 1 y 2 se muestra la detección y genotipificación de los polimorfismos C677T y A1298C *MTHFR*.



**Figura 1. Polimorfismo C677T *MTHFR*.** (a) Productos de PCR en gel de agarosa al 3% de una región de 198 pb del exón 4 del gen *MTHFR* (carriles 3-7). (b) Identificación de genotipos después de la digestión con *Hinf* y electroforesis en gel de acrilamida al 10%. Carriles 1, 3 y 5, heterocigotos (677CT); carriles 2 y 6 homocigotos mutantes (677TT); y carril 4: homocigoto silvestre (677CC).



**Figura 2. Polimorfismo A1298C *MTHFR*.** a) Productos de PCR en gel de agarosa al 3% de una región de 163 pb del exón 7 del gen *MTHFR* (carriles 2-6). b) Identificación de genotipos después de la digestión con *MbdI* y electroforesis en gel de acrilamida al 10%. Carriles 2, 4, 7, 8 y 9: homocigotos silvestres (1298AA); carriles 3, 5 y 6: heterocigotos (1298AC).

Entre 129 casos de LEIBG, LEIAG y CaCu y 196 controles citológicamente normales estudiados, la frecuencia del genotipo heterocigoto 677CT y del genotipo homocigoto mutante 677TT fue similar, sin embargo, el genotipo 677CT se presentó más frecuentemente en CaCu (52.0%) y LEIBG (46.0%), en contraste, la menor frecuencia del genotipo 677TT se observó en LEIAG (31.0%). El genotipo heterocigoto 1298AC fue más frecuente en los controles (22.5%), mientras que el genotipo homocigoto mutante 1298CC se detectó en mayor proporción en LEIAG (6.9%) (cuadro 3).

Las frecuencias de los alelos 677C, 677T, 1298A y 1298C *MTHFR* en la población total de casos y en los controles fueron similares, sin embargo, el alelo mutante 1298C *MTHFR* se presentó en una proporción menor que el alelo mutante 677T *MTHFR* (cuadro 4).

**Cuadro 3.** Frecuencias de los polimorfismos C677T y A1298C *MTHFR* en casos de lesión escamosa intraepitelial, cáncer cervicouterino y controles.

Genotipos	Controles n=196		Casos n= 129						
	n	%	LEIBG <sup>a</sup> n=50		LEIAG <sup>b</sup> n=29		CaCu <sup>c</sup> n=50		
n			%	n	%	n	%	n	%
<i>C677T MTHFR</i> <sup>d</sup>									
CC	33	16.8	8	16.0	8	27.6	5	10.0	
CT	87	44.4	23	46.0	12	41.4	26	52.0	
TT	76	38.8	19	38.0	9	31.0	19	38.0	
<i>A1298C MTHFR</i> <sup>e</sup>									
AA	151	77.0	41	82.0	22	75.9	41	82.0	
AC	44	22.5	7	14.0	5	17.2	9	18.0	
CC	1	0.5	2	4.0	2	6.9	0	0.0	

<sup>a</sup> Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado.

<sup>b</sup> Lesión escamosa intraepitelial de alto grado.

<sup>c</sup> Cáncer cervicouterino.

<sup>d</sup> Genotipos *C677T MTHFR*. CC, homocigoto silvestre; CT, heterocigoto y TT, homocigoto mutante.

<sup>e</sup> Genotipos *A1298C MTHFR*. AA, homocigoto silvestre; AC, heterocigoto y CC, homocigoto mutante.



**Cuadro 4.** Distribución de los genotipos C677T y A1298C *MTHFR* y frecuencias alélicas en casos de lesión escamosa intraepitelial, cáncer cervicouterino y controles.

	Genotipos C677T <i>MTHFR</i> <sup>b</sup>						Frecuencia alélica	
	CC		CT		TT		C	T
	n	%	n	%	n	%		
Casos (n=129)								
Genotipos A1298C <i>MTHFR</i> <sup>a</sup>							0.40	0.60
AA (%)	10	7.8	48	37.2	46	35.7		
AC (%)	8	6.2	12	9.3	1	0.8		
CC (%)	3	2.3	1	0.8	0	0.0		
Frecuencia alélica								
A							0.89	
C							0.11	
Controles (n=196)								
Genotipos A1298C <i>MTHFR</i> <sup>a</sup>							0.39	0.61
AA (%)	20	10.2	58	29.6	73	37.2		
AC (%)	12	6.1	29	14.8	3	1.5		
CC (%)	1	0.5	0	0.0				
Frecuencia alélica								
A							0.88	
C							0.12	

<sup>a</sup> Genotipos A1298C *MTHFR*. AA, homocigoto silvestre; AC, heterocigoto y CC, homocigoto mutante.

<sup>b</sup> Genotipos C677T *MTHFR*. CC, homocigoto silvestre; CT, heterocigoto y TT, homocigoto mutante.

### ***Asociación de los polimorfismos C677T y A1298C MTHFR con el riesgo de LEIBG, LEIAG y CaCu.***

Debido a que cada mujer puede tener tanto el genotipo C677T *MTHFR* como el A1298C *MTHFR*, las asociaciones entre LEI y CaCu y las variantes alélicas del primer polimorfismo y sus efectos son descritos primero independientemente de las variantes alélicas del segundo.

La RM no ajustada obtenida evidenció asociación del genotipo 1298CC *MTHFR* (RM 7.4; IC<sub>95%</sub>, 0.4-437.3) con LEIBG, aunque esta asociación no fue estadísticamente significativa a los niveles convencionales de 95% de confianza, sin embargo, no se demostró asociación de los genotipos 677CT y 677TT *MTHFR* con este tipo de lesiones. Similar a lo observado en las LEIBG, el genotipo 1298CC también se asoció con el riesgo de LEIAG, pero sin significancia estadística (RM 13.7; IC<sub>95%</sub>, 0.7-814.8) (cuadro 5).

Contrario a los resultados obtenidos en los grupos de LEIBG y de LEIAG, los genotipos 677CT y 677TT *MTHFR*, separados o combinados si se asociaron aunque sin significancia estadística con el riesgo de CaCu. Las mujeres con genotipo heterocigoto 677CT mostraron un riesgo mayor de CaCu (RM 2.0; IC<sub>95%</sub>, 0.7-7.1), en comparación con las mujeres con genotipo homocigoto silvestre 677CC. Por

otro lado, los genotipos 1298AC y 1298CC *MTHFR* no se asociaron con el riesgo de CaCu, a diferencia de lo observado en LEIBG y LEIAG (cuadro 5).

**Cuadro 5.** Asociación de los genotipos C677T y A1298C *MTHFR* con lesión escamosa intraepitelial de bajo grado, lesión escamosa intraepitelial de alto grado y cáncer cérvicouterino.

Genotipos	Controles n=196	Casos n= 129					
		LEIBG <sup>a</sup> n=50	RM <sup>†</sup> (IC <sub>95%</sub> )	LEIAG <sup>b</sup> n=29	RM <sup>†</sup> (IC <sub>95%</sub> )	CaCu <sup>c</sup> n=50	RM <sup>†</sup> (IC <sub>95%</sub> )
<i>C677T MTHFR</i> <sup>d</sup>							
CC*	33	8	1.0*	8	1.0*	5	1.0*
CT	87	23	1.1 (0.4-3.1)	12	0.6 (0.2-1.8)	26	2.0 (0.7-7.1)
TT	76	19	1.0 (0.4-3.0)	9	0.5 (0.2-1.6)	19	1.7 (0.5-6.1)
CT y TT	163	42	1.1 (0.4-2.9)	21	0.5 (0.2-1.5)	45	1.8 (0.7-6.3)
<i>A1298C MTHFR</i> <sup>e</sup>							
AA*	151	41	1.0*	22	1.0*	41	1.0*
AC	44	7	0.6 (0.2-1.4)	5	0.8 (0.2-2.3)	9	0.8 (0.3-1.7)
CC	1	2	7.4 (0.4-437.3)	2	13.7 (0.7-814.8)	0	-
AC y CC	45	9	0.7 (0.3-1.7)	7	1.1 (0.4-2.8)	9	0.7 (0.3-1.7)

\* Categoría y valor de referencia.

<sup>a</sup> Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado.

<sup>b</sup> Lesión escamosa intraepitelial de alto grado.

<sup>c</sup> Cáncer cervicouterino.

<sup>d</sup> Genotipos *C677T MTHFR*: CC, homocigoto silvestre; CT, heterocigoto y TT, homocigoto mutante.

<sup>e</sup> Genotipos *A1298C MTHFR*: AA, homocigoto silvestre; AC, heterocigoto y CC, homocigoto mutante.

<sup>†</sup> Razón de momios no ajustada.

Para el análisis de regresión logística no condicional, los casos de LEIBG y LEIAG se incluyeron en un solo grupo debido a lo pequeño del tamaño de la muestra. El genotipo homocigoto mutante 1298CC se asoció significativamente con LEI (RM ajustada, 17.2; IC<sub>95%</sub>, 1.0-308.3), sin embargo, esta asociación desapareció cuando se analizaron los genotipos 1298AC y 1298CC juntos (RM ajustada, 0.8; IC<sub>95%</sub>, 0.4-1.6). Los genotipos variantes 677CT y 677TT *MTHFR* (separados o juntos) no se asociaron con LEI cuando se compararon con el genotipo homocigoto silvestre 677CC (cuadro 6).

Por otro lado, se observó aumento en el riesgo de CaCu por la presencia del genotipo 677CT *MTHFR* separado o junto con el genotipo 677TT pero esta asociación no fue estadísticamente significativa (RM ajustada, 2.2; IC<sub>95%</sub>, 0.7-7.1 para 677CT y RM ajustada, 1.6; IC<sub>95%</sub>, 0.5-4.9 para ambos genotipos, 677CT y 677TT). El genotipo heterocigoto 1298AC *MTHFR* también se asoció con CaCu (RM ajustada 1.4; IC<sub>95%</sub> 0.5-3.7). Debido a que no se presentó ningún caso de CaCu con el genotipo

homocigoto mutante 1298CC no se pudo determinar la asociación de éste con el riesgo de enfermedad (cuadro 6).

**Cuadro 6.** Asociación de los genotipos C677T y A1298C *MTHFR* con el riesgo de lesión escamosa intraepitelial y cáncer cervicouterino.

Genotipos	Controles n=196	Casos de LEI <sup>a</sup> n=50	RM <sup>†</sup> (IC <sub>95%</sub> )	Valor de <i>P</i>	Casos de CaCu <sup>b</sup> n=50	RM <sup>†</sup> (IC <sub>95%</sub> )	Valor de <i>P</i>
<i>C677T MTHFR</i>							
CC*	33	16	1.0*	-	5	1.0*	-
CT	87	35	0.7 (0.3-1.4)	0.304	26	2.2 (0.7-7.1)	0.200
TT	76	28	0.7 (0.3-1.5)	0.350	19	1.1 (0.3-3.7)	0.870
CT y TT	163	63	0.7 (0.3-1.4)	0.283	45	1.6 (0.5-4.9)	0.420
<i>A1298C MTHFR</i> <sup>d</sup>							
AA*	151	63	1.0*	-	41	1.0*	-
AC	44	12	0.6 (0.3-1.3)	0.203	9	1.4 (0.5-3.7)	0.471
CC	1	4	17.2 (1.0-308.3)	0.054	0	-	-
AC y CC	45	16	0.8 (0.4-1.6)	0.540	9	1.3 (0.5-3.3)	0.586

\* Categoría y valor de referencia.

<sup>a</sup> Lesión escamosa intraepitelial.

<sup>b</sup> Cáncer cervicouterino.

<sup>c</sup> Genotipos *C677T MTHFR*: CC, homocigoto silvestre; CT, heterocigoto y TT, homocigoto mutante.

<sup>d</sup> Genotipos *A1298C MTHFR*: AA, homocigoto silvestre; AC, heterocigoto y CC, homocigoto mutante.

<sup>†</sup> Razón de momios estimada mediante regresión logística no condicional ajustando por edad, inicio de la vida sexual antes de los 16 años de edad, 3 partos o más e infección por el VPH (el DNA del virus fue detectado por PCR, MY09/11).

Después de analizar la interacción potencial de los polimorfismos C677T y A1298C *MTHFR* en el riesgo de LEI, se observó que sólo tres haplotipos se asociaron con LEI aunque sin alcanzar el nivel convencional de 95% de confianza. Para las mujeres con haplotipo 677CC/1298CC la RM ajustada fue de 20.9, IC<sub>95%</sub> 1.0-442.0, el límite superior del IC para esta RM es de 442.0 debido a que sólo un control portó el haplotipo 677CC/1298CC *MTHFR*, para el haplotipo 677CC/1298AC, la RM ajustada fue de 1.6, IC<sub>95%</sub> 0.4-6.7 y para 677CT/1298AA, la RM ajustada fue de 1.2, IC<sub>95%</sub> 0.4-3.6 (cuadro 7).

Los haplotipos asociados a CaCu aunque no significativamente fueron 677TT/1298AC, RM ajustada 3.7, IC<sub>95%</sub> 0.1-138.3, 677CT/1298AC, RM ajustada 2.4, IC<sub>95%</sub> 0.5-11.4 y 677CT/1298AA, RM ajustada 1.9, IC<sub>95%</sub> 0.5-7.5 (cuadro 8).

**Cuadro 7.** Interacción de los genotipos C677T y A1298C *MTHFR* y asociación con lesión escamosa intraepitelial.

Haplotipos <i>MTHFR</i>		Casos de LEI <sup>a</sup> n= 79		Controles n= 196		RM <sup>†</sup> (IC <sub>95%</sub> )	Valor de <i>P</i>
Genotipos C677T <sup>b</sup>	Genotipos A1298C <sup>c</sup>	n	%	n	%		
CC*	AA*	6	7.6	20	10.2	1.0*	
CC	AC	7	8.9	12	6.1	1.6 (0.4-6.7)	0.515
CC	CC	3	3.8	1	0.5	20.9 (1.0-442.0)	0.050
CT	AA	29	36.7	58	29.6	1.2 (0.4-3.6)	0.735
CT	AC	5	6.3	29	14.8	0.4 (0.1-1.5)	0.179
CT	CC	1	1.3	0	0.0	-	-
TT	AA	28	35.4	73	37.2	0.9 (0.3-2.7)	0.905
TT	AC	0	0.0	3	1.5	-	-
TT	CC	0	0.0	0	0.0	-	-

\* Categoría y valor de referencia.

<sup>a</sup> Lesión escamosa intraepitelial.

<sup>b</sup> Genotipos C677T *MTHFR*: CC, homocigoto silvestre; CT, heterocigoto y TT, homocigoto mutante.

<sup>c</sup> Genotipos A1298C *MTHFR*: AA, homocigoto silvestre; AC, heterocigoto y CC, homocigoto mutante.

<sup>†</sup> Razón de momios estimada mediante regresión logística no condicional ajustando por edad, inicio de la vida sexual antes de los 16 años de edad, 3 partos o más e infección por el VPH (el DNA del virus fue detectado por PCR, MY09/11).

**Cuadro 8.** Interacción de los genotipos C677T y A1298C *MTHFR* y asociación con cáncer cervicouterino.

Haplotipos <i>MTHFR</i>		Casos de CaCu <sup>a</sup> n= 50		Controles n= 196		RM <sup>†</sup> (IC <sub>95%</sub> )	Valor de <i>P</i>
Genotipos C677T <sup>b</sup>	Genotipos A1298C <sup>c</sup>	n	%	n	%		
CC	AA	4	8.0	20	10.2	1.0*	-
CC	AC	1	2.0	12	6.1	0.8 (0.1-9.8)	0.827
CC	CC	0	0.0	1	0.5	-	-
CT	AA	19	38.0	58	29.6	1.9 (0.5-7.5)	0.338
CT	AC	7	14.0	29	14.8	2.4 (0.5-11.4)	0.287
CT	CC	0	0.0	0	0.0	-	-
TT	AA	18	36.0	73	37.2	1.0 (0.3-3.8)	0.997
TT	AC	1	2.0	3	1.5	3.7 (0.1-138.3)	0.482
TT	CC	0	0.0	0	0.0	-	-

\* Categoría de referencia.

<sup>a</sup> Cáncer cervicouterino.

<sup>b</sup> Genotipos C677T *MTHFR*: CC, homocigoto silvestre; CT, heterocigoto y TT, homocigoto mutante.

<sup>c</sup> Genotipos A1298C *MTHFR*: AA, homocigoto silvestre; AC, heterocigoto y CC, homocigoto mutante.

<sup>†</sup> Razón de momios estimada mediante regresión logística no condicional ajustando por edad, inicio de la vida sexual antes de los 16 años de edad, 3 partos o más e infección por el VPH (el DNA del virus fue detectado por PCR).

## IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los estudios de los polimorfismos genéticos comunes C677T y A1298C del gen *MTHFR* y sus implicaciones en la disminución de la actividad de la enzima codificada, han aumentado debido al papel crítico de la MTHFR en la síntesis, reparación y metilación del DNA y por lo tanto en la estabilidad y la expresión genética, a través de la reducción de 5,10-metilenTHF a 5-metilTHF. El 5-metilTHF es necesario para la síntesis de metionina, la cual es convertida a SAM. SAM es el donador universal en las reacciones de transferencia de metilo incluyendo aquellas del DNA.<sup>8</sup> Diferentes investigaciones reportan que los efectos más importantes en la actividad enzimática relacionados con los polimorfismos C677T y A1298C dependen en parte de la ingesta de folato.

Los polimorfismos de la MTHFR fueron primeramente implicados en la etiología de defectos del tubo neural<sup>24</sup> y enfermedad cardiovascular.<sup>15</sup> El polimorfismo C677T ha sido asociado con la disminución en el riesgo de cáncer colorrectal,<sup>27,29, 30</sup> y leucemia linfocítica aguda,<sup>11</sup> pero esa disminución no se ha observado en leucemia mieloide aguda,<sup>11</sup> y en cáncer endometrial,<sup>31</sup> de esófago<sup>21</sup> y displasia cervical<sup>3,28</sup> se ha asociado con aumento en el riesgo. Crott y col. sugieren que la metilación del DNA disminuida como resultado de la actividad reducida de la MTHFR puede ser la responsable del aumento en el riesgo de cáncer endometrial, ya que la hipometilación puede activar protooncogenes incrementando el riesgo de cáncer, mientras que en el cáncer colorrectal y la leucemia linfocítica aguda la hipometilación inducida por C677T puede evitar el silenciamiento de los genes supresores de tumor y disminuir el riesgo de cáncer.<sup>32</sup> Un estudio realizado por Stern y col. quienes determinaron el efecto del genotipo 677TT en la metilación del DNA, reporta que los individuos con este genotipo presentan DNA hipometilado.<sup>33</sup>

Hasta ahora, son pocos los estudios que han investigado la asociación de C677T y A1298C de la MTHFR (individualmente o combinados) con las LEIs<sup>3,28</sup> y sólo un estudio ha evaluado la participación de los dos polimorfismos en el CaCu.<sup>34</sup> Por esta razón, nosotros investigamos la relación de estos polimorfismos con la progresión a CaCu.

En este estudio, los genotipos variantes C677T fueron más frecuentes en los casos y los controles en comparación con los genotipos A1298C. La frecuencia del alelo mutante 677T fue de 0.60 en la población general de casos y de 0.61 en los controles, lo que coincide con la frecuencia alélica de 0.59 reportada por Mutchinick y col. para diferentes regiones de México.<sup>23</sup> En contraste, el alelo mutante 1298C se presentó en una frecuencia baja (0.11 en los casos y 0.12 en los controles), estos datos son

similares a los reportados por Song y col. en una población china (0.14 y 0.17). Este es el primer reporte de la frecuencia alélica de 1298C del gen MTHFR en población mexicana.

En nuestro estudio, no se demostró riesgo de LEI en presencia del polimorfismo C677T en cualquiera de sus estados, sin embargo, cuando analizamos el polimorfismo A1298C, observamos un riesgo alto de LEI (RM ajustada 17.2, IC<sub>95%</sub> 1.0-308.3) en mujeres con el genotipo 1298CC. Los resultados de un estudio de 64 casos y 31 controles realizado por Piyathilake y col.<sup>21</sup> soportan la hipótesis que las mujeres portadoras de la mutación 677T, tienen un riesgo 2.8 veces mayor de desarrollar LEI y en aquellas con genotipo homocigoto mutante 677TT el riesgo aumenta a 3.5 veces.

Diferente a lo observado en las LEI, al analizar el grupo de CaCu, encontramos que las mujeres con genotipo heterocigoto 677CT tuvieron un riesgo 2.2 veces mayor en comparación con las de genotipo silvestre 677CC y aún cuando para 677TT el riesgo fue menor (RM ajustada 1.1, IC<sub>95%</sub> 0.3-3.7), las mujeres con este genotipo tuvieron mayor riesgo de CaCu en comparación con el riesgo de LEI (RM ajustada 0.7, IC<sub>95%</sub> 0.3-1.5). Este comportamiento también fue observado para el genotipo heterocigoto 1298AC, RM ajustada 1.4, IC<sub>95%</sub> 0.5-3.7 en CaCu y RM ajustada 0.6, IC<sub>95%</sub> 0.3-1.3 en LEI. La falta de significancia estadística en los resultados de este estudio puede explicarse por el tamaño de la muestra. Nuestros resultados son diferentes a los reportados por Gerhard y col. quienes en un estudio realizado en Washington en 102 mujeres con CaCu y controles de base familiar y utilizando una prueba de transmisión/desequilibrio, no encontraron asociación entre los genotipos C677T y A1298C *MTHFR* y el CaCu.<sup>34</sup> Estos resultados pueden deberse a las diferencias raciales de las poblaciones estudiadas.

Song y col. reportan que los individuos de una población china con genotipo 677TT tienen un riesgo 6 veces mayor de carcinoma esofágico de células escamosas, en comparación con los de genotipo 677CC. Estos investigadores reportan una frecuencia baja del genotipo 1298CC (2.9% en los casos y 1.4% en los controles) pero también encontraron asociación estadísticamente significativa de este genotipo con el riesgo de carcinoma esofágico (RM 4.43, IC<sub>95%</sub> 1.23-16.02), pero no para el genotipo heterocigoto 1298AC.<sup>21</sup> En contraste con estos resultados, Shen y col. reportan la falta de asociación de los polimorfismos MTHFR con el riesgo de cáncer de pulmón, con valores de RM de 1.1, IC<sub>95%</sub> 0.7-1.7 para el genotipo 677TT y de 1.1, IC<sub>95%</sub> 0.7-1.8 para el genotipo 1298CC.<sup>13</sup>

Nosotros establecimos efectos conjuntos de los genotipos 677CC/1298CC, 677CC/1298AC y 677CT/1298AA en el aumento de riesgo de LEI, y de 677TT/1298AC, 677CT/1298AC, 677CT/1298AA, en CaCu, aunque estos hallazgos son limitados debido al número de mujeres incluidas en cada grupo

de casos. Anteriormente se han reportado los efectos conjuntos de los dos polimorfismos y se ha observado que el haplotipo 677CT/1298AC genera una actividad baja de la MTHFR, comparable a la observada para el genotipo homocigoto mutante 677TT y diferente al estado heterocigoto para una sola mutación.<sup>11, 20, 24</sup> En este estudio, el haplotipo 677TT/1298AC es el que se asoció más fuertemente con CaCu. Similar a lo reportado en otros estudios,<sup>11, 13, 20, 21</sup> los haplotipos 677CT/1298CC y 677TT/1298AC fueron poco frecuentes, ya que el 677CT/1298CC se detectó sólo en un caso de LEI, y el 677TT/1298AC en un caso de CaCu y en tres controles; no se detectó el haplotipo 677TT/1298CC, lo que indica su posible efecto letal.

Una de las limitaciones de este estudio es la falta de datos sobre la ingesta de folato en los grupos analizados, ya que estudios previos han sugerido la interacción gen-ambiente en la etiología de diversos tipos de neoplasias malignas. Ulrich y col. reportaron que los individuos con ingesta alta o media de folato, vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> y metionina y genotipo 677TT *MTHFR* mostraron un riesgo ligeramente disminuido de pólipos adenomatosos, los cuales son considerados precursores del cáncer colorrectal, sin embargo, los individuos con baja ingesta de estos nutrientes mostraron consistentemente un riesgo elevado y el riesgo fue mayor en individuos de 60 años y más, lo que puede atribuirse a una mala absorción de nutrientes conforme aumenta la edad.<sup>35</sup> Goodman y col. sugieren que el alelo 677T y una dieta de folato reducida pueden incrementar el riesgo de LEIs.<sup>28</sup>

En conclusión, aunque el poder de este estudio es bajo debido a que el tamaño de la muestra fue pequeño, los resultados indican que las mujeres con genotipos C677T o A1298C tienen mayor riesgo de CaCu y LEI en comparación con las mujeres no portadoras de estas mutaciones, por lo que nuestros hallazgos son importantes en el contexto de identificación de mujeres con susceptibilidad de desarrollar LEI y CaCu.

## V. REFERENCIAS

1. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:518-527.
2. Carr J, Gyorfi T. Human papillomavirus. Epidemiology, transmission, and pathogenesis. *Clin Lab Med* 2000;20 (2):235-255.
3. Piyathilake CJ, Macaluso M, Johanning GL, Whiteside M, Heimbürger DC, Giuliano A. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism increases the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Anticancer Res* 2000;20:1751-1758.
4. Chaouki N, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJLM, El Gueddari B, El Ghazi A, et al. The viral origin of cervical cancer in Rabat, Morocco. *Int J Cancer*. 1998;75:546-554.
5. Hernández M, Lazcano EC, Berumen J, Cruz A, Alonso PP, González G. Human papillomavirus 16-18 infection and cervical cancer in Mexico: a case-control study. *Arch Med Res* 1997;28:265-271.
6. Muñoz, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000;19:1-5.
7. Alberg AJ, Selhub J, Shah KV, Viscidi RP, Comstock GW, Helzlsouer KJ. The Risk of cervical cancer in relation to serum concentrations of folate, vitamin B<sub>12</sub> y homocysteine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:761-764.
8. Duthie SJ, Narayanan S, Brand WB, Pirie L, Grant G. Impact of folate Deficiency on DNA Stability. *J Nutr* 2002;132:2444S-2449S.
9. Ziegler RG, Weinstein SJ, Fears TR. Nutritional and genetic Inefficiencies in one-carbon metabolism and cervical cancer risk. *J Nutr* 132:2345S-2349S.
10. Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr* 2000;130: 129-132.
11. Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, Morgan G. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *PNAS* 1999;96(22):12810-12815.
12. James SJ, Pogribny IP, Pogribna M, Miller BJ, Jenigan S, Melnyk S. Mechanisms of DNA damage, DNA hypomethylation, and tumor progression in the folate/methyl-deficient rat model of hepatocarcinogenesis. *J Nutr* 2003;133: 3740S-3747S.
13. Shen H, Spitz MR, Wang LE, Hong WK, Wel Q. Polymorphisms of methylene-tetrahydrofolate reductase and risk of lung cancer: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:397-401.
14. Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, Bostick R, et al. Colorectal adenomas and the C677T MTHFR polymorphism: evidence for gene-environment interaction?. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:659-668.
15. Frosst, P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-113.
16. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE Review. *Am J Epidemiol* 2000; 151(9):862-877.



17. Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *PNAS* 2001; 98 (26):14853-14858.
18. Bailey LB, Gregory JF. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzimas: metabolic significance, risk and impact on folate requirement. *J. Nutr* 1999;129:919-922.
19. Levine AJ, Siegmund KD, Ervin CM, Diep A, Lee ER, Frankl HD, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C-T polymorphism and distal colorectal adenoma Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:657-663.
20. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64:169-172.
21. Song C, Xing D, Tan W, Wei Q, Lin D. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms increase risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Cancer Res* 2001;61:3272-3275.
22. Guenther BD, Sherppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Biol* 1999; 6 (4): 359-365.
23. Mutchinick OM, López MA, Luna L, Waxman J, Babinsky VE. 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.
24. Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998;62:1044-1051.
25. Strauss WM. Preparation and analysis of DNA: preparation of genomic DNA from mammalian tissue. En: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. USA: John Wiley & Sons, Inc; 2000:2.2.1-2.2.3.
26. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994;170: 1077-1085.
27. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, et al. methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57:1098-1102.
28. Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B, Wilkens LR, Bertram CC, Killen J, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and dietary folate with the risk of cervical dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:1275-1280.
29. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetrahydrofolate reductase, diet and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:513-518.
30. Chen J, Giovannucci EL, Hunter DJ. MTHFR polymorphisms, methyl-replete diets and the risk of colorectal carcinoma and adenoma among U.S. men and women: an example of gene-environment interactions in colorectal tumorigenesis. *J Nutr* 1999;129:560S-564S.
31. Esteller M, Garcia A, Martinez-Palones JM, Xercavins J, Reventos J. Germ line polymorphisms in cytochrome-P450 1A1 (C4887 CYP1A1) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes and endometrial cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 1997;18:2307-2311.

32. Crott JW, Mashiyama T, Ames BN, Fenech MF. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism does not alter folic acid deficiency-induced uracil incorporation into primary human lymphocyte DNA *in vitro*. *Carcinogenesis* 2001;22(7):1019-1025.
33. Stern LL, Mason JB, Selhub J, Choi S-W. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:849-853.
34. Gerhard DS, Nguyen LT, Zhang ZY, Borecki IB, Coleman BI, Rader JS. A relationship between methylenetetrahydrofolate reductase variants and the development of invasive cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2003;90:560-565.
35. Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, Bostick R, et al. Lack of association between the C677T MTHFR Polymorphism and colorectal hiperplastic polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:427-433.