

Frecuencia del polimorfismo *TS 1494del6* en pacientes con cáncer colorrectal del Occidente de México

Martha Patricia Gallegos-Arreola,* Valeria Peralta-Leal,* Gilberto Morgan-Villela,*** Ana María Puebla-Pérez **

* Laboratorios de Genética Molecular e ** Inmunofarmacología; Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO).

*** Unidad de Radio-Diagnóstico, Centro Médico de Occidente (CMNO), IMSS

Frequency of *TS1494del6* polymorphism in colorectal patients from west of Mexico

ABSTRACT

*Thymidylate synthase (TYMS) converts dUMP to dTMP, the rate-limiting nucleotide in DNA synthesis. It is also the target for 5-fluorouracil, the most common chemotherapy agent for treatment of colorectal cancer (CRC). We designed a case-control study to investigate the frequency of *TS 1494del6* polymorphism in patients with CRC and controls from Mexican population. The study consists of 253 patients with CRC and 200 control subjects. Risk of CRC was estimated by use of Odds ratio (95% CI) analysis. The genotype 6bp-/6bp- in CRC patients was 18% (45/253) and in controls was 11% (22/200) with Odds ratio of 1.8 (1 - 4) with $P = 0.059$. When stratifying the training groups by age (< 50 years), male gender, stage III-IV and presence of metastasis, the genotype 6bp-/6bp- was as risk ($p < 0.05$). The genotype 6bp-/6bp- in the region untranslated 3' of *TS* gene, in the analyzed sample participates in important way in the development of CRC of the Mexican population.*

Key words. Colorectal cancer. Polymorphism *TS 1494del6*. Thymidylate synthase. Mexican population.

RESUMEN

La enzima timidilato sintasa (TYMS) convierte dUMP a dTMP y participa en la regulación de nucleótidos requeridos para la síntesis del DNA. También interviene en el metabolismo del 5-fluorouracilo, el agente quimioterapéutico más utilizado en el tratamiento de cáncer colorrectal (CCR). Se diseñó un estudio de casos y controles para investigar la frecuencia del polimorfismo *TS 1494del6* en el gen *TYMS* en pacientes con CCR de la población mexicana. El estudio consistió en 253 pacientes con CCR y 200 controles de la población general del Occidente de México. Se determinó la frecuencia del polimorfismo y su asociación con edad, género, estadio y metástasis por medio de razón de momios (95% IC). El genotipo 6pb-/6pb- en pacientes con CCR fue de 18% (45/253) y en controles de 11% (22/200) con una razón de momios de 1.8 (1-4) $p = 0.059$. Al estratificar los grupos de estudio por edad (< 50 años), sexo masculino, estadio III-IV y presencia de metástasis el genotipo 6pb-/6pb fue de riesgo ($p < 0.05$). El genotipo 6pb-/6pb que se encuentra en la región no transcrita del extremo 3' del gen *TYMS* en la muestra analizada participa de manera importante en el desarrollo de CCR de la población mexicana.

Palabras clave. Cáncer colorrectal. Polimorfismo *TS 1494del6*. Timidilato sintasa. Población mexicana.

INTRODUCCIÓN

Actualmente el cáncer colorrectal (CCR) ocupa una de las principales causas de enfermedad y muerte en países occidentales.¹ En México, la mortalidad por cáncer se ha incrementado en los últimos 20 años.² Particularmente en el estado de Jalisco durante el periodo de 1990 a 2002, se presentaron 8,248 casos nuevos, con una tasa de 58.1 a 123.74/100,000 habitantes.³ Aunque el CCR es multifacto-

rial, se cree que los principales factores de riesgo son ambientales, tales como sedentarismo, consumo de tabaco, alcohol, dieta pobre en fibra y rica en grasas; entre otros factores se incluye la edad avanzada y la predisposición genética. Éste se caracteriza por el crecimiento incontrolado de células anormales en el intestino, que pueden diseminarse a través de la vía linfática o sanguínea para su implantación. Si se disemina por sangre, puede haber metástasis a hígado, pulmón y columna. En cambio, si ocurre por los

ganglios linfáticos, existe la probabilidad de metástasis a vejiga o próstata. Los síntomas principales suelen ser las alteraciones del ritmo intestinal, dolor abdominal y rectorragia persistente sin manifestaciones anales.⁴

Los avances de la Biología Molecular han establecido la relación que guardan algunas enzimas y genes en el CCR, tal es el caso de la enzima Timidilato Sintasa (TYMS),⁵ que participa en el metabolismo del 5-fluorouracilo (5-FU) y otros fármacos utilizados en el tratamiento de elección de diversos tumores malignos que incluyen el CCR. Se ha descrito la TYMS como un factor predictor de supervivencia clínica en CCR.⁶⁻⁹ Algunos estudios han confirmado como factor de mal pronóstico la expresión elevada de TYMS en el tumor; sin embargo, existen controversias al respecto.¹⁰ Otra de las funciones de la TYMS es su participación en el metabolismo de los folatos, mediante el sustrato 5,10 metileno-tetrahidrofolato (5,10-MetilenoTHF), que provee grupos metilo en el ADN y participa en diferentes vías, incluyendo la síntesis de timidina y purinas. La deficiencia de folatos se ha asociado con daño severo al ADN y con un incremento en el riesgo a CCR.¹¹

El gen que codifica para la TYMS está formado por siete exones y su secuencia codificadora mide aproximadamente 30 Kb. Se localiza en el cromosoma 18p11.32, región que frecuentemente se pierde en pacientes con CCR, lo que conduce a una pérdida de heterocigocidad en células tumorales.¹² La región 3'UTR no codificadora del gen *TYMS*, contiene un polimorfismo denominado *TS 1494del6*, adyacente al codón de terminación; dicho polimorfismo se caracteriza por la delección de seis pares de bases (pb), que según estudios *in vitro* produce disminución en la estabilidad del ARNm. En tanto que en el tumor (CCR), se observó disminución en la expresión. Por otra parte, se ha descrito que los homocigotos para la delección de 6pb (*6pb-/6pb-*) del polimorfismo *TS 1494del6*, expresan menor cantidad de ARNm (70%), en relación a los homocigotos para el genotipo silvestre (inserción de 6pb, *6pb+/6pb+*).¹³⁻¹⁶ Las frecuencias descritas para este polimorfismo varían en función de la población estudiada.^{7,13-15} Algunos estudios asocian este polimorfismo con CCR;^{13,15,17,18} sin embargo, existen contradicciones al respecto.^{19,20}

En la población mexicana, no existen estudios sobre la frecuencia del polimorfismo *TS 1494del6*, ni su asociación en CCR. En el presente estudio se describen las frecuencias de los genotipos del polimorfismo *TS 1494del6* en pacientes con CCR y en un grupo control.

Se analizó a un grupo de 253 pacientes con CCR, diagnosticados clínicamente en el Servicio de Oncología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente (CMNO) del Instituto Mexicano del Seguro Social (Guadalajara, Jalisco) y un grupo de 200 controles voluntarios de la población general de los cuales 178 fueron de Jalisco, 14 de Colima y ocho de Michoacán. Todos sin antecedentes de cáncer al momento del estudio. A los grupos de estudio, se les extrajo una muestra de sangre periférica para la obtención de ADN genómico por el método de Miller,²¹ previa firma del consentimiento informado y aprobación por el comité de ética del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO).

Las características del grupo de estudio se presentan en el cuadro 1. El grupo de pacientes presentó edad promedio de 55 ± 14 y el grupo control de 49 ± 14 años, ambos integrados por hombres y mujeres. El grupo de pacientes fue clasificado por tipo de cáncer, etapa, metástasis, tratamiento (QT) y toxicidad.

Para la identificación del polimorfismo *TS 1494del6*, se amplificó un segmento de 158 pb del gen *TYMS*, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa y el programa modificado de 94°C (5 min), 30 ciclos de 94°C (30 s), 58°C (45 s), 72°C (45 s) y una extensión final de 70°C (7 min) mediante los iniciadores 5'-CAAATCTGAGGGAGCTGAGT-3' y 5'-CAGATAAGTGGCAGTACAGA-3'.¹³ Las condiciones modificadas para la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), fueron buffer de la enzima al 1X, iniciadores a 5 pmol, los dNTPs a 0.2 mM, el MgCl_2 a 1.5 mM, 1.5 U de enzima Taq pol y 50 ng de ADN. El fragmento amplificado de 158 pb se analizó con la enzima de restricción *Dra* I (New England Biolab, USA), según las instrucciones del fabricante. Los productos digeridos fueron separados mediante electroforesis en geles de poli-acrilamida (29:1) al 6% y tinción con nitrato de plata.²² El genotipo homocigoto silvestre (*6pb+/6pb+*, inserción de 6pb) que contiene el sitio de reconocimiento para la enzima *Dra* I, se caracterizó por la presencia de dos fragmentos uno de 70 y otro de 88 pb y el genotipo homocigoto para la delección de 6pb (*6pb-/6pb-*, no corte) por una banda de 152 pb (Figura 1). Tomando en cuenta previos estudios,¹³⁻¹⁸ en el presente el genotipo *6pb-/6pb-* se tomó como polimórfico. Sin embargo, es importante señalar que existen controversias, ya que otros autores describen al genotipo *6pb+/6pb+* como polimórfico en pacientes con cáncer de mama¹⁹ y pulmón.²⁰

Cuadro 1. Características generales de los grupos de estudio.

| | Pacientes (n = 253) | | Controles (n = 200) | |
|------------------------------------|---------------------|----|---------------------|-----|
| Edad (media (x) ± DS) | 55 ± 14 | | 49 ± 14 | |
| < 50 años | 65 (26%) | | 111 (55.5%) | |
| ≥ 50 años | 188 (74%) | | 89 (45.54%) | |
| | (n) | % | (n) | % |
| Género | | | | |
| Masculino | (146) | 58 | (83) | 42 |
| Femenino | (107) | 42 | (117) | 58 |
| Antecedentes familiares con cáncer | | | | |
| CCR | (12) | 5 | | |
| CANCER | (38) | 15 | (200) | 100 |
| No | (149) | 59 | | |
| Sin datos | (54) | 21 | | |
| Tipo de cáncer | | | | |
| Colon | (156) | 62 | - | - |
| Recto sigmoidal | (97) | 38 | | |
| Metástasis | | | | |
| No | (168) | 14 | - | - |
| 1 órgano | (39) | 28 | | |
| Más de 1 órgano | (33) | 16 | | |
| Sin datos | (13) | 42 | | |
| Etapas | | | | |
| I - II | (111) | 44 | - | - |
| III - IV | (129) | 51 | | |
| Sin datos | (13) | 5 | | |
| Esquema QT | | | | |
| Irinotecan + 5 Fu | (112) | 44 | - | - |
| Capacitabina | (82) | 32 | | |
| Carboplatino + Otros | (43) | 17 | | |
| Sin datos | (16) | 6 | | |
| Toxicidad | | | | |
| No | (128) | 50 | - | - |
| Grado I - II | (88) | 35 | | |
| Grado IV | (14) | 6 | | |
| Sin datos | (23) | 9 | | |

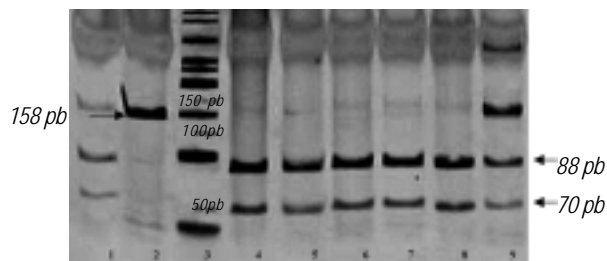


Figura 1. Identificación de genotipos del polimorfismo TS 1494del6, mediante el corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida 6% (29:1). En los carriles 1 y 9 se observa el genotipo heterocigoto; en el carril 2 se identifica el genotipo homocigoto para la delección (banda de 158 pb), en el carril 3 se encuentra el marcador de peso molecular (escalera de 50 pb) y en los carriles 4-8 se observan los genotipos silvestres (bandas 70 pb y 88pb).

Las muestras de ADN, fueron analizadas por duplicado e interpretadas por dos lectores independientes para confirmar los datos de los genotipos.

A partir del conteo génico se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas del marcador en la muestra analizada y se compararon las dos poblaciones por medio de la prueba de χ^2 y Mantel-Haenszel para estratificar variables de potencial efecto confusor.

Para estimar el Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), en el grupo control, se compararon las frecuencias genotípicas observadas con las esperadas mediante la prueba de χ^2 (programa SPSS, v.13.0). En el caso del grupo de pacientes no se realizó el EHW ya que se trata de un grupo previamente seleccionado característica que no necesariamente puede

mostrar EHW. La razón de momios e intervalos de confianza se evaluaron mediante el programa estadístico Epi Info v.3.2.2, empleando la prueba de Yates corregida, con intervalos de confianza de 95% y un error de 5% tomando en cuenta que si dicho intervalo incluye la unidad, no existe diferencia significativa para el riesgo encontrado. Cuando el tamaño de muestra fue menor a 5 se utilizó la prueba exacta de Fisher, los resultados fueron significativos cuando el valor fue $p < 0.05$.

También se realizó un análisis de regresión logística mediante el programa SPSS v.13.0, para identificar factores de riesgo que pueden influir en el desarrollo de CCR.

RESULTADOS

En el grupo de pacientes, la frecuencia del genotipo *6pb+/6pb+* fue de 56% (142/253) y en el grupo control de 46% (91/200); en ambos grupos el heterocigoto (*6pb+/6pb-*) de 26% (66/253) y 43% (87/200) y el polimórfico *6pb-/6pb-* de 18% (45/253) y 11% (22/200) respectivamente. Al comparar el grupo de pacientes con los controles que presentaron el genotipo *6pb-/6pb-*, no se observó diferencia significativa. El alelo *6pb-* en el grupo de pacientes mostró una frecuencia de 31% (156/506) y en el grupo control de 33% (131/400), al análisis estadístico, no hubo diferencias significativas (Cuadro 2). En el grupo control, la frecuencia genotípica

observada no difiere de la esperada por lo que se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (Cuadro 3).

El análisis por distribución de genotipos del polimorfismo *TS 1494del6* de acuerdo a la edad promedio de los pacientes fue estratificado en dos grupos: menores a 50 años (< 50 años) y mayores o iguales a 50 años (≥ 50 años). En pacientes con CCR < 50 años, la distribución del genotipo *6pb+/6pb-*, fue menor respecto al grupo control ($p < 0.05$), por lo que se observó reducción en el riesgo a CCR [razón de momios 0.38 (95% IC 0.18 - 0.79)]. Por otra parte, la distribución del genotipo *6pb-/6pb-* en pacientes < 50 años fue mayor respecto al grupo control ($p < 0.05$); este genotipo mostró un incremento de 2.47 al riesgo de CCR [razón de momios 2.47 (95% IC 0.99 - 6.24)]. En tanto que las distribuciones de los genotipos del polimorfismo *TS 1494del6* en pacientes ≥ 50 años no fueron significativas (Cuadro 4).

Al comparar la distribución de los genotipos del polimorfismo *TS 1494del6* por género. El grupo masculino mostró mayor frecuencia de *6pb+/6pb-* heterocigotos en comparación al grupo control ($p < 0.05$), comportándose como genotipo de protección [razón de momios 0.38 (95% IC 0.20 - 0.7)]. Asimismo, la distribución del genotipo *6pb-/6pb-* fue mayor en pacientes del género masculino, en comparación con el grupo control ($p < 0.05$), observándose como genotipo de riesgo [razón de momios 2.47 (95% IC

Cuadro 2. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *TS 1494del6* en pacientes con CCR y en controles.

| Genotipos | Pacientes (n/total)% | Controles (n)% | χ^2 | Razón de momios (95% IC) | ρ |
|------------------|----------------------|----------------|----------|--------------------------|--------|
| <i>6pb+/6pb+</i> | (142/253) 56 | (91/200) 46 | 1.0 | | |
| <i>6pb+/6pb-</i> | (66/253) 26 | (87/200) 43 | 1.0 | | |
| <i>6pb-/6pb-</i> | (45/253) 18 | (22/200) 11 | 3.6 | 1.8 (1-4) | 0.059 |
| ALELOS | | | | | |
| <i>6pb+</i> | (350/506) 69 | (269/400) 67 | | | |
| <i>6pb-</i> | (156/506) 31 | (131/400) 33 | 0.3 | 0.92 (0.7-1.27) | 0.58 |

Los genotipos *6pb+/6pb+* y *6pb+/6pb-* se tomaron con el mismo riesgo.
IC: Intervalo de confianza. $p < 0.05$: significativo. $p > 0.05$: no significativo.

Cuadro 3. Comparación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo *TS 1494del6* observadas y esperadas en el grupo control.

| Genotipos | Observados | Esperados | χ^2 | ρ |
|------------------|------------|-----------|----------|--------|
| <i>6pb+/6pb+</i> | 91 | 90.45 | | |
| <i>6pb+/6pb-</i> | 87 | 88.10 | | |
| <i>6pb-/6pb-</i> | 22 | 21.45 | 0.0310 | 0.874 |

$\rho < 0.05$: significativo.

0.99 - 6.24)]. Por otra parte, las distribuciones de genotipos asociadas al género femenino, no fueron significativas (Cuadro 5).

El análisis por edad-género y distribución de genotipos del polimorfismo *TS 1494del6*, mostró mayor frecuencia en controles masculinos heterocigotos \geq a 50 años en comparación con el grupo de pacien-

tes ($p < 0.05$), comportándose como genotipo de protección [razón de momios 0.36 (0.16 - 0.81)]. Este mismo comportamiento, se observó en controles del género femenino $<$ a 50 años ($p < 0.05$), [razón de momios 0.25 (0.06 -0.85)] (Cuadro 6).

Mediante el análisis de regresión logística se observó que la edad y el género son factores de riesgo

Cuadro 4. Clasificación de los grupos de estudio por edad y distribución de genotipos del polimorfismos *TS 1494del6*.

| Genotipos | Pacientes | | Controles | |
|------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|
| | $<$ a 50 años n (%) | \geq a 50 años n (%) | $<$ a 50 años n (%) | \geq a 50 años n (%) |
| <i>6pb+/6pb+</i> | 35 (25) | 107 (75) | 50 (55) | 41 (45) |
| <i>6pb+/6pb-</i> | 15 (23) | 51 (77) | 49 (56) | 38 (44) |
| <i>6pb-/6pb-</i> | 15 (28) | 30 (72) | 12 (55) | 10 (45) |

Comparaciones entre pacientes y controles: $<$ 50 años

6pb+/6pb-: χ^2 6.98; razón de momios 0.38 (0.18 - 0.79); $p = 0.008$

6pb-/6pb-: χ^2 5.32; razón de momios 2.47 (0.99 - 6.24); $p = 0.049$

Comparaciones entre pacientes y controles: \geq 50 años no fueron significativas

Razón de momios menor 1 ($p < 0.05$) genotipo de protección; razón de momios mayor 1 ($p < 0.05$) genotipo de riesgo.

Cuadro 5. Clasificación de los grupos de estudio por género y distribución de genotipos del polimorfismos *TS 1494del6*.

| Genotipos | Pacientes | | Controles | |
|------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | Masculino n (%) | Femenino n (%) | Masculino n (%) | Femenino n (%) |
| <i>6pb+/6pb+</i> | 81 (56) | 61 (57) | 39 (47) | 52 (44) |
| <i>6pb+/6pb-</i> | 34 (23) | 32 (30) | 37 (45) | 50 (43) |
| <i>6pb-/6pb-</i> | 31 (21) | 14 (13) | 7 (8) | 15 (13) |
| Total | 146 (100) | 107(100) | 83(100) | (117) |

Comparaciones entre pacientes y controles del género masculinos

6pb+/6pb-: χ^2 10.24; razón de momios 0.38 (0.20 - 0.7); $p = 0.001$

6pb-/6pb-: χ^2 5.37; razón de momios 2.93 (1.18 - 8.25); $p = 0.02$

Comparaciones entre pacientes y controles del género femenino no fueron significativas

Razón de momios menor 1 ($p < 0.05$) genotipo de protección; razón de momios mayor 1 ($p < 0.05$) genotipo de riesgo.

Cuadro 6. Clasificación de los grupos de estudio por edad/género y distribución de genotipos del polimorfismos *TS 1494del6*.

| Genotipos | Pacientes | | | | Controles | | | |
|------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|
| | Masculino | | Femenino | | Masculino | | Femenino | |
| | $<$ 50 años n (%) | \geq 50 años n (%) | $<$ 50 años n (%) | \geq 50 años n (%) | $<$ 50 años n (%) | \geq 50 años n (%) | $<$ 50 años n (%) | \geq 50 años n (%) |
| <i>6pb+/6pb+</i> | 19 (56) | 62 (58) | 16 (64) | 45 (55) | 17 (46) | 22 (48) | 33 (45) | 19 (44) |
| <i>6pb+/6pb-</i> | 11 (23) | 23 (22) | 4 (16) | 28 (34) | 17 (46) | 20 (43) | 32 (43) | 18 (42) |
| <i>6pb-/6pb-</i> | 10 (21) | 21 (20) | 5 (20) | 9 (11) | 3 (8) | 4 (9) | 9 (12) | 6 (14) |
| Total | 40 (100) | 106(100) | 25(100) | 82(100) | 37(100) | 46(100) | 74(100) | 43(117) |

Comparaciones entre pacientes y controles:

Masculinos \geq a 50 años. *6pb+/6pb-*: χ^2 6.4; razón de momios 0.36 (0.16 -0.81); $p = 0.01$

Femeninos $<$ a 50 años. *6pb+/6pb-*: χ^2 4.87; razón de momios 0.25 (0.06 -0.85); $p = 0.02$

Razón de momios menor 1 ($p < 0.05$) genotipo de protección; razón de momios mayor 1 ($p < 0.05$) genotipo de riesgo.

Cuadro 7. Análisis de regresión logística en pacientes con CCR.

| VARIABLES | B | DE | Wald | p | Razón de momios | IC (95%) |
|---------------------------|--------|-------|--------|-------|-----------------|-------------|
| Edad | 0.454 | 0.197 | 5.30 | 0.021 | 1.57 | 1.07-2.31 |
| Género | 0.764 | 0.248 | 9.45 | 0.002 | 2.14 | 1.31-3.49 |
| <i>1494del6</i> | 0.116 | 0.299 | 0.150 | 0.698 | 1.12 | 0.625-2.01 |
| <i>silvestre/1494del6</i> | -0.868 | 0.223 | 15.206 | 0.000 | 0.420 | 0.271-0.649 |
| constante | 0.151 | 0.351 | 0.187 | 0.666 | 0.859 | |

Edad (< a 50 años, ≥ a 50 años), género (masculino, femenino), polimorfismo *TS 1494del6* (*6pb-/6pb-* y *6pb+/6pb-* + *6pb+/6pb+*). B (coeficiente B), DE (desviación estándar), p (valor de p; < 0.05 significativo), IC (intervalos de confianza).

Cuadro 8. Proporción genotípica del polimorfismo *TS 1494del6* en pacientes con y sin antecedentes heredofamiliares.

| Genotipos | Se desconoce | | Sin antecedentes | | Cáncer CCR | | Cáncer | |
|------------------|--------------|-------|------------------|-------|------------|-------|--------|-------|
| | n | (%) | n | (%) | n | (%) | n | (%) |
| <i>6pb+/6pb+</i> | 31 | (58) | 84 | (57) | 5 | (42) | 22 | (58) |
| <i>6pb+/6pb-</i> | 12 | (22) | 39 | (26) | 5 | (42) | 10 | (26) |
| <i>6pb-/6pb-</i> | 11 | (20) | 26 | (17) | 2 | (6) | 6 | (16) |
| Total | 54 | (100) | 149 | (100) | 12 | (100) | 38 | (100) |

Al comparar los grupos de estudio no hubo diferencia significativa.

Cuadro 9. Distribución genotípica del polimorfismo *TS 1494del6* y presencia de metástasis.

| Genotipos | Sin Metástasis | | Con Metástasis | | Razón de momios (IC 95%) p |
|------------------|----------------|-------|----------------|-------|----------------------------|
| | n | (%) | n | (%) | |
| <i>6pb+/6pb+</i> | 90 | (54) | 52 | (72) | 1.0 |
| <i>6pb+/6pb-</i> | 53 | (31) | 0 | (0) | 1.0 |
| <i>6pb-/6pb-</i> | 25 | (15) | 20 | (28) | 2.2 (1.06 – 4.51) 0.03 |
| Total* | 168 | (100) | 72 | (100) | |

Los genotipos homocigotos silvestre y heterocigotos se tomaron con el mismo riesgo. IC: Intervalo de confianza, p < 0.05: significativo, p > 0.05: no significativo.

* En 13 pacientes se desconoce el dato.

Cuadro 10. Distribución genotípica del polimorfismo *TS 1494del6* por etapa de cáncer.

| Genotipos | Sin datos n (%) | Estadios | | Razón de momios (IC95%) p |
|------------------|--------------------|---------------|-----------------|------------------------------|
| | | I-II n (%) | III-IV n (%) | |
| <i>6pb+/6pb+</i> | 0 | 64 (57) | 78 (60) | 1.0 |
| <i>6pb+/6pb-</i> | 13 (100) | 34 (31) | 19 (15) | 1.0 |
| <i>6pb-/6pb-</i> | 0 | 13 (12) | 32 (25) | 2.49 (1.18 - 5.47) 0.01 |
| Total | 13(100) | 111 (100) | 129 (100) | |

Los genotipos homocigotos silvestre y heterocigotos se tomaron con el mismo riesgo. IC: Intervalo de confianza. p < 0.05: significativo. p > 0.05: no significativo.

para desarrollar CCR. Adicionalmente, individuos portadores del genotipo *6pb+/6pb-* mostraron protección al riesgo de CCR (Cuadro 7).

Por otra parte, la proporción de pacientes con antecedentes heredofamiliares de CCR, portadores de los genotipos *6pb+/6pb+* y *6pb+/6pb-* fue de 42% (5/12) y para el *6pb-/6pb-* de 16% (2/12). En tanto que la proporción de los pacientes con antecedentes familiares con otro tipo de cáncer, portadores de los genotipos *6pb+/6pb+* fue de 58% (22/38), *6pb+/6pb-* de 26% (10/38) y *6pb-/6pb-* de 16% (6/38), que al

compararlos entre sí no mostraron diferencia estadística (Cuadro 8).

El análisis por distribución de genotipos del polimorfismo *TS 1494del6* y tipo de cáncer, no mostró diferencia significativa.

El genotipo *6pb-/6pb-* en pacientes con metástasis fue mayor (p < 0.05) que en los pacientes sin metástasis, comportándose como genotipo de riesgo [razón de momios 2.2 (1.06 - 4.51)] (Cuadro 9).

La frecuencia del genotipo *6pb-/6pb-* en pacientes en etapas III-IV fue mayor (p < 0.05), en compara-

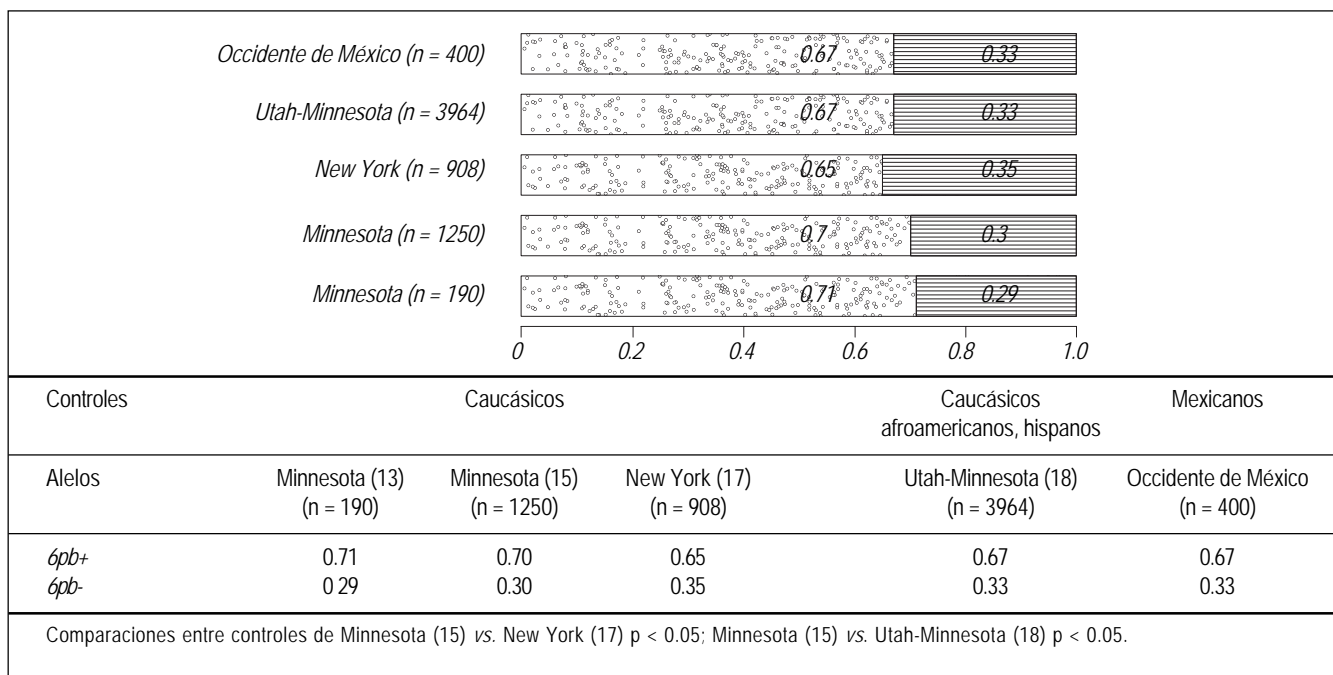


Figura 2. Comparación de la frecuencia alélica del polimorfismo TS 1494del6 en controles del Occidente de México con otras poblaciones.

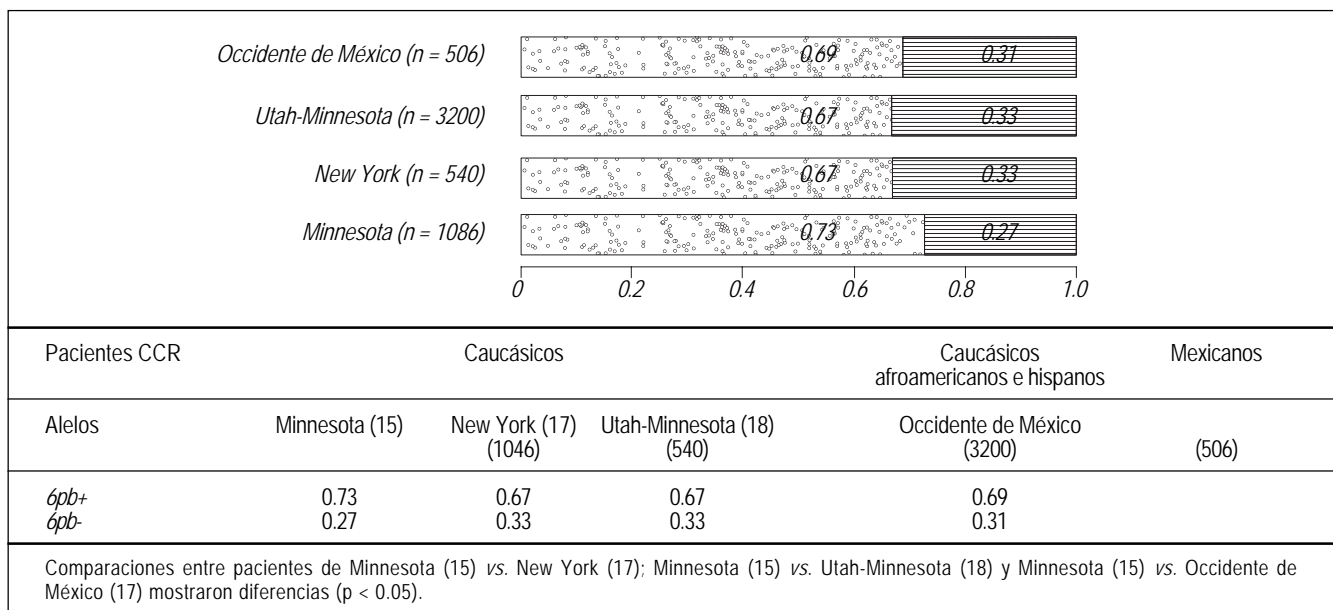


Figura 3. Comparación de la frecuencia alélica del polimorfismo TS 1494del6 en pacientes con CCR del Occidente de México con otras poblaciones.

ción a los pacientes en etapas I-II, comportándose como genotipo de riesgo [razón de momios 2.49 (1.18 - 5.47)] (Cuadro 10).

Las frecuencias alélicas del polimorfismo *TS 1494del6* de controles y pacientes observadas en el presente estudio fueron comparadas con las observadas en otras poblaciones, se muestran en las figuras 2 y 3 respectivamente.

DISCUSIÓN

La enzima TYMS participa en la regulación de nucleótidos requeridos en la replicación del ADN, así como en el metabolismo de folatos. Al respecto diversos estudios relacionados con CCR, han demostrado la importancia de la ingesta adecuada de ácido fólico para su prevención. Ya que se ha observado

que niveles bajos de folatos están asociados al desarrollo de cáncer, debido a su participación en la síntesis de nucleótidos.^{23,24} En el ADN la deficiencia de TYMS puede provocar fracturas cromosómicas debido a la incorporación de uracilo en lugar de timina.^{13,15} Además la TYMS tiene efecto antiproliferativo, mecanismo utilizado por varios quimioterapéuticos que actúan como antimetabolitos tales como el 5-FU, capacitabina y ratitrexed. Así, se ha observado que algunos pacientes son resistentes a estos quimioterapéuticos, debido a la acción de las variantes alélicas en el gen *TYMS*, que conducen a la variabilidad en los niveles de la enzima y consecuentemente se pueden observar manifestaciones de toxicidad en pacientes con CCR tratados con 5-FU.^{13,15} Por otra parte, se han caracterizado los mecanismos de regulación del gen *TYMS*, y también se ha identificado un polimorfismo en la región 3'UTR denominado *TS 1494del6*, en donde el genotipo *6pb-/6pb-* se asocia al CCR. Sin embargo, existen evidencias contradictorias respecto a esta asociación.^{9,14,15,19,20}

En los resultados del presente estudio en pacientes con CCR y controles no se observó asociación alélica y genotípica del polimorfismo *TS 1494del6*. Resultados similares fueron observados en población caucásica (residentes de Minnesota) por Urlich CM, *et al.*¹⁵ Aunque la población control de mestizos mexicanos fue menor, la proporción de genotipos fue similar en su distribución con una frecuencia de *6pb+/6pb-* de 43% y en caucásicos de 40%; en tanto que para los homocigotos *6pb-/6pb-* de 11% y en caucásicos de 10%. A pesar de no observar asociación directa con este polimorfismo en la muestra analizada, al estratificar los grupos por edad y genotipo, se observó disminución en el riesgo en pacientes < a 50 años, portadores del genotipo heterocigoto. Asimismo, el genotipo *6pb-/6pb-* en pacientes de la misma edad se manifestó de riesgo. Lo anterior sugiere que la edad asociada con el genotipo *6pb-/6pb-* aumenta 2.47 veces el riesgo para el desarrollar CCR en la población mestiza mexicana. Una explicación a los resultados observados, probablemente se deba a una deficiencia en los sistemas de reparación no adecuados para remover los aductos generados por factores ambientales tales como humo de tabaco, contaminación y dieta entre otros, que inducen daño al ADN, lo que podría deberse a la deficiencia en la actividad de la TYMS que participa en la síntesis y reparación del ADN. Adicionalmente en tumores de pacientes con CCR se ha descrito que el genotipo *6pb-/6pb-* se encuentra asociado con la disminución en los niveles de expresión de la proteína, debido a un incremento de la inestabilidad del ARNm. Por otro lado,

la disminución en los niveles de TYMS conlleva a un desequilibrio de nucleótidos que resulta en un incremento de incorporación de uracilo en las células en replicación provocando proliferación de células malignas y finalmente el desarrollo de CCR.^{9,12-15}

Cabe mencionar que, aunque las características generales de los pacientes no fueron parte de los objetivos del presente estudio, se observó que 74% pacientes fueron \geq a 50 años, datos que no difieren con otros autores, en donde la incidencia de CCR es mayor a partir de los 50 años.^{25,26} En este sentido, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer, menciona que la edad media para el diagnóstico de CCR se sitúa entre los 67 años de edad.^{27,28} Por otra parte, se ha descrito que para el desarrollo de cáncer se requieren de 6-7 acontecimientos en un periodo de 20 a 40 años, lo que podría explicar que en la mayoría de los pacientes la incidencia sea a partir de los 50 años.²⁸ Sin embargo, las personas jóvenes no están excluidas de padecer cáncer de colon, ya que en México actualmente se diagnostican personas cada vez más jóvenes con CCR en etapas avanzadas.²⁹

Al clasificarse por género, en el grupo de pacientes presentó leve predominio de hombres (58%) respecto al grupo control (42%), tal vez lo anterior se deba a que el grupo control fue seleccionado al azar y en población abierta. La distribución por género en el grupo de pacientes fue similar a la descrita a nivel mundial en donde la proporción de hombres/mujeres fue de 1.2:1.^{29,30} La asociación del género con el polimorfismo *TS 1494del6*, mostró reducción en el riesgo al desarrollo de CCR en hombres portadores del genotipo *6pb+/6pb-*, datos que concuerdan con otros autores como Chen, *et al.*¹⁷ y Urlich, *et al.*^{15,18} En cambio el genotipo *6pb-/6pb-* mostró incremento en el riesgo de dos veces en hombres, lo que sugiere que este polimorfismo es importante en el desarrollo de CCR en el género masculino de la población mexicana. Sin embargo, al analizar la relación del polimorfismo *TS 1494del6* con edad y género, el genotipo heterocigoto se manifestó como protector de riesgo para CCR en hombres mayores a 50 y en mujeres menores de 50 años. Es probable que estos resultados se deban al número de pacientes incluidos en el estudio.

Al analizar los antecedentes heredofamiliares (primer y segundo grado) en el grupo CCR, se observó una frecuencia de 5% en pacientes con antecedentes de cáncer de colon y 15% con cualquier tipo de cáncer. Frecuencias que no difieren con lo descrito en la literatura.^{28,31} El análisis de antecedentes familiares y su asociación con el polimorfismo no mostró diferencias significativas.

Por otra parte, se sabe que un 10 a 15% de los pacientes desarrollan metástasis debido a la diseminación hematológica.³² En nuestro estudio se observó la presencia de metástasis en 13% de los pacientes, así como un riesgo de 2.2 veces mayor de desarrollar metástasis en pacientes portadores del genotipo *6pb-/6pb-*. Lo anterior concuerda con lo descrito por Zhang, *et al.*³³ en pacientes con cáncer gástrico. Probablemente los niveles menores de expresión de TYMS faciliten la migración celular a través de la vía linfática y de esta manera desarrollar metástasis. Por otra parte, se conoce que el estadio clínico es un factor importante para el pronóstico del paciente. En el presente estudio se observó que la etapa III-IV fue la más frecuente (51%), dato que coincide con lo descrito por Duran, *et al.*²⁹ en donde observó en los mismos estadios una frecuencia de 57.5%. En este sentido, se ha descrito una tasa de 50-75% de sobrevida a cinco años para el estadio II, de 5-50% para el estadio III y de 10% para el estadio IV. Los estudios de Sargarbarker³⁴ y Han, *et al.*³⁵ señalan que a mayor profundidad de invasión de la pared colorrectal, mayor probabilidad de metástasis y consecuentemente mal pronóstico. Al analizar la asociación con el polimorfismo, se observó un incremento en el riesgo de 2.49 en pacientes con estadios III-IV portadores del genotipo *6pb-/6pb-*. Al respecto, los resultados anteriores indican que los niveles de expresión de la TS pueden facilitar de alguna manera la extensión de las células malignas y por lo tanto poder predecir la etapa en CCR.³⁶

Al comparar las frecuencias alélicas de controles y pacientes del presente estudio con las descritas en otras poblaciones, los controles del Occidente de México no mostraron diferencias. Sin embargo, el grupo de pacientes sí mostró diferencias con las frecuencias descritas en la población de Minnesota.¹⁵ Lo que indica que las frecuencias en la población general se mantienen; sin embargo, en los pacientes existe variabilidad genética que puede estar modulada por diferentes factores tanto ambientales como genéticos con predisposición al desarrollo de CCR, sugiriendo como principal al gen TYMS.

Por otra parte, una de las limitaciones del presente estudio fue la falta de estudios bioquímicos en cuanto a la actividad enzimática y el nivel de folatos, que aunado a los polimorfismos del gen TYMS podrían dar conocimientos sobre el mecanismo de acción del gen TYMS en el desarrollo del CCR. También se sugiere analizar otros polimorfismos en este gen y en otros genes relacionados en la vía metabólica de los folatos que pudieran ser un factor importante en el tratamiento y prevención de cáncer CCR.

A pesar de no haber observado una diferencia significativa del polimorfismo *TS 1494del6* entre pacientes y controles de manera general; al estratificar los grupos de estudio por edad, género masculino, estadio III-IV y presencia de metástasis el genotipo *6pb-/6pb-* se manifestó como de riesgo para el desarrollo de CCR. En conclusión el polimorfismo *TS 1494del6* participa de manera importante en el desarrollo del CCR en la población del Occidente de México.

REFERENCIAS

1. Mohar A, Frias-Mendivil M, Suchil-Bernal L, et al. Descriptive epidemiology cancer in the National Cancer Institute of Mexico. *Salud Pública Mex* 1997; 39: 253-358.
2. <http://www.ssa.gob.mx>. Secretaría de Salud México. Fecha de último acceso: agosto de 2007.
3. <http://www.ssj.gob.mx>. Secretaría de Salud Jalisco. Registro estatal de cáncer en Jalisco. Fecha de último acceso: agosto de 2007.
4. Kim SA, Lee JH, Park SY, et al. Depressed-type of early colon cancer with extensive lymph node metastasis. *Yonsei Med J* 2007; 48: 135-8.
5. Kyoung-Jin S, Croxford R, Yates Z, et al. Effect of the methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism on Chemosensitivity of Colon and Breast Cancer Cells to 5-Fluorouracil and Methotrexate. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 134-44.
6. Kralovanszky J, Adleff V, Hitre E, et al. Pharmacogenetic studies on the prediction of efficacy and toxicity of fluoropyrimidine-based adjuvant therapy in colorectal cancer. *Magy Onkol* 2007; 51: 113-25.
7. Spindler KL, Nielsen JN, Lindebjerg J, Jakobsen A. Germline Polymorphisms may Act as Predictors of Response to Preoperative Chemoradiation in Locally Advanced T3 Rectal Tumors. *Dis Colon Rectum* 2007 (en prensa).
8. Hitre E, Budai B, Adleff V, et al. Influence of thymidylate synthase gene polymorphisms on the survival of colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 723-30.
9. Dotor E, Cuatrecasas M, Martinez-Inesita M, et al. Tumor thymidylate synthase 1494del6 genotype as a prognostic factor in colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2006; 10: 1603-11.
10. Tsuji T, Hidaka S, Nakagoe T, et al. Polymorphism in the Thymidylate Synthase Promoter Enhancer Region. Is Not an Efficacious Marker for Tumor Sensitivity to 5-Fluorouracil-based Oral Adjuvant Chemotherapy in Colorectal Cancer? *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3700-04.
11. Sharp L, Little J. Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE Review. *Am J Epidemiol* 2004; 159: 423-43.
12. Uchida K, Hayashi K, Kawakami K, et al. Loss of heterozygosity at the thymidylate synthase (TS) locus on chromosome 18 affects tumor response and survival in individuals heterozygous for a 28-bp polymorphism in the TS gene. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 433-9.
13. Ulrich CM, Bigler J, Velicer CM, et al. Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 1381-5.
14. Lenz HJ, Zhang W, Zahedy S, et al. A 6 base-pair deletion in the 3'UTR of the thymidylate synthase (TS) gene predicts TS

- mRNA expression in colorectal tumors. A possible candidate gene for colorectal cancer risk. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2002; 43: 660.
15. Ulrich CM, Bigler J, Bostick R, et al. Thymidylate synthase promoter polymorphism, interaction with folate intake and risk of colorectal adenomas. *Cancer Res* 2002; 62: 3361-4.
 16. Mandola MV, Stoecklacher J, Zhang W, et al. A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS RNAm levels. *Pharmacogenetic* 2004; 14: 319-27.
 17. Chen J, Hunter DJ, Stampfer MJ, et al. Polymorphism in the Thymidylate Synthase Promoter Enhancer Region Modifies the Risk and Survival of Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 958-62.
 18. Ulrich CM, Curtin K, Potter JD. Polymorphisms in the Reduced Folate Carrier, Thymidylate Synthase, or Methionine Synthase and Risk of Colon Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 11: 2509-16.
 19. Zhai X, Gao J, Hu Z, et al. Polymorphisms in thymidylate synthase gene and susceptibility to breast cancer in a Chinese population: a case-control analysis. *BMC Cancer* 2006; 6: 138.
 20. Shi Q, Zhang Z, Neumann A, et al. Case-control analysis of thymidylate synthase polymorphisms and risk of lung cancer. *Carcinogenesis* 2005; 26: 649-56.
 21. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
 22. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994; 17: 914-21.
 23. Konings EJ, Goldbohm RA, Brants HA, Saris WH, van den Brandt PA. Intake of dietary folate vitamins and risk of colorectal carcinoma: results from The Netherlands Cohort Study. *Cancer* 2002; 95: 1421-33.
 24. Su LJ, Arab L. Nutritional status of folate and colon cancer risk: evidence from NHANES I epidemiologic follow-up study. *Ann Epidemiol* 2001; 11: 65-72.
 25. Colorectal cancer. http://www.cchealth.org/health_data/hospital_council_2007. Fecha de ultimo acceso: agosto de 2007.
 26. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 43-66.
 27. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB (eds.). World Health Organization. Cancer incidence in five continents. Vol. VIII. IARC, Scientific Publications N° 155 (2002).
 28. Alonso A, Moreno S, Valiente A, et al. Genetics mechanisms in the hereditary predisposition to colorectal cancer. *Anales Sis San Navarra* 2006; 26: 59-76.
 29. Duran O, Gonzalez O, Cisneros L, et al. Experience in the management of colorectal cancer in the Centro Medico Nacional de Occidente (National Medical Center of the West). *Cir Gen* 2000; 22: 153-8.
 30. Hendon S, DiPalma J. US Practices for colon cancer screening. *Keio J Med* 2005; 54: 179-83.
 31. Lynch H, Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 919-32.
 32. Kumar V, Abul K, Nelson F. Patología estructural y funcional. 7a Ed. España: Ed Elsevier; 2005. Acceso en línea.
 33. Zhang J, Cui Y, Luang G, et al. Association of the thymidylate synthase polymorphisms with esophageal squamous cell carcinoma and gastric cardiac adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2479-85.
 34. Surgbarker P. Carcinoma of the colon. Prognosis and operative choice. *Curr Prob Surg* 1998; 28: 754-826.
 35. Han C, Sheen SM. Obstruction and perforation in colorectal adenocarcinoma: An analysis of prognosis and current trends. *Surgery* 2000; 127: 370-6.
 36. Aschele C, Debernardis D, Tunesi G, et al. Thymidylate synthase protein expression in primary colorectal cancer compared with the corresponding distant metastases and relationship with the clinical response to 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4797-802.

Reimpresos:

Dra. Martha Patricia Gallegos-Arreola

Centro de Investigación Biomédica de Occidente

Sierra Mojada 800,

Colonia Independencia,

44340, Guadalajara, Jal.

Fax: 52 33 3618 1756

Correo electrónico: marthaga@foreigner.class.udg.mx

Recibido el 30 de mayo de 2007.

Aceptado el 19 de octubre de 2007.