

INDICE

| | |
|---|----------|
| 1.-INTRODUCCION..... | 6 |
| 1.1.-Polimorfismos genéticos. Importancia de su estudio..... | 11 |
| 1.2.-Carcinogénesis colónica..... | 16 |
| 1.3.-Genes de detoxificación. Las Glutación Transferasas..... | 26 |
| 1.3.1.- La familia de las Glutación Transferasas..... | 26 |
| 1.3.2.-Papel de las GSTs en reacciones de detoxificación..... | 28 |
| 1.3.3.-Familias GSTM y GSTT y sus polimorfismos..... | 32 |
| 1.3.4.-Polimorfismos en GSTM1 y GSTT1 y susceptibilidad al cáncer..... | 34 |
| 1.3.5.-Nomenclatura de polimorfismos en GSTs..... | 37 |
| 1.4.-La familia del citocromo P450(CYP). Genes de activación metabólica..... | 39 |
| 1.4.1.-El gen CYP1A1 y sus polimorfismos..... | 41 |
| 1.4.2.-Nomenclatura de polimorfismos en CYP1A1..... | 45 |
| 1.5.-El gen MTHFR. Metabolismo de folatos..... | 46 |
| 1.5.1.-Nomenclatura de polimorfismos en MTHFR..... | 51 |
| 1.6.-Polimorfismos en el cáncer colorrectal. Implicaciones clínicas..... | 52 |
| 1.6.1.-Polimorfismos en genes de baja penetrancia..... | 53 |
| 1.6.2.-Polimorfismos y respuesta a fármacos..... | 59 |

| | |
|---|-----------|
| 2.-HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS..... | 62 |
| 3.-MATERIAL Y METODOS..... | 65 |
| 3.1.-Diseño del estudio..... | 65 |
| 3.2.-Población muestral..... | 66 |
| 3.2.1.-Población de casos..... | 66 |
| 3.2.2.-Población de controles..... | 66 |
| 3.3.-Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras biológicas..... | 67 |
| 3.4.-Variables clínicas y anatomopatológicas..... | 67 |
| 3.5.-Material inventariable..... | 69 |
| 3.6.-Material fungible y reactivos..... | 71 |
| 3.7.-Técnicas empleadas..... | 73 |
| 3.7.1.-Obtención y purificación de ácidos nucleicos..... | 73 |
| 3.7.2.-Polimorfismos en GSTM1 y GSTT1..... | 75 |
| 3.7.3.-Polimorfismos en CYP1A1. Amplificación RFLP Y ASO..... | 79 |
| 3.7.3.1.-Polimorfismo CYP1A1*2. Amplificación y RFLP con Msp I..... | 80 |
| 3.7.3.2.-Polimorfismo CYP1A1*3. ASO..... | 84 |
| 3.7.4.-Polimorfismo en MTHFR. Amplificación y RFLP..... | 89 |
| 3.8.-Método estadístico..... | 93 |

| | |
|--|------------|
| 4.-RESULTADOS..... | 95 |
| 4.1.-Características epidemiológicas y clínicas de las poblaciones de casos y controles estudiadas..... | 95 |
| 4.1.1.-Variable edad..... | 96 |
| 4.1.2.-Variable género..... | 98 |
| 4.1.3.-Variable índice de masa corporal..... | 99 |
| 4.1.4.-Variable hábitos tabáquicos..... | 101 |
| 4.1.5.-Variable hábitos de ingesta alcohólica..... | 103 |
| 4.1.6.-Variable localización tumoral..... | 105 |
| 4.1.7.-Variable tipo histológico del tumor..... | 107 |
| 4.1.8.-Variable estadiaje de Dukes del tumor..... | 108 |
| 4.2.-Análisis de los genotipos estudiados en los genes: <i>GSTM1</i>, <i>GSTT1</i>, <i>CYP1A1</i> y <i>MTHFR</i> y sus frecuencias en las poblaciones de casos y controles..... | 109 |
| 4.2.1.-Polimorfismo en <i>GSTM1</i> y su frecuencia en la población..... | 109 |
| 4.2.2.-Polimorfismo en <i>GSTT1</i> y su frecuencia en la población..... | 111 |
| 4.2.3.-Polimorfismos en <i>CYP1A1</i> alelos , <i>CYP1A1*2</i> y <i>CYP1A1*3</i> y sus frecuencias en la población..... | 113 |
| 4.2.4.-Polimorfismo en <i>MTHFR</i> y su frecuencia en la población..... | 117 |
| 4.3.-Análisis del riesgo de presencia de neoplasia colorrectal por asociación de variables..... | 119 |
| 4.3.1.-Análisis estadístico de la asociación de dos genotipos de riesgo..... | 119 |

| | |
|---|------------|
| 4.3.2.-Análisis estadístico de asociaciones entre un genotipo de riesgo y una variable de riesgo epidemiológico..... | 120 |
| 4.3.3.-Análisis estadístico de la asociaciones entre un genotipo de riesgo y la variable clínica de localización tumoral..... | 121 |
| 4.3.4.-Análisis estadístico de la relación entre la variable género y localización tumoral..... | 122 |
| 4.4.-Análisis del odds ratio en función de los grupos de edad y de genotipos de riesgo..... | 123 |
| 4.4.1.-Análisis del odds ratio por grupos de edad y un genotipo de riesgo..... | 123 |
| 4.4.2.-Análisis del odds ratio por grupos de edad y combinaciones de genotipos de riesgo..... | 124 |
| 5.-DISCUSION..... | 126 |
| 5.1.-Variable edad..... | 126 |
| 5.2.-Variable género..... | 127 |
| 5.3.-Variable índice de masa corporal..... | 127 |
| 5.4.-Variable hábitos tabáquicos..... | 128 |
| 5.5.-Variable hábitos de ingesta alcohólica..... | 129 |
| 5.6.-Variable localización tumoral..... | 130 |
| 5.7.-Variable tipo histológico del tumor..... | 131 |
| 5.8.-Variable estadiaje de Dukes del tumor..... | 132 |
| 5.9.-Polimorfismo en GSTM1 | 134 |
| 5.10.-Polimorfismo en GSTT1 | 139 |

| | |
|--|------------|
| 5.11.-Polimorfismos en <i>CYP1A1</i> alelos , <i>CYP1A1*2</i> y <i>CYP1A1*3</i>..... | 142 |
| 5.12.-Polimorfismo en <i>MTHFR</i>.Folatos y carcinogénesis colónica..... | 145 |
| 5.13.-Presencia de neoplasia colorrectal por asociación de dos variables..... | 159 |
| 5.13.1- Presencia de neoplasia colorrectal por asociación de genotipos de riesgo..... | 159 |
| 5.13.2.- Presencia de neoplasia colorrectal por asociación entre un genotipo de riesgo y una variable de riesgo epidemiológico..... | 164 |
| 5.14.-Riesgo en función de los grupos de edad y de genotipos de riesgo..... | 165 |
| 5.15.-Técnicas analíticas..... | 169 |
| 5.16.- Diseño del estudio..... | 171 |
| 6.-CONCLUSIONES..... | 172 |
| 7.INDICES..... | 174 |
| 7.1.-Índice de Abreviaturas..... | 174 |
| 7.2.-Índice de figuras..... | 176 |
| 7.3.-Índice de tablas..... | 178 |
| 8.-BIBLIOGRAFIA..... | 181 |
| 9.-RESUMEN..... | 205 |
| 10.-EPILOGO..... | 211 |

En Alicante Enero 2005

1.-INTRODUCCION

Todos percibimos la variación humana existente al contemplar las diferencias en los rasgos físicos de quienes nos rodean. Los profesionales sanitarios atribuyen con frecuencia a las variaciones fenotípicas individuales, las diferencias en la evolución de pacientes o de la propensión a procesos patológicos. Hoy, las causas moleculares responsables de estas variaciones empiezan a ser desveladas y todos debemos ser conscientes de que esta nueva luz puede contribuir a cambiar sustancialmente el estado de salud del individuo.

El proyecto Genoma Humano ha proporcionado conocimientos y herramientas para una comprensión más completa del ser humano; el objetivo conseguido, de disponer de la secuencia de todos los genes, ha traído consigo nuevas percepciones. Una de ellas es la extraordinaria variabilidad interindividual e interracial de nuestro código genético y de las consecuencias que esta variabilidad tiene en la salud y en la enfermedad.

La primera aplicación clínica en oncología de los avances en genética molecular, se basa en el diagnóstico presintomático de mutaciones en genes responsables de síndromes de cáncer hereditario, como los de Lynch tipos I y II. Las patologías oncológicas hereditarias causadas por genes de elevada penetrancia, representan entre 3-10% de los casos.

Pero los tumores colorrectales que afectan mayoritariamente a las personas, son esporádicos; en ellos pensamos al centrar el objetivo de la presente Tesis Doctoral: en contribuir a determinar qué genes desempeñan un papel importante en la carcinogénesis colónica y qué personas, en base a sus genotipos, tienen un mayor riesgo de padecer la enfermedad y aportar algunas respuestas a las bases biológicas de la enfermedad con el ánimo de conseguirlo por medio de herramientas y técnicas accesibles a las estructuras sanitarias de nuestro País.

De los diferentes procesos que afectan a la carcinogénesis colónica: Activación metabólica - Detoxificación metabólica - Metabolismo de folatos (síntesis y metilación de ADN) - Reparación de lesiones en el ADN - Daño oxidativo mitocondrial y nuclear - Regulación del ciclo celular y Apoptosis, decidimos comenzar por el estudio de las variaciones en cuatro genes: **GSTM1, GSTT1, CYP1A1 y MTHFR** que intervienen en los cuatro primeros procesos. Los tres primeros porque son los agentes químicos, endógenos y exógenos, los principales agentes causales de la carcinogénesis colónica. El último, por su relación con los hábitos dietéticos y las implicaciones en la epigenética del cáncer colorrectal y los mecanismos de integridad, estabilidad, síntesis y reparación del ADN

El estudio de Epidemiología Molecular que presentamos se concibió, tras revisión bibliográfica como un trabajo preliminar, dado que no se tenía experiencia previa. Se centró en una población, la de la Vega Baja de Alicante, por cuanto sabíamos por el Servicio de Cirugía del Hospital Vega Baja de Orihuela que la población de afectados de adenocarcinomas colorrectales era numerosa y nos permitiría constituir una amplia población de casos en un tiempo determinado. Por otra parte, la logística de recogida y transporte de las muestras quedaba garantizada por la implicación de la Dra Paloma Luri, así como la recogida de los informes clínicos de los pacientes. Para el desarrollo de la parte analítica, determinaciones de biología molecular, se contaba con equipamiento adecuado y experiencia previa.

El trabajo de Tesis se presenta en cuatro grandes bloques. En la **Introducción** se ha realizado una revisión de la carcinogénesis colónica, bajo un punto de vista molecular, de los genes y mecanismos implicados.

Hemos centrado la revisión en aquellos genes sobre los que se iba a desarrollar el trabajo experimental que elegimos por los criterios que anteriormente hemos expuesto. Al final de esta introducción hacemos referencia a las implicaciones clínicas del análisis de polimorfismos genéticos en una doble vertiente, la que permite definir poblaciones o sujetos con riesgo y la de la importancia de los polimorfismos en la respuesta a los tratamientos farmacológicos dado que algunos genes que intervienen como factores de riesgo como *MTHFR* son también determinantes de la respuesta a fármacos empleados en el tratamiento de las neoplasias colorrectales.

En el segundo bloque: **Hipótesis de trabajo y Objetivos - Material y Métodos**, definimos la hipótesis y los objetivos del presente trabajo. Describimos la población de casos (pacientes operados de cáncer colorrectal) y controles (pacientes con procesos no tumorales) de la misma área geográfica, Vega Baja de Alicante; las variables clínicas y epidemiológicas que hemos recogido. Y por último, describimos las técnicas analíticas de biología molecular, reactivos y equipamiento empleado en la realización de la parte experimental.

En el tercer bloque **Resultados - Discusión y Conclusiones**, se exponen los resultados obtenidos en forma de tablas y representación gráfica y se discuten los resultados obtenidos para responder a las hipótesis planteadas.

Por último, en el cuarto bloque **Indices – Bibliografía - Resumen y Epílogo**, se recogen los oportunos índices de abreviaturas, figuras y tablas, la bibliografía consultada en la búsqueda previa para definir la hipótesis de trabajo así como la que se ha ido consultando durante el desarrollo de la parte experimental y en la preparación de presente texto escrito, un resumen sintético de los objetivos, material y métodos, resultados y conclusión. También he considerado oportuno una reflexión final sobre el aspecto de aplicación práctica mas relevante de esta tesis, sobre los folatos y la salud.

1.1.-Polimorfismos genéticos. Importancia de su estudio.

Se entiende por polimorfismo genético (Ford 1945), la existencia de más de un alelo normal en un locus, siempre que esté presente en la población con una frecuencia de al menos el 1%. Se puede considerar la existencia de polimorfismos a varios niveles: variaciones en la secuencia del ADN (que son a las que nos vamos a referir en la presente tesis doctoral), en la secuencia de aa, en la estructura cromosómica o en los rasgos fenotípicos.

Bajo el punto de vista de la genética médica, el término polimorfismo alude a variación genética pero tiene un matiz que lo diferencia del término “mutación” que también alude a variación (genética, cromosómica o epigenética) que es causa de enfermedad, mientras que un polimorfismo genético es una variación que no causa enfermedad aunque puede predisponer a la misma.

Los polimorfismos genéticos pueden afectar a la expresión de las proteínas codificadas de alguna de las formas siguientes :

1.- Las variaciones nucleotídicas se encuentran en regiones codificantes que resultan en sustituciones de aminoácidos que alteran la actividad enzimática, la unión al sustrato, las rutas de señalización, etc.

2.- Las variaciones que se presentan son deleciones (pérdida de 1 o más nucleótidos) en la región codificante, dando lugar a una proteína inactiva o ausente.

3.- Los polimorfismos se encuentran en regiones no codificantes que afectan a elementos de control transcripcional implicados en la inducción o la expresión de los niveles basales de la proteína (CYP1A1).

4.- Las variaciones se encuentran en la señal de poliadenilación de un gen, afectando a la vida media del transcrito y por tanto a la cantidad de proteína (ej. NAT-1).

5.- La variación consiste en una amplificación génica que incrementa la cantidad de enzima (ej. CYP2D6).

6.- Se producen interacciones complejas de genes polimórficos y / o los productos de sus reacciones catalíticas (sujetos deficientes en GSTM1 o células con una mayor inducción de CYP1A1 o probablemente a causa de la mayor biodisponibilidad de los compuestos inductores).

Como consecuencia directa de la secuenciación del genoma humano y el gran desarrollo tecnológico, la genética ha evolucionado para incluir el estudio de las variaciones genómicas interindividuales. Este estudio implica la identificación y evaluación de polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs. Están presentes en todo el genoma con una frecuencia aproximada de 1 por cada 1000 pares de bases (Zak et al 2002).

El consorcio SNP (de compañías farmacéuticas, de bioinformática, 5 centros académicos y fundaciones) está elaborando un mapa de SNP de alta densidad del genoma humano que está disponible públicamente en la red (<http://snp.chsl.org>).

La comprensión de las variaciones genéticas puede mejorar la predicción de la susceptibilidad frente a las enfermedades, el pronóstico de las mismas y la respuesta a la terapia farmacológica.

En las patologías oncológicas el conocimiento del significado de estas variaciones tiene una especial importancia por cuanto las terapias sólo tienen una modesta efectividad en la reducción de las tasas de mortalidad. En Europa, las cifras de incidencia ajustadas a la edad se incrementaron en un 8,7% entre 1970 y 1990 en hombres y decrecieron en este periodo un 1,4 % en mujeres (Tomatis et al 1997).

La prevención es claramente la mejor estrategia para reducir la mortalidad. En los países industrializados se ha estimado en un 50% el número de casos de cáncer que podrían prevenirse (Tomatis et al 1997).

Doll y Peto (1991) estimaron en un 75% el número de casos de cáncer atribuibles a sustancias químicas. En nuestro país, el número de personas expuestas es muy elevado. Se estima en más de 11 millones el número de fumadores.

De los resultados de la III Encuesta Nacional de Condiciones de Trabajo (INST. 1998) sabemos que unos 11.400.000 trabajadores están expuestos a contaminantes químicos, bien por inhalación de gases, bien por la manipulación de productos nocivos o tóxicos.

El conocimiento de las interacciones entre los agentes presentes en el medio ambiente y el hombre se ha ido adquiriendo en la última década, gracias a la Epidemiología Molecular, mediante el análisis de biomarcadores de exposición y daño, presentes en células, tejidos y fluidos corporales. Ejemplos de estos biomarcadores son:

1.- Los aductos, productos que se forman como consecuencia de la unión covalente al ADN de las moléculas reactivas, carcinógenos o especies reactivas (Kato et al 1995, Kriek et al 1998, Lunn et al 1999).

2.- Los cambios en genes clave (oncogenes o genes supresores) que actúan disparando o bloqueando procesos básicos de la fisiología celular como la división, diferenciación, apoptosis o los que se heredan en genes que afectan a la metabolización de carcinógenos o reparación del ADN (Poulsen et al 1993, Perera et al 1996, Perera 2000).

Extrapolando la variación observada en el hombre en algunos índices de susceptibilidad (metabolismo de carcinógenos y daño genético) a una exposición dada, una persona puede ser de 10 a varios cientos de veces más susceptible al cáncer que otra. Esta circunstancia tiene obvias implicaciones en el asesoramiento del riesgo frente al cáncer.

En contraste con la epidemiología tradicional, que centra su atención en la incidencia y mortalidad como punto final, la epidemiología molecular tiene el potencial de constituir una llamada de aviso o advertencia, señalando los efectos preclínicos de la exposición y de una susceptibilidad aumentada. Proporciona una gran oportunidad para advertir del peligro a tiempo de poder intervenir en el curso de la patología.

1.2.- Carcinogénesis colónica.

Las elevadas cifras de incidencia y mortalidad del CCR en los países occidentales justifican la intensa investigación que esta neoplasia genera. En esta última década, la biología molecular y la genética han contribuido de una forma significativa a la comprensión de los mecanismos subyacentes, a la forma en que actúan los principales factores de riesgo conocidos, fundamentalmente especies químicas ligadas a los alimentos, su preparación y metabolización, aunque también están presentes en el aire, agua y en el medio laboral.

La epidemiología molecular está estableciendo los mecanismos que vinculan los factores de riesgo conocidos a grupos de población o individuos concretos sobre la base de la constitución genética personal.

El proyecto Genoma Humano ha comenzado a desvelar los mecanismos del proceso fisiológico del envejecimiento, uno de los principales factores de riesgo en la aparición de tumores.

El primer modelo de patogénesis del CCR, **la hipótesis adenoma - carcinoma** de Hill et al (1978), se acepta hoy universalmente. Propone que la lesión inicial colorrectal la constituye un pólipo benigno adenomatoso que sufre posteriormente una progresiva desorganización del fenotipo a nivel celular y tisular. Diversos autores (Baker et al 1989; Volgestein et al 1989; Fearon y Volgestein, 1990;

Kinzler et al 1991) han propuesto un modelo de las bases a nivel molecular para la secuencia adenoma - carcinoma consistente en un proceso complejo de múltiples pasos en los que las células van acumulando alteraciones en genes que controlan la división, diferenciación, apoptosis celular, la reparación del ADN genómico y mitocondrial que determinan el fenotipo neoplásico (**figura 1**).

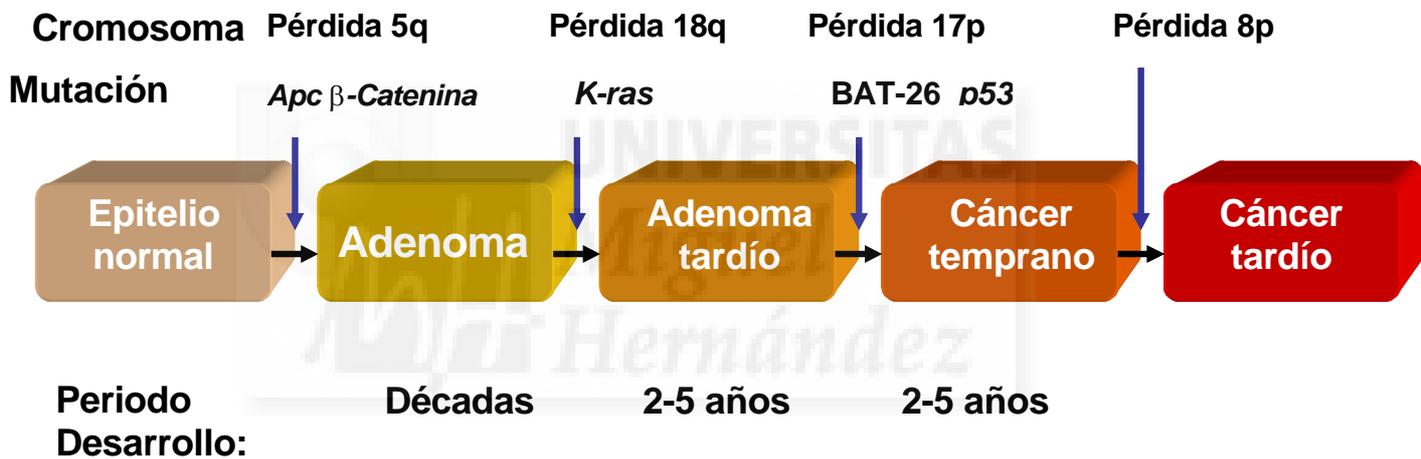


Figura .-1 Modelo molecular secuencia adenoma - carcinoma

Este proceso implica cambios acumulativos más que cambios genéticos y epigenéticos ordenados secuenciales (**Tabla I**). Algunos de estos cambios como la pérdida del gen supresor de tumores APC, mutaciones en el oncogén K-ras y una desorganización generalizada de los patrones de metilación del ADN se producen tempranamente, mientras que la pérdida del gen supresor de tumores p53 es un evento tardío.

De las tres clases de agentes causales del CCR: **Biológicos, Físicos y Químicos**, teniendo presente la posible acción conjunta de más de un agente, son los de naturaleza química los que desempeñan un papel más importante en la carcinogénesis colónica.

De los agentes físicos (radiaciones ionizantes, ultravioleta y fibras minerales), sólo se han asociado las ionizantes al CCR aunque con una baja incidencia en comparación con otros órganos, como el tiroides o la mama; son tumores secundarios consecuencia del tratamiento con radioterapia de otros órganos (Hall 2000).

De los agentes biológicos, estudios clínicos y epidemiológicos revelan asociaciones consistentes de tumores rectales y anales en hombres y mujeres infectados por HPV (16, 31, 33, 35, 58, 18, 45) seropositivos para el HIV (Frisch et al 1997).

En ciertas regiones de China, India y Sudáfrica, la investigación revela la asociación de tumores rectales con Schistosomiasis : *Schistosoma Japonicum*, *Schistosoma sinensis* (Jatzko et al 1997, Guo et al 1993).

| Tabla I.- Mutaciones génicas y frecuencias descritas en CCR. | | | |
|---|--|-----------------------------|--|
| Genoma nuclear | CROMOSOMA | FRECUENCIA | COMENTARIO |
| GEN | | | |
| KRAS2 | 12p | 50% | Mutaciones puntuales codones 12, 13 y 61 |
| CTNNB1 | 3p22 | 4-15% | Identificadas 50% tumores sin mut en APC |
| SRC | 20q11 | 2% | Sólo en tumores metastásicos |
| APC | 5q21 | 70% | Mayoría mut stop ocurren en estadio adenoma |
| TP53 | 17p13 | 50-70% | Raramente identificado en adenomas benignos |
| SMAD4 | 18q21 | 16% | > 70% CCR muestran pérdidas alélicas en 18q |
| SMAD2 | 18q21 | 6% | |
| DCC | 18q21 | 3% | |
| Grupo TK | | 30% | 1 mut. al menos 1 miembro de: NTRK3, FES, KDR, EPHA3, NTRK2, MLK4 GUCY2F |
| | Reparación errores emparejamiento | | |
| MSH2 | 2p21 | 15% | >90% mut germinales en MSH2 y MLH1 |
| MLH1 | 3p21 | | |
| PMS1 | 2q31-33 | | 15% tumores CCR tienen MSI |
| PMS2 | 7p22 | | |
| MSH6 | 2p21 | | |
| | Reparación daño oxidativo | | |
| MYH | BER 8-oxoG:A | | |
| Genoma Mitocondrial | MtADN G→A | 70% líneas celulares | COX sub I y II, CYTb, ND4L, ND5, ND1 12SrARN, |

Numerosas bacterias se han implicado en el desarrollo del CCR pero el papel en la génesis y evolución tumoral que es modulado por factores del ambiente colónico permanece oscuro. Recientemente Oliveira (2003) reseña que una metaloproteinasa de *Listeria Monocytogenes* en combinación con una proteasa del huésped produce un péptido que estimula la motilidad e invasión de células cancerosas colónicas.

Los agentes químicos son los más importantes agentes causales del CCR. Fundamentalmente los ligados a la dieta, incluyendo las transformaciones que determinados componentes de los alimentos pueden sufrir como consecuencia de las técnicas culinarias de preparación: asado, fritura, braseado, ahumado y adobado (Skog 1993) o de la acción de las bacterias intestinales. Compuestos químicos, conocidos carcinógenos presentes en el tabaco, aguas de bebida, aire respirado y medio laboral se presuponen son agentes etiológicos de tumores colorrectales (Potter 1999).

Los grupos de sustancias químicas más estudiadas como presuntos agentes causales del CCR son: los hidrocarburos policíclicos aromáticos, las aminas heterocíclicas y las nitrosaminas. Entre los compuestos metálicos cabe destacar el Arsénico (**As**) (Nakagawa et al 2002) y el hierro (**Fe**) (Glei et al 2002).

Las aminas heterocíclicas dietarias se forman durante el cocinado por reacciones entre aminoácidos, creatina o creatinina y azúcares

(Sugimura et al 1994). Se descubrieron en las partes carbonizadas de carnes y pescados. Estudios en animales a largo plazo nos muestran un efecto carcinogénico en varios órganos. También se ha documentado la formación en tejidos humanos de aductos-ADN. Una revisión de la IARC sugiere que: **IQ** 2-amino-3-metilimidazo (4,5-f) quinolina es un carcinógeno probable para el hombre y que los siguientes compuestos : **MelQ** 2-amino-3,4 dimetilimidazo (4,5-f) quinolina, **MelQx** 2-amino-3,8 dimetilimidazo (4,5-f) quinoxalina, **PhIP** 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo(4,5-b) piridina, son posibles carcinógenos para el hombre.

En las dietas de los países occidentales, la carne frita es la principal fuente de exposición a aminas heterocíclicas y la cantidad de carne ingerida probablemente influye en el riesgo frente al cáncer en el hombre (Ames et al 1995).

A la génesis del CCR, también están asociadas sustancias químicas de origen endógeno como las sales biliares, el colesterol y de una forma especial los radicales libres formados como consecuencia de la fosforilación oxidativa. Estos radicales libres generados tanto a nivel citosólico como mitocondrial son agentes mutagénicos, tanto para el ADN genómico como para el ADN mitocondrial, como también son responsables del daño en otras macromoléculas, como proteínas y lípidos de membrana (Potter 1999).

Los seres vivos hemos desarrollado mecanismos para eliminar xenobióticos, prevenir su acumulación y para reparar el daño que las especies reactivas de oxígeno (ROS) generan en el organismo. Son los

sistemas genéticos de defensa y reparación. Codifican un amplio grupo de enzimas responsables de reconocer los xenobióticos tóxicos y convertirlos en formas solubles en agua y por tanto excretables, de reconocer el daño en el ADN genómico y mitocondrial, eliminarlo y reparar las hebras dañadas.

Las reacciones enzimáticas del metabolismo de xenobióticos pueden dividirse en dos fases distintas. Reacciones de **fase I**, en las que los compuestos son metabolizados mediante **reacciones de oxidación** que introducen un grupo funcional, típicamente electrofílico, en la molécula. Permitiendo, la introducción de este centro reactivo, la actuación de las enzimas de la **fase II** que **adicionan una molécula hidrofílica** (glutatión, grupo acetilo, ácido glucurónico, etc) dando lugar a la formación de un producto soluble en agua.

La división de los colonocitos es un proceso muy regulado. Una hiperproliferación epitelial puede ser el resultado de daños provocados en la mucosa (Kolonel y Le Marchand 1986) o simplemente ser consecuencia de ingestas elevadas de alimentos (Potter 1992). Esta hiperproliferación compensatoria de las células epiteliales colónicas, podría incrementar la posibilidad de que se produjeran nuevas mutaciones como consecuencia de lesiones no reparadas que posibilitarían la aparición de nuevos clones.

La dieta puede afectar este modelo de varias formas. Dietas ricas en grasa y en colesterol pueden elevar el riesgo por el incremento de la producción de ácidos biliares y de la concentración luminal de ácidos

grasos libres. La fibra dietaria puede disminuir el riesgo por unión con los ácidos biliares, así como por el incremento del volumen de las heces y dilución de los carcinógenos. La fermentación bacteriana de las fibras solubles y almidón podría ser protectora por incremento del volumen, disminución del pH (reduciendo la conversión de sales biliares primarias a las secundarias más tóxicas) y produciendo ácidos grasos de cadena corta que pueden ser anticarcinogénicos (Cummings 1983), quizás por inducción de la apoptosis (Hague et al 1995). Los iones calcio intraluminales podrían reducir el potencial efecto promotor de las sales biliares y ácidos grasos libres convirtiéndolos en jabones cálcicos insolubles (Wargovich et al 1983). Además el calcio puede reducir directamente la proliferación celular (Newmark et al 1984) e influir en la zona de proliferación (Bostick et al 1995).

Los vegetales pueden ser protectores proporcionando al colon fibras fermentables, así como numerosos compuestos anticarcinogénicos como los carotenoides, vitamina C, ácido fólico, isotiocianatos, compuestos organosulfurados, inhibidores de proteasas (WCRF-AICR 1997).

En la **figura 2** y en la **tabla II** se muestran los eventos mas importantes que tienen lugar en la carcinogénesis colónica , la actuación de los factores exógenos y endógenos, así como un resumen de las posibles conexiones entre la epidemiología clásica y los conocimientos existentes sobre la genética molecular de la enfermedad.

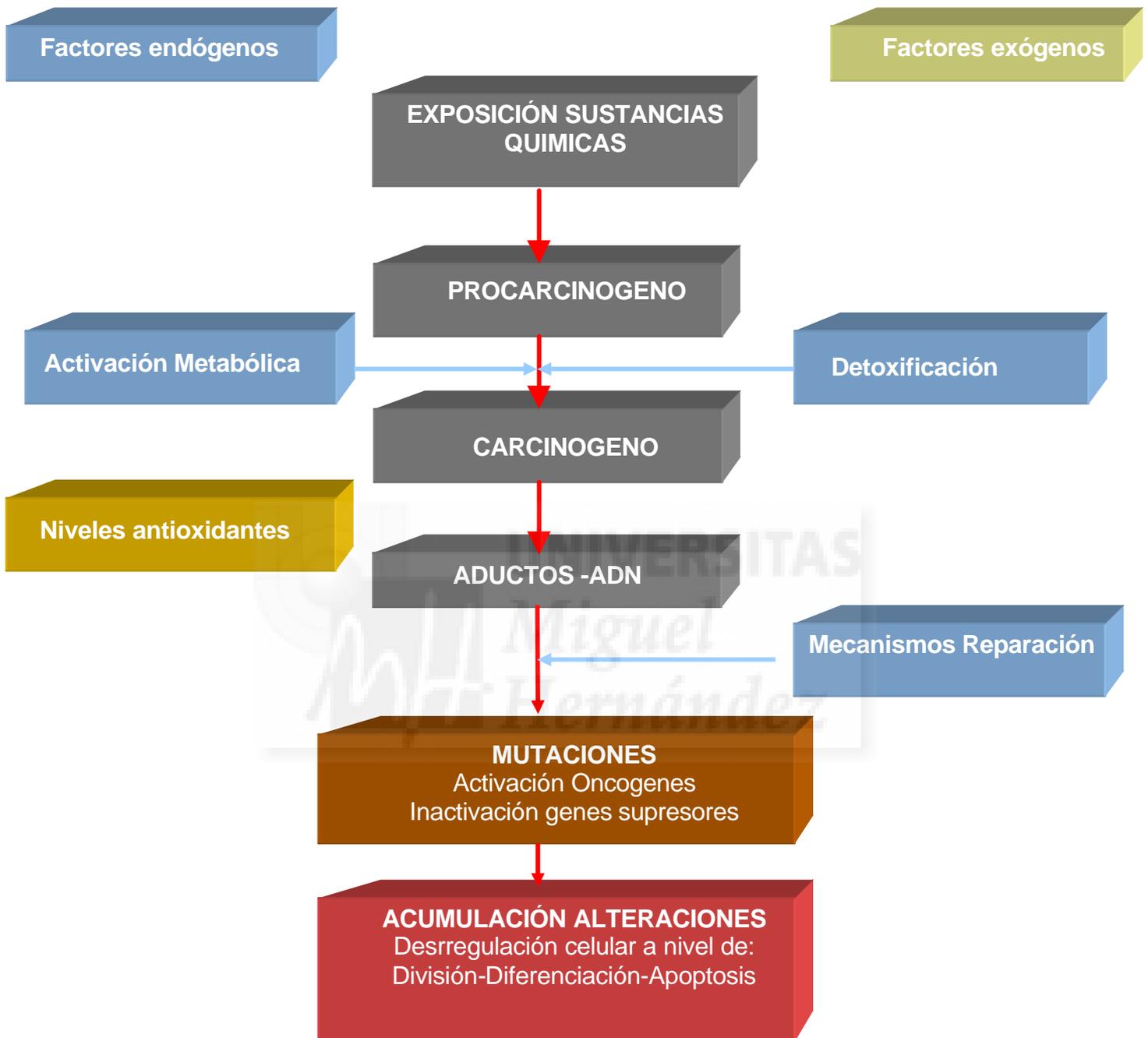


Figura 2.- Eventos en la carcinogénesis, actuación de factores endógenos y exógenos.WCRF-AICR 1997

Tabla II.- Conexiones entre la epidemiología y la biología molecular del CCR (Potter 1992) modificada.

| | |
|---|---|
| CARNE | Nitrosominas-Aminas Heterocíclicas Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos Triahalometano Mutaciones K-ras-APC-P53 |
| TABACO | |
| CONTAMINACIÓN URBANA | |
| RIESGO QUÍMICO OCUPACIÓN | |
| AGUA BEBIDA | |
| ALCOHOL | Acetaldehido→Daño ADN Efecto vía niveles folatos |
| VEGETALES | Antioxidantes →Reducción niveles aductos.Inducción sistemas enzimáticos detoxificación Folatos →Integridad ADN.Síntesis y metilación Fibra →AGCC→Apoptosis |
| ACTIVIDAD FÍSICA INDICE MASA CORPORAL BAJO | Estímulos crecimiento reducidos Tránsito intestinal reducido ¿Efecto mutaciones ADN mitocondrial? |
| ENVEJECIMIENTO | Reducción procesos reparación ADN Acumulación mutaciones somáticas en ADN nuclear y ADN mitocondrial |
| Antiinflamatorios no esteroídicos | Inhibición COX 2 |
| Terapia hormonal sustitutoria | ¿Prevención metilación receptores estrógenos? |
| HISTORIA FAMILIAR | FAP→Via APC FAP→VIA MYH daño oxidativo ADN HNPPC→Via inestabilidad microsátélites ¿ otras? |
| POLIMORFISMOS | Actúan influyendo en la interacción genes-factores de riesgo.Determinando el peso en cada individuo en función de su genoma de los factores de riesgo CYP1A1,CYP2D6,CYP2C,GSTM1,GSTT1,GSTM3 UGT1A7,SULT1A1,MTHFR..... |

1.3.- Genes de detoxificación. Las Glutación Transferasas.

1.3.1.- La familia de las Glutación Transferasas.

El glutatión (GSH) es el tiol no proteico más abundante en las células tanto eucariotas como procariotas; está implicado en numerosas funciones esenciales para la fisiología celular. Participa como agente reductor y antioxidante, es esencial para el mantenimiento de la integridad de las membranas celulares, es un reservorio intracelular de Cys (cisteína), interviene en la eliminación de peróxidos y radicales libres y está relacionado con el control del ciclo celular .

Dos familias de genes codifican proteínas con actividad glutatión transferasa:

- La familia de las enzimas citosólicas o solubles, diméricas, que comprende unos 16 genes. Principalmente, pero no exclusivamente, implicados en la biotransformación de xenobióticos tóxicos y endobióticos (Hayes et al 2000).
- La familia de las enzimas microsomales, probablemente triméricas, formada por 6 miembros . Están implicados en el metabolismo del ácido araquidónico (Hayes et al 2000).

Estas dos familias ejercen un papel crítico en la protección a nivel celular del estrés oxidativo y de sustancias químicas tóxicas. Detoxifican una

gran variedad de compuestos electrofílicos, incluyendo lípidos oxidados, ADN y derivados del catecol.

Cada día es mayor el número de polimorfismos que se descubren en genes GST, siendo de especial interés aquellos alelos que alteran las propiedades catalíticas. Las enzimas GST se expresan en la mayoría sino en todas las formas de vida; lo que habla de su importancia en la protección de las células frente a sustancias dañinas.

Las isoenzimas GST se descubrieron en los 60 en hígado de rata por su propiedad de catalizar la conjugación del glutatión reducido con haluros de alilo, como el 1,2-dicloro-4-dinitrobenzeno (CDNB) y bromosulfaleína (Coombes et al 1961).

Los 16 genes GST citosólicos se subdividen en 8 clases: **Alpha, Kappa, Mu, Pi, Sigma, Theta, Zeta y Omega**. La clase Kappa GST es mitocondrial. Las enzimas microsomales se agrupan en una entidad que recibe colectivamente el nombre de **MAPEG** (membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism).

Las diferentes transferasas son específicas de sustrato, aunque sus actividades se solapan parcialmente, por lo que una misma isoenzima puede actuar sobre varios sustratos diferentes; aunque no con la misma eficacia. No existe un sustrato común que sea metabolizado por todas las isoenzimas. A la vista de las historias evolutivas separadas de las enzimas citosólicas y MAPEG no es sorprendente que presenten notables diferencias catalíticas .

Y aunque exista cierta redundancia en sus actividades, el solapamiento en las especificidades de sustrato de las isoenzimas individuales es menos extensa de lo que se pensó inicialmente .

En la **tabla III** se muestra los genes que forman esta familia, su localización, el número de acceso a OMIN, la existencia y tipo de alelo en cada miembro.

1.3.2.- Papel de las GSTs en reacciones de detoxificación. Sustratos de las GST

Clásicamente, se han considerado las diferentes enzimas GST como parte de los mecanismos de defensa celular contra agentes químicos tóxicos de naturaleza endógena y ambiental. La reacción general que catalizan estas **Transferasas** consiste en la conjugación de GSH (glutatiión) a moléculas electrofílicas con una gran variedad de estructuras. Entre los sustratos se encuentran los epóxidos de hidrocarburos policíclicos aromáticos derivados de las reacciones de catálisis enzimática (P450) de la fase I, así como numerosos productos de estrés oxidativo. No se puede definir con exactitud el papel fisiológico de un miembro concreto de la familia GST.

Se asume, por la gran abundancia de datos in vitro que estas proteínas funcionan como enzimas diméricas. Un estudio reciente, muestra que el monómero de GSTP es un inhibidor de la quinasa dfe C-Jun N-terminal y por tanto de gran importancia (Adler et al 1999). Esta inhibición se

pierde durante el estrés oxidativo a causa de la dimerización covalente de los monómeros de GSTP. El efecto resultante sobre c-jun afectará a la proliferación y expresión de genes reguladores del ciclo celular como CCND1.

Las propiedades catalíticas de las GSTs sugieren que desempeñan un papel importante en la metabolización de fármacos y que las variaciones genéticas en estos genes influirán en la respuesta celular a los mismos. La mayoría de las formas citosólicas se expresan en el hígado, hecho consistente con el papel de este órgano en los procesos de detoxificación; la información disponible sobre la expresión en los tejidos de las diferentes formas es todavía escasa y se expone de forma resumida en la **tabla III**.

Las clases Alpha, Mu y Pi detoxifican: a,b,carbonilos insaturados dañinos como la acroleína (presente en el humo del tabaco), 4-hidroxinonenal (producto de la peroxidación lipídica) (Hubatsch et al 1998); propenales de adenina y timina (productos del daño oxidativo en el ADN) (Berhane et al 1994) y aminocromo, dopacromo y noradrenocromo (productos de la oxidación de catecolaminas que contienen quinona) (Baez et al 199). La clase Mu cataliza in vitro la conjugación del GSH con varios epóxidos carcinogénicos, como la aflatoxina b1-8,9-epóxido y la clase Pi es activa frente a diol-epoxidos del benzo(a)pireno, benzo(c)fenantreno y benzo(g)criseno.

El oxido-a-colesterol generado como consecuencia de la oxidación de membranas es otro epóxido importante detoxificado por la clase Alpha.

Junto a las propiedades catalíticas en reacciones de conjugación, los miembros de ambas familias poseen una actividad GSH peroxidasa independiente de selenio frente a hidroperóxidos orgánicos. Los sustratos potenciales in vivo son los hidroperóxidos de fosfolípidos, ácidos grasos y ADN. El papel protector se cree debido a la actividad glutathion peroxidasa (Jakobsson et al 1997); previniendo que los hidroperóxidos orgánicos propaguen las reacciones por las que los radicales libres provocan la destrucción de macromoléculas intracelulares como consecuencia del estrés oxidativo (Hayes et al 1995).

Un sustrato único de la clase **GST Zeta** es el ácido dicloroacético, este compuesto se encuentra abundantemente como contaminante, consecuencia de la cloración de las aguas de bebida. Aunque parece que el ácido dicloroacético no es carcinogénico en humanos, es hepatocarcinogénico en roedores (Hayes et al 2000).

La clase GST Theta cataliza reacciones con varios dihaloalcanos importantes. GSTT1-1 puede activar el diclorometano por conjugación con GSH para formar S-clorometilglutathion activo. El diclorometano es un compuesto ampliamente empleado en pintura, en la síntesis de plásticos y en la industria farmacéutica. GSTT1-1 también está implicado en la activación dependiente de GSH del dibromoetano utilizado como secuestrador de plomo en las mezclas antidetonantes añadidas a las gasolinas.

Tabla III.- La familia de genes GST.(Hayes et al 2000) modificada.

| | | Localización | OMIN | Polimorfismos | Organos |
|------------------------------|--------------|--------------|---------|---------------|------------------|
| GST Alpha | GSTA1 | 6p12.2 | 138359 | | T=H>>R=A>P |
| | GSTA2 | | 138360 | Si | H=T=P>R>A>Cb |
| | GSTA3 | | 605449 | | Placenta |
| | GSTA4 | | 605450 | | ID=Bz>H=R>Cb |
| GST Mu | GSTM1 | 1p13.3 | 138350 | Si | H>T>Cb>A=R>P |
| | GSTM2 | | 138380 | | Cb=ME=T>C>R |
| | GSTM3 | | 138390 | Si | T>>Cb=ID>ME |
| | GSTM4 | | 138333 | Si | Cb,C,ME |
| | GSTM5 | | 138385 | | Cb;C;pu;T |
| GST Theta | GSTT1 | 22q11.2 | 600436 | Si | R=H>ID>C=Pr |
| | GSTT2 | | 600437 | | H |
| GST Pi | GSTP1 | 11q13 | 134660 | Si | Cb>C=Pu=T>R=P |
| | | | 138370? | | |
| GST Zeta | GSTZ1 | 14q24.3 | | Si | Hfetal,ME |
| GST Sigma | GSTS1 | 4q | | ? | H fetal,MO |
| GST Kappa | GSTK1 | ND | | ? | H(mitochondria) |
| GST Omega | GSTO1 | 10q | | Si | H=C=ME>P>R |
| | | | | (As) | As=arsénico |
| MAPEG Microsomales | | | | | |
| MGST-I | | 12p13.1-13.2 | 138330 | Si | H=P>Pr>Co=R>Cb |
| MGST-I like I | | 9q34.3 | | | T>Pr>ID=Co |
| MGST-II | | 4q28-31 | 601733 | | H=ME=ID>T |
| MGST-III | | 1q23 | 604564 | | C>ME=GA,Td |
| LTC₄S | | 5q35 | | Si | PI=Pu>H |
| FLAP | | 13q12 | | Si | Pu=Bz=Ty=PBL>>ID |

A=Capsulas Adrenales, Bz=Bazo, C=Corazon, Cb=Cerebro, Co=Colon, H= Hígado , ID= Intestino delgado, Ga=Glandula Adrena, MO= Médula ósea, ME= Músculo esquelético, P=Páncreas, PI=Plaquetas, Pr=Próstata, Pu=Pulmón, R=Riñón, T=Testículos, Ti=Timo, Td=Tiroides

1.3.3.- Familias GSTM y GSTT y sus polimorfismos.

La expresión polimórfica de las transferasas se descubrió a principios de los 80. La demostración de las variaciones existentes en GST se consiguió por técnicas electroforéticas trabajando con eritrocitos y extractos tisulares humanos. En la actualidad, se realiza con métodos moleculares que implican el uso de la PCR para amplificar genes específicos. La disponibilidad de bases de datos de secuencias expresadas de cADN ha facilitado el descubrimiento de nuevos polimorfismos en esta familia.

La familia de genes GSTM (Mu) está formada por cinco genes que se sitúan en tandem , **5'-GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3-3'** en una región de 40Kb en el cromosoma 1 (1p13.3) (Strange et al 2001). Se han identificado polimorfismos en GSTM1 y se están estudiando profusamente las consecuencias clínicas de los genotipos resultantes de combinaciones de los alelos GSTM1*0, GSTM1*A y GSTM1*B. GSTM1*0 está deleccionado y los homocigotos (GSTM1 genotipo nulo) no expresan la proteína correspondiente . GSTM1*A y GSTM1*B difieren en una base en el exon 7 y codifican monómeros que forman enzimas activas homo y heterodiméricas. Las actividades catalíticas de las enzimas codificadas por estos dos alelos es similar. McLellan et al (1997), han descrito una variedad alélica más, en dos árabes saudíes con una actividad enzimática ultrarrápida, resultado de la existencia de dos genes GSTM1(duplicación) entre GSTM2 y GSTM5.

En GSTM3 también se han identificado dos alelos: GSTM3*A y GSTM3*B que difieren en una delección de 3bp en el intron 6 en GSTM3*B. Esta diferencia crea un motivo de reconocimiento para el factor de transcripción YY1 en GSTM3*B (Inskip et al 1995). Por ello, la expresión de estos dos alelos puede estar regulada de forma diferente, GSTM3*B y GSTM1*A se encuentran en desequilibrio de ligamiento lo que sugiere que en algunos casos las correlaciones entre el fenotipo clínico y los genotipos en GSTM1 puede reflejar polimorfismo en GSTM3 u otra clase de genes GST mu.

La familia de genes GSTT (Theta) está formada por dos genes: **GSTT1** y **GSTT2**, se localizan en el cromosoma 22, están separados unas 50 Kb. Presentan una estructura similar con 5 exones e idénticas regiones de unión intrón/exón. Alrededor del 20 % de la población caucásica son homocigotas para el alelo nulo de **GSTT1**.

GSTT1 y **GSTT2** se encuentra junto al gen de la D-dopacromo tautomerasa. La secuencia entre estos dos genes puede contener un promotor bidireccional. Ambos GSTT y DDCT están duplicados en una repetición invertida, aunque es posible que esta copia duplicada de GSTT2 sea un pseudogen no funcional. Se han identificado varios alelos en GSTT2 que incluyen una sustitución del aa M139I y una mutación nonsense R196 stop. Sin embargo, como GSTT2 y GSTT2P presentan una gran homología, no está claro si estas variantes reflejan diferencias en la secuencia entre los dos genes o variaciones alélicas.

Se han identificado nuevos ejemplos de polimorfismos en locus GST, los genes de la clase **GST alfa** son de interés ya que parecen buenos candidatos de susceptibilidad frente a enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Strange et al 2001).

1.3.4.- Polimorfismos en GSTM1 y GSTT1 y susceptibilidad al cáncer

Los estudios sobre las consecuencias biológicas de los polimorfismos en GST han despertado un gran interés en la última década. De forma especial con relación al riesgo frente a neoplasias de ciertos órganos, sin excluir otras patologías como la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, el asma, etc. Hasta la fecha, las aproximaciones de epidemiología molecular para identificar asociaciones entre genes y susceptibilidad, progresión o respuesta a fármacos, se han basado en estudios de casos y controles relativamente pequeños.

La hipótesis sobre el papel de GSTM1 y GSTT1 en la carcinogénesis sugiere que pueden ocurrir cambios somáticos dañinos con mayor frecuencia en portadores de los genotipos homocigotos nulos en GSTM1 y GSTT1. Estos cambios somáticos pueden ser marcadores de susceptibilidad a los efectos carcinogénicos de xenobióticos en individuos que no pueden detoxificar eficientemente carcinógenos. Medidas de daño genético a nivel somático pueden reflejar: bien exposición (biomarcadores de exposición) o bien efectos tempranos, precoces en las rutas carcinogénicas (biomarcadores de efecto).

Se han realizado numerosos estudios consistentes con esta hipótesis, estratificando los niveles de daño en el ADN en función del genotipo heredado en GSTM1 y GSTT1. Estos trabajos revelan que los niveles de aductos HPA-ADN, aductos aflatoxina-ADN, SCE (intercambio de cromátidas hermanas) (Schroeder et al 1995), mutaciones somáticas específicas o LOH pueden estar incrementados en portadores del genotipo nulo. Debemos resaltar los incrementos de SCE en GSTT1*0 frente a GSTT1*1 y su correlación en procesos mielodisplásicos y leucemias (Chen et al 1996).

Como resumen general de la importancia del **genotipo nulo de GSTM1** en oncología podemos decir que los estudios sobre cáncer de pulmón sugieren una asociación con el genotipo nulo. El riesgo parece ser mayor para los carcinomas escamosos y de células pequeñas. El riesgo estimado para caucásicos tiende a ser menor y no significativo, mientras que los resultados para asiáticos presentan una elevada consistencia y fuerte asociación e interacción con grandes fumadores. Los estudios sobre cáncer de vejiga sugieren una asociación del genotipo nulo en todos los grupos étnicos (Brockmüller 1996). Hay alguna heterogeneidad en las estimaciones de riesgo que se reducen cuando sólo se tiene en consideración los resultados con carcinomas de células transicionales y fumadores.

La estimación del riesgo con relación al cáncer de mama del genotipo nulo es baja y poco significativa en general, pero los resultados de algunos estudios indican la existencia de un riesgo elevado significativo

entre mujeres jóvenes. Los cánceres colorrectales y hepáticos no están consistentemente asociados con el polimorfismo nulo, con la excepción de los CCR de localización distal (Kato et al 1996). Para los tumores gástricos el riesgo difiere entre caucásicos (alrededor del 1%) de los asiáticos que presentan una asociación significativa en especial con los adenocarcinomas. Los estudios en tumores de laringe sugieren consistentemente un incremento de riesgo en los genotipos nulos de GSTM1, las estimaciones son significativas sólo para los carcinomas de células escamosas (Jahnke et al 1996).

Los datos disponibles son insuficientes para asegurar riesgo en otros tumores, aunque se sugiere una asociación del citado genotipo nulo con adenomas de pituitaria, cáncer de endometrio y leucemia aguda linfoblástica (Rebbeck 1997).

Con relación al polimorfismo nulo en **GSTT1**, el riesgo en tumores de pulmón, vejiga y estómago no parece ser mayor en los portadores del polimorfismo nulo, aunque los datos son insuficientes para excluir una asociación débil. Algunos estudios sobre cáncer de laringe sugieren un incremento de riesgo entre los homocigotos nulos. Con relación al cáncer colorrectal, el meta-análisis publicado por Jong et al (2002), revela un incremento de riesgo significativo para los portadores del genotipo nulo, aunque este resultado está muy influenciado por un gran estudio hospitalario. Otros estudios reflejan asociaciones de este genotipo con tumores basocelulares cutáneos del tronco, cerebro, cérvix y síndrome mielodisplásico (Lear et al 1996, Elexpuru-Camiruaga et al 1995, Chen et al 1996).

1.3.5.- Nomenclatura de polimorfismos en GSTs

En las recomendaciones sobre nomenclatura de genes humanos, se propone que el nombre del gen se escriba italizado en letras mayúsculas y números arábigos y se reseñe el alelo salvaje con una terminación tras un asterisco ej ***1**, **1^a**, **1B**, etc. En ocasiones el alelo mutado se le nombra con el cambio en el aminoácido, ej. **R191Q**, o si no hay cambio en el aminoácido (mutación silenciosa) con el cambio en el nucleótido, ej. **2774T→A**.

La multiplicidad de designaciones de las mismas variaciones según los autores, justifica la necesidad de normalizar nomenclaturas, algunas muy aceptadas como la de CYP450, en la que los nombres de los diferentes alelos se reseñan normalmente en orden cronológico de su descubrimiento con terminación de números y letras como **2**, **3**, ***4^a**, ***3G**, etc.(Antonarakis 1998). La delección de la mayoría o de todo el gen, representa el alelo nulo y se suelen representar con la terminación asterisco y cero ,***0**. Es necesaria la actuación de comités de estandarización de la nomenclatura para evitar confusiones (White 1997).

La nomenclatura empleada para citar los polimorfismos en la familia de genes GST propuesta por Strange y Fryer (1999) es similar a la que se ha empleado en esta tesis.

Para tener la mayor consistencia con las designaciones previas y mantener las reglas del sistema mayoritariamente propuesto, a los alelos *A y *B se les llamará *1A y *1B respectivamente. El alelo nulo o delecionado, se le llama **GSTM1*0** como Strange y Fryer (1999) para diferenciarlo del alelo salvaje **GSTM1*1**. En los casos donde no se distingue entre los alelos A y B de GSTM1(wild type) empleamos **GSTM1*1**. La misma regla se aplica a otros genes de la familia GST.



1.4.- La familia del citocromo P450(CYP). Genes de activación metabólica.

El citocromo P450 es el principal sistema de enzimas que catalizan reacciones de oxidación de fármacos, xenobióticos (como carcinógenos) y endobióticos. Un sustrato RH se oxida a ROH utilizando oxígeno atmosférico (O_2) con la formación de H_2O . Un agente reductor libera iones hidrógeno H^+ bien desde NADPH o NADH.

Se conocen colectivamente como citocromo P450 porque tienen un pico de absorción máxima a 450 nm después de su unión con el CO en la primera fase (reacciones de fase I) de los mecanismos de detoxificación.

Una característica de este sistema enzimático es que una sustancia química concreta puede ser degradada por varias enzimas de este sistema y que una enzima P450 puede oxidar a varias sustancias químicas estructuralmente diferentes (Guengerich et al 1991). Es considerable la capacidad de este sistema enzimático de metabolizar y detoxificar un amplio espectro de compuestos .

Las actividades de los enzimas que intervienen en las reacciones de metabolización de las fases I y II, deben estar coordinadas ya que en las etapas iniciales de la fase II, pueden formarse metabolitos intermedios tóxicos que dan lugar a efectos laterales indeseables.

El citocromo P450 es la última enzima en la cadena esencial de transporte electrónico en los microsomas hepáticos y mitocondrias de la corteza adrenal.

La familia de genes CYPs existe en la mayoría de seres vivos, ha evolucionado dando lugar a una superfamilia de casi 500 miembros. Las primeras formas aparecieron hace 3,5 billones de años, probablemente antes de la divergencia procariotas/eucariotas. Las funciones de las formas primitivas posiblemente fueran metabolizar compuestos endógenos, como esteroides o ácidos grasos, más que xenobióticos. Los primeros genes de metabolización de xenobióticos aparecieron hace unos 400-500 millones de años para metabolizar toxinas químicas encontradas en las plantas (Gonzalez et al 1990).

Nebert (1997) ha propuesto que la guerra entre los reinos **animal-vegetal** ha sido la fuerza conductora en la evolución de la superfamilia de genes CYP. Las plantas producen toxinas para su protección y los animales desarrollan enzimas para eliminarlas. Como resultado durante cientos de millones de años de esta encontrada guerra, han surgido numerosas formas de genes CYP en las diferentes especies, como parte de las estrategias de supervivencia y de adaptación a nuevos hábitat y dietas.

Se ha desarrollado una nomenclatura para su clasificación según la cual los genes y productos génicos se agrupan en familias y subfamilias basándose en la homología de las secuencias. Así por ejemplo CYP1A2 refleja el miembro 2 en la familia 1, subfamilia A.

De las varias enzimas de la familia de genes CYP expresadas en el hombre, sólo las que pertenecen a las familias 1-3 juegan un papel significativo en el metabolismo de carcinógenos. Se cree que la subfamilia de genes CYP1A se desarrolló tras la utilización del fuego con la consiguiente carbonización de productos alimentarios por parte de los primeros homínidos.

1.4.1.- Gen CYP1A1 y sus polimorfismos

La proteína humana codificada por el gen CYP1A1 está bien conservada en la evolución. El interés de su estudio se basa en que interviene en la activación de las principales familias de procarcinógenos presentes en el tabaco, como los hidrocarburos policíclicos aromáticos **(HPA)** y aminas aromáticas **(AA)**. El producto génico hidrocarburo aromático hidroxilasa o aril hidrocarburo hidroxilasa (AHH), cataliza el primer paso en la conversión de carcinógenos ambientales, tales como el benzo(a)pireno del humo del tabaco a su forma carcinogénica de unión al ADN. La proteína CYP1A1 humana tiene 512 aa y es menor en 12 aa que su homóloga en roedores.

Está presente en muchos tejidos epiteliales. En modelos experimentales animales, CYP1A1 se induce tanto en hígado como en tejidos extrahepáticos por HPA exógenos, como el benzo(a)pireno, 3-metilcolantreno y TCDD. En el hombre se considera que funciona principalmente como enzima extrahepática. Podemos detectar cantidades importantes de la proteína y del mRNA en pulmón, linfocitos y placenta mientras que el nivel en la mayoría de los hígados humanos analizados es casi indetectable.

El gen CYP1A1 se localiza en el cromosoma 15 cerca del locus MPI en 15q22-24 y se han descrito varios patrones de RFLP. Claramente podría ser de utilidad en la predicción del riesgo individual al cáncer si algunos de los polimorfismos genéticos estuvieran correlacionados con la susceptibilidad al mismo. Aproximadamente un 10% de las personas caucásicas presentan una forma muy inducible de la enzima y está asociada con un incremento de tumores en la cavidad oral, laringe, bronquios y posiblemente de otros órganos en fumadores y personas expuestas al humo del tabaco (Houlston 2000).

Se han analizado cuatro polimorfismos del gen CYP1A1 con relación a la susceptibilidad al cáncer, (**tabla IV**). Los dos más estudiados están genéticamente ligados, uno que produce un locus de reconocimiento para Msp I en la región 3' no codificante y el otro una sustitución de una base de adenina por guanina en el exón 7 (polimorfismo Ile-Val) en la región de unión con el grupo hemo que se ha asociado con un incremento del riesgo de cáncer de pulmón inducido por tabaco en asiáticos pero no en caucásicos.

La inducción de CYP1A1 se inicia tras la unión de compuestos inductores aromáticos específicos al receptor Ah. Un gen (Arnt) de traslocación nuclear participa con posterioridad en la ruta de inducción de CYP1A1. Sin embargo, no se ha encontrado relación entre polimorfismos en el receptor Ah y el riesgo frente al cáncer de pulmón.

Los primeros trabajos sobre la inducibilidad de la B(a)hidroxilasa y el carcinoma broncogénico fueron realizados por Kellerman et al (1973), al que han sucedido numerosos estudios de asociación de los polimorfismos genéticos de CYP1A1, iniciados por los asociados al lugar de restricción que genera la digestión con Msp I.

El polimorfismo CYP1A1 Ile-Val en la región de unión al grupo hemo provoca un incremento de dos veces en la actividad enzimática microsomal; se ha publicado que se encuentra en individuos caucásicos en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo de CYP1A1 Msp I. Aunque el polimorfismo Ile-Val no incrementa la actividad in vitro puede estar ligado a otro polimorfismo funcional por ejemplo en la región reguladora, de importancia en la inducibilidad del gen.

Se ha encontrado en linfocitos de fumadores con el genotipo Ile-Val (exon 7) unos niveles más elevados de aductos HAP-ADN que en los fumadores sin esta variante (Kriek et al 1998). La concentración de estos aductos también se encuentra incrementada en sangre de cordón y en la placenta de recién nacidos con el polimorfismo CYP1A1-MspI. En tejido del parénquima pulmonar de fumadores, las concentraciones de BPDE y aductos HAP-ADN también se correlacionan positivamente con la actividad enzimática. Existen notables diferencias étnicas en las frecuencias de los polimorfismos de este gen y ambos polimorfismos MspI y Ile-Val son mucho más raros en caucásicos que en japoneses.

Se han propuesto mecanismos para explicar que las interacciones entre genotipos, por ejemplo entre CYP1A1 y GSTM1 homocigoto nulo, comportan un riesgo de daño al ADN y cáncer mayor que un simple efecto aditivo en células humanas y que la delección de GSTM1 está asociada con una gran inducibilidad de la transcripción de CYP1A1 por el 2,4,7,8-tetraclorodibenzo-para-dioxina. Este hecho se observó tras medir los niveles de aductos BPDE-ADN en tejido pulmonar de fumadores. Lo que sugiere que esta combinación de genotipos predispone a un incremento de riesgo para el daño en el ADN asociado al tabaco y al cáncer de pulmón.

Son pocos los estudios con relación al significado de CYP1A1 en el adenocarcinoma colorrectal tanto en fumadores como en personas expuestas a contaminantes ambientales (Sivaraman et al 1994, Ishibe et al 2000) y menos aun los trabajos que analizan las consecuencias de las posibles combinaciones entre los polimorfismos en CYP1A1 y GSTM1 (Inoue et al 2000, Kiss et al 2000).

1.4.2.- Nomenclatura de polimorfismos en CYP1A1

La intensa investigación sobre la estructura y función de polimorfismos genéticos en genes del metabolismo en el hombre ha acrecentado la necesidad de adoptar una nomenclatura consistente y lógica para definirlos. Para ciertos genes como CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6 existe en la bibliografía una considerable confusión debido a los diferentes sistemas adoptados por distintos autores. Se dan casos en los que un mismo símbolo puede referirse a polimorfismos diferentes en distintas publicaciones. Para algunas familias génicas y sus variantes alélicas, como la del citocromo P450 existe un sistema de nomenclatura que incluye información sobre la especificidad de sustrato de una forma lógica y sistematizada. Consiste el sistema en adicionar al acrónimo CYP representativo de la familia [número] [letra] [número] ej **CYP1A1**. En algunos casos se emplea una letra detrás del número final para distinguir subtipos de un alelo simple. Otras aproximaciones sugieren un sistema basado en la cronología del descubrimiento de cada alelo (Vatsis et al.1995), **C**=CYP1A1*1, **M**=CYP1A1*2, **E**=CYP1A1*3, **A**=CYP1A1*4 y el nuevo de **Msp1**=CYP1A1*5.

| Tabla IV.- Nomenclatura de los polimorfismos en CYP1A1 | | | | |
|---|---|------------------|--------------------|------------------------|
| Variaciones nucleótidos | | Histórica | IARC (1999) | Cascorbi (1996) |
| Ninguna | Tipo salvaje alelo m1 | wt | *1 | *1 |
| 6235 T→C | Alelo MspI,m2, región 3' No codificante | .m1 | *2 | *2A |
| 4889 A→G | Ile-Val exon 7 codon 462 | .m2 | *3(m2) | *2B(m1+m2) *2C |
| 5639 T→C | Alelo específico de afroamericanos intron 7 | .m3 | *4 | *3 |
| 4887 C→A | Thr-Asn, exon 7 codon 461 | .m4 | *5 | *4 |

Una nomenclatura similar ha descrito Cascorbi et al (1996) excepto que este autor emplea *2A y *2B para los alelos *2 y * 3. La razón que arguye para su nomenclatura es que estos dos alelos están fuertemente ligados. Actualmente, mientras hay asociación entre estas dos mutaciones en asiáticos, el ligamiento es menos común en caucásicos y no existe en africanos (Garte et al 1996). Se muestran los diferentes sistemas en la **tabla IV.**

1.5.- El gen MTHFR. Metabolismo de folatos

La dieta es un factor importante en la carcinogénesis colónica. La multiplicidad de sustancias y la complejidad de los procesos que tienen lugar en el tubo digestivo dificultan la identificación de los compuestos etiológicos. Estudios epidemiológicos han demostrado la existencia de una relación inversa entre la ingesta de vegetales y riesgo. Los vegetales, particularmente los de hoja verde, constituyen la principal

fuerza de folatos. La mayoría de los estudios de asociación son compatibles con la relación inversa entre cáncer de colon-adenomas y niveles de folato sérico o bien ingesta dietética total y riesgo. Sin embargo no existe una asociación consistente entre cáncer de recto e ingesta de folatos. Un ensayo de suplementación de ácido fólico en pacientes polipectomizados reveló una reducción en las tasas de recurrencia en el grupo de pacientes a los que se les suplementó la dieta con folatos (Cravo et al 1994). Es importante reseñar el incremento del riesgo de CCR en aquellas personas con elevadas ingestas alcohólicas y dietas pobres en folatos y metionina.

Los genes implicados en el metabolismo del ácido fólico son : **MTHFR** metilentetrahidrofolato reductasa, **MTR** metionina sintasa, **MTRH** metionina sintasa reductasa, **CBS** cistationina B-sintasa y **TS** timidilato sintasa. Todos ellos son polimórficos y sus diferentes formas pueden alterar los niveles de folatos (Sharp et al 2004).

Se han propuesto dos mecanismos por los que la deficiencia de folatos pueden intervenir en la génesis de ciertas patologías:

- A.-** Provocando alteraciones en los patrones de metilación en el ADN.
- B.-** Induciendo la incorporación de uracilos durante la síntesis del ADN lo que conduce a la rotura de las hebras de ADN y daño a nivel cromosómico.

La enzima 5,10 metilen tetradidrofolato reductasa juega un papel central en el metabolismo de los folatos, cataliza la reacción irreversible que

convierte el 5,10 metilentetrahidrofolato en 5-metiltetrahidrofolato que es la forma circulante. El sustrato es clave en la síntesis de ADN y el producto proporciona grupos metilo para la síntesis de metionina. La enzima metilen tetrahidrofolato reductasa dirige las especies de folato bien a la síntesis de ADN bien a la remetilación de homocisteína.

El cáncer de colon se caracteriza por una hipometilación genómica y por una metilación (de variada magnitud) de islas CpG normalmente no metiladas en ciertos genes : ***MLH1, CDKN2A(INK4A), MGMT, MINT 1, MINT 31, CDX 1, RAR, MYOD 1, p15^{INK4B}, COX 2, CDH 13, CXX 1 y WT 1*** (Xu et al 2004)

En 1995 Frosst et al describieron el polimorfismo **C677T** en el gen de la MTHFR. El fenotipo de esta variante genética está caracterizado por una reducida actividad catalítica, termolabilidad in vitro y elevadas concentraciones de homocisteína bajo condiciones de niveles reducidos de folatos. Estudios posteriores han confirmado que este polimorfismo es un determinante genético de los niveles plasmáticos de homocisteína y que es frecuente en la población general. Existen considerables variaciones étnicas y geográficas en la frecuencia, que van desde el 1% en negros de USA, Subsaharianos y de Sudamérica a más del 20% en Hispanos, Colombianos y Amerindios del Brasil. La frecuencia del genotipo TT en blancos se encuentra entre el 8 y el 20% en poblaciones de Europeos, Norteamericanos y Australianos. En Europa, hay un incremento en la frecuencia de norte a sur.

De todos los polimorfismos genéticos de la vía metabólica del ácido fólico, el C677T del gen *MTHFR* es el más estudiado con relación al CCR. La actividad enzimática del **homocigoto portador TT** (Val/Val) es del 30% y los **heterocigotos CT** (Val/Al) del 65%.

El análisis por géneros revela una disminución del riesgo en ambos grupos pero sólo es significativo en hombres. Este hallazgo opuesto a lo que sería esperable ha movido a los investigadores a reconsiderar las rutas del metabolismo de los folatos, centrando los trabajos en la relación MTHFR y síntesis de ADN. Un análisis más profundo de los casos parece indicar que esta reducción del riesgo en los portadores del genotipo TT frente al CCR tan sólo se da en aquellos sujetos con niveles elevados de folatos, mientras que este genotipo no conferiría protección o conferiría un ligero incremento del riesgo en sujetos con bajos niveles de ingesta de los mismos.

En la **figura 3** se muestra la ruta metabólica del ácido fólico y su relación con la síntesis de ADN y la metilación de homocisteína y ácidos nucleicos y las actividades de los diferentes formas de MTHFR C677T.

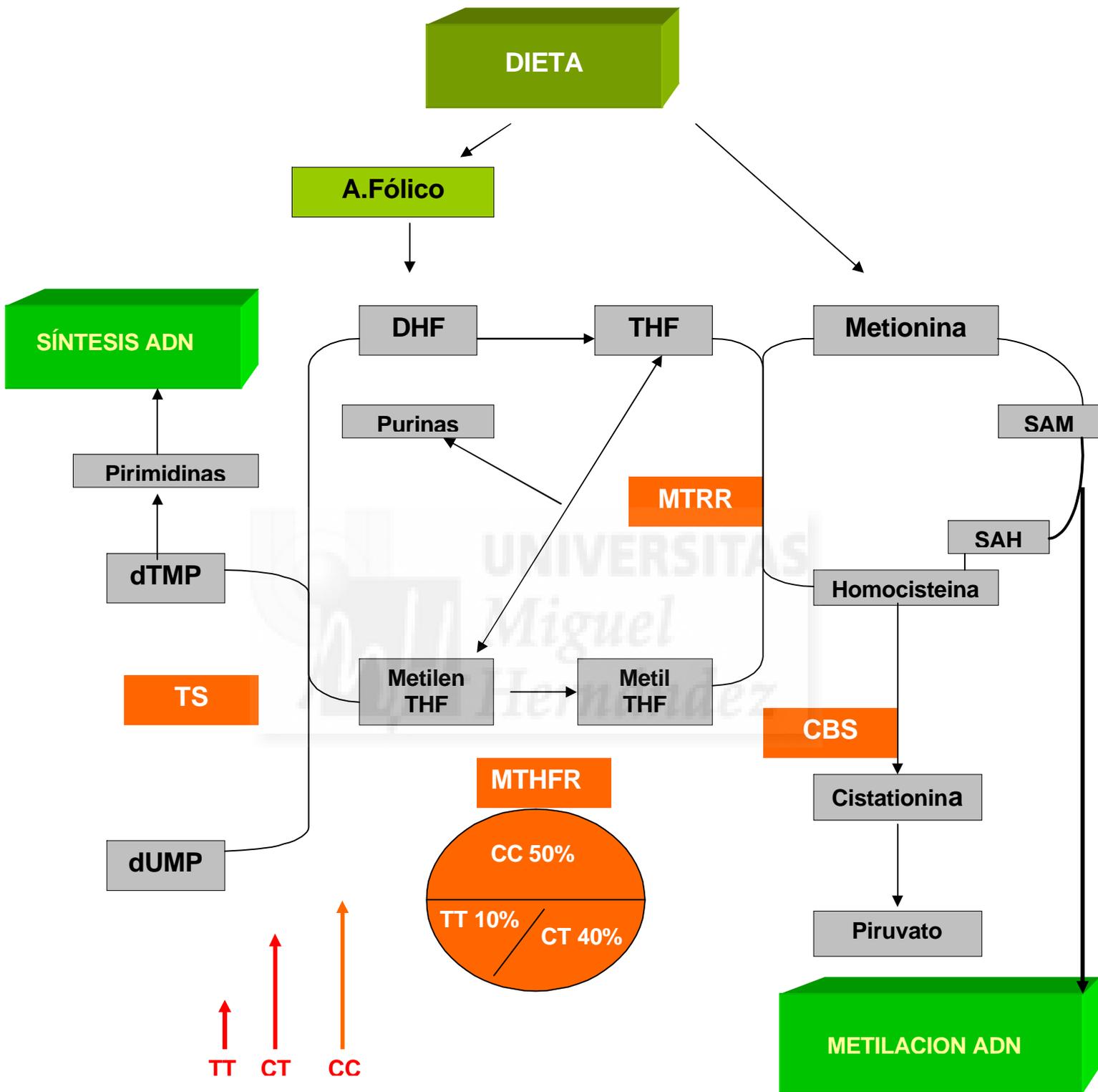


Figura 3.- Ciclo del metabolismo de los folatos.(Ueland et al 2001) modificada

1.5.1.- Nomenclatura de polimorfismos en MTHFR

Para este gen los polimorfismos se describen en la literatura haciendo referencia al tipo y posición de las variaciones encontradas, expresada en referencia a la secuencia de nucleótidos o de aa. Al objeto de facilitar su descripción y siguiendo los criterios empleados en otros polimorfismos y sugeridos por la Guía de Nomenclatura de Genes Humanos, se emplea en esta tesis la siguiente:

| | | | | |
|-------------------|------|------|----------------------------|----|
| MTHFR*1 | C677 | A222 | Homocigoto salvaje Ala/Ala | CC |
| MTHFR*2 | T677 | V222 | Homocigoto Val/Val | TT |
| MTHFR*1/*2 | | | Heterocigoto Ala/Val | CT |

Presentamos un resumen de lo expuesto en la **tabla V**.

| Tabla V.- Características del gen MTHFR y su polimorfismo C677T | | | | |
|--|------------------|--------------------|-------------------|-----------------|
| GEN | Cromosoma | OMIN | ESTRUCTURA | PROTEINA |
| MTHFR | 1p 36.3 | 607093 | 11 exones | 656 aa 150Kd |
| Polimorfismo | C→T 677 | MTHFR*1 | MTHFR*1/*2 | MTHFR*2 |
| 607093.0003 | Ala 222 val | Homocigoto salvaje | Heterocigoto | Homocigoto |
| | A222V | Ala/Ala | Val/Ala | Val/Val |
| Actividad reductasa | | 100 % | 65% | 30% |
| Frecuencia caucásicos | | 44,6 % | 41,9/ | 13,4% |

Los datos publicados sobre el polimorfismo C677T en el gen MTHFR y riesgo frente al CCR revelan que el alelo T protege frente a este cáncer en sujetos con niveles altos de folatos, pero condiciona un incremento del riesgo en sujetos con niveles reducidos. La protección puede estar relacionada con la abundancia de purinas y pirimidinas disponibles para la síntesis de ADN, lo que lleva a una reparación eficiente del ADN y esencialmente a la no incorporación de uracilos.

Shanon et al (2002) estratificaron sus resultados en aquellos que presentaban MSI+ y aquellos MSI-. El genotipo TT estaba asociado con un incremento del riesgo significativo en el grupo MSI+ pero no en el grupo MSI-. Los tumores MSI+ fueron exclusivamente proximales y los pacientes tendían a ser de mayor edad.

1.6.- Polimorfismos en el cáncer colorrectal. Implicaciones clínicas.

La incorporación del análisis genético de polimorfismos metabólicos en la epidemiología del cáncer es de particular interés porque permite la **identificación objetiva de subpoblaciones de sujetos** que son más susceptibles al cáncer inducido por agentes presentes en el aire, agua, alimentos, medio laboral o endógenos (Bartsch et al 1996, Houlston 2001, Rhotman et al 2001).

El análisis de los polimorfismos es importante con relación a **bajos niveles de exposición** (Finkel 1995, Vineis et al 1997). Este conocimiento condiciona por una parte el proceso **de evaluación del riesgo**, por otra, **el establecimiento de unos límites tolerables** de exposición (que tenga en cuenta la sensibilidad individual) . Condiciona también el establecimiento de unas pautas cualitativas y cuantitativas de ingestas diéticas con fines preventivos y **el establecimiento de unas pautas de seguimiento y diagnóstico precoz diferenciadas en función de los genotipos de riesgo** (Khoury 1996).

El estudio de polimorfismos de respuesta a fármacos antineoplásicos, permite establecer unas pautas de dosificación más acorde con las características particulares de cada sujeto, aumentando su eficacia. Puede ayudarnos a seleccionar el fármaco más adecuado en función de la posible respuesta determinada genotípicamente, permitiendo en grupos terapéuticos de reducida ventana, disminuir las reacciones adversas (Park et al 2001, Stoehlmacher et al 2001, Tew 1994, Hayes et al 1995).

1.6.1.- Polimorfismos en genes de baja penetrancia

La susceptibilidad genética podemos considerarla como un espectro que abarca un rango intermedio de situaciones entre dos extremos. En uno, tenemos las **enfermedades monogénicas** de elevada

penetrancia. Por ejemplo, mutaciones heredadas en los genes APC en los cánceres hereditarios de colon polipósicos (FAP) y MLH1/MSH2 en los no polipósicos (HNPCC). En ellos, el riesgo acumulado a lo largo de la vida entre los portadores es muy alto (50-90%). Sin embargo, estas mutaciones son raras en la población general por lo que sólo una pequeña fracción de los cánceres colorrectales pueden ser atribuidos a caracteres heredados (Merman et al 2001).

El otro extremo está representado por los polimorfismos genéticos de riesgo en genes de baja penetrancia. En este caso, nos encontramos con variaciones muy frecuentes del orden del 40-50% de la población, por ejemplo los alelos acetiladores lentos de NAT-2 y el alelo GSTM1 nulo (caucásicos), con un incremento del riesgo modesto.

El riesgo personal, cuando se analiza un genotipo aislado, aumenta en un orden de magnitud pequeño, pero el número de cánceres atribuibles a esta característica genética peculiar individual es alto (Vineis et al WHO-IARC1999).

El CCR es una enfermedad multifactorial. Existen numerosos factores que contribuyen a su desarrollo. Por un lado están los hábitos dietarios y estilos de vida, por otro la predisposición genética. Los estudios epidemiológicos revelan que dietas con una ingesta alta de carne roja, baja en fibra y vegetales, la obesidad y el tabaco comportan un riesgo incrementado para esta neoplasia, mientras que dietas ricas en calcio y folatos y una actividad física regular, reducen el riesgo. Sin embargo, algunas de estas asociaciones todavía son controvertidas. Los

síndromes hereditarios de predisposición al CCR, fundamentalmente FAP y HNPCC, dan cuenta de un número limitado de casos y no son responsables de un incremento del riesgo doble en los parientes de primer grado de pacientes con CCR esporádico. Este incremento del riesgo moderado sugiere un cierto grado de predisposición genética, por ejemplo implicación de genes de baja o moderada penetrancia.

Candidatos para ello son entre otros: genes implicados en rutas metabólicas de activación y detoxificación, o en la metilación, aquellos que modifican el microambiente colónico, genes implicados en la respuesta inmune, etc. También pueden ser importantes variaciones de baja penetrancia en genes de alta penetrancia como APC, MLH1 o MSH2.

Las revisiones y metaanálisis de las investigaciones en epidemiología molecular del cáncer CCR revelan la necesidad de que estos estudios sean estratificados por sexo, etnia, estadiaje, localización, tipo histológico, hábitos, estilos de vida, etc. (D'Errico et al 1999).

Por lo general, los estudios son de un reducido tamaño muestral y se centran en un solo gen. La mayoría de los realizados hasta el presente en el CCR analizan algunos genes de metabolización de fase I y fase II.

Hay pocos trabajos experimentales con la familia de genes **SULT** (Bamber et al 2001) y **UGT** (Strassburg et al 2002) a pesar de la importancia que tienen en los mecanismos de detoxificación en el CCR. De una forma especial estos últimos, la familia de las

glucuronosiltransferasas, dada la multiplicidad de miembros, la regulación de su expresión y la diferente expresión de sus numerosos miembros en las distintas regiones anatómicas del tracto gastrointestinal (Strassburg et al 1997).

También es reseñable la falta de investigación sobre las formas microsomales de GST, de indudable importancia en el metabolismo del ácido araquidónico y la formación de prostaglandinas y su papel en los mecanismos de protección frente a la peroxidación lipídica de membranas o el papel de **GSTO** con relación al metabolismo del As, reconocido carcinógeno (Tanaka-Kagawa et al 2003).

Es necesario profundizar en el estudio de las mecanismos de reparación de las lesiones oxidativas en el ADN nuclear y mitocondrial en el CCR, la incidencia de los polimorfismos en el gen OOG1 (Kondo et al 2000), glicosilasa que repara las lesiones 8-OH guanosina, el papel del gen **MYH** de reparación por excisión de bases (BER), como causal de formas recesivas de FAP (Sampson et al 2003). La proteína codificada por **MYH**, escinde las bases de adenina que se han incorporado erróneamente (en lugar de citosinas) emparejadas con 8-oxo7,8-dihidro 2' deoxiguanosina (8-oxo-dG), una de las bases alteradas con mayor poder mutagénico, producto del daño oxidativo en la molécula de ADN (Cooke et al 2003).

Las **tablas VI y VII** son un resumen de aquellos polimorfismos genéticos estudiados en al menos un trabajo con relación al CCR, agrupados por mecanismos de acción.

Tabla VI.- Polimorfismos de riesgo descritos en el CCR-I

| MECANISMO ACCION | GEN | POLIMORFISMO DE INTERES | FENOTIPO BIOQUIMICO |
|----------------------------|---------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Enzimas Fase I | CYP1A1 | | |
| | CYP2D6 | PM | |
| | CYP2E1 | G1259C | |
| | CYP1B1 | | |
| | CYP2C9 | | |
| | CYP2A6 | | |
| | NQO1 Act Vit K | C609T Pro187Ser | Homo no act Heter 3-act- Nulo |
| | ALDH2 | Codon 487 | Act disminuda |
| | MEPHX1=mEH | Exon3 Exon 4 | |
| Enzimas Fase II | GSTM1 | Nulo | |
| | GSTM3 | | |
| | GSTT1 | Nulo | |
| | GSTP1 | Codon 105 Codon 114 | |
| | GSTA1 | | |
| | NAT1 | NAT1*10 | Acet.rápido TD asoc. + |
| | NAT2 | NAT2*4 | Acet.rápido No asoc |
| | SULT1A1 | SULT1A1*1 | Act aument. |
| | UGT1A7 | UGT1A7*3 N129K / R131K W208R | Act.detox disminuida |
| Metabolismo Folatos | MTHFR | C677T A1298C | Act red /Homo TT Act red CT |
| | MTR | A2756G | |
| | MTRR | A66G | |
| | CBS | 68 bp ins E8 | |

| Tabla VII.- Polimorfismos de riesgo descritos en el CCR-II | | | |
|---|--------------------------------|---|---------------------------------------|
| Oncogenes | HRAS1 | | |
| | L-myc | | |
| Genes supresores | Tp 53 | Exon 4 Intron 6 | |
| | APC | | |
| Respuesta Inmune | TNF-α | TNF α (a1-a14) -G308A -G238A | .a2,a5,a13 asoc No asoc No asoc |
| | TNF-B | | |
| Reparación ADN | OGG1 | Ser326Cys | |
| | XRCC1 | Codon 194 Codon 399 | |
| Metabolismo Lipidos | APOE | E2,E3;E4 | E4 riesgo- TP |
| | PLA2G2A | C964G E1 G1073C E3 | No asoc |
| Metabolismo Calcio | VDR | Bsml FokI | |
| Metabolismo hierro | HFE | C282Y H63D | |
| | TFR | | |
| Angiogenesis | TGFB1 | | |
| Sistema activación plasminógeno | uPAR | | |
| | PAI-1 | G1334A | |
| Ciclo celular | CCDN1 | | |
| | DCC | Arg201Iy | |
| | EPHB2 | | |
| Receptor estrógenos | ER | | |

1.6.2.- Polimorfismos y respuesta a fármacos.

Aunque en este trabajo de tesis no se estudian polimorfismos con relación a la respuesta a fármacos con los que algunos de los pacientes están siendo tratados, como farmacéutico y sanitario no podía dejar de incluir una reseña sobre el estudio de los mismos por cuanto alguno de los genes de interés con relación a la carcinogénesis, como *MTHFR* o *TS*, también son determinantes de la respuesta farmacológica a ciertos antineoplásicos.

A medida que conocemos mejor la historia natural del CCR se pueden identificar a subgrupos de pacientes con mayor riesgo de metástasis tras la cirugía. La quimioterapia se administra tras la cirugía en aquellos con mal pronóstico, influido por varios factores en el momento del diagnóstico como localización del tumor, género, edad y estado general del paciente. El manejo postoperatorio óptimo de los intervenidos con éxito implica la utilización de determinantes seguros del pronóstico que ayuden a seleccionar aquellos que pueden beneficiarse de una terapia adyuvante, mientras que se preserva a otros de efectos farmacológicos adversos. El diseño de una quimioterapia individualizada tanto para pacientes con tumores metastatizados como para los que reciben quimioterapia adyuvante es crítico. Las diferencias interpersonales en la respuesta al tumor y a la toxicidad son frecuentes en la quimioterapia oncológica.

La variabilidad interpersonal en la eficacia y toxicidad tiene varios orígenes, siendo el más importante las diferencias en la farmacocinética y farmacodinamia, influenciadas por polimorfismos genéticos en las enzimas responsables de la metabolización, transporte y en las dianas moleculares. La farmacogenética es el estudio de las variaciones en gen (es) candidato(s) o en el conjunto de ellos determinantes de la respuesta.

Los conceptos y principios de la farmacogenética datan de las observaciones de Pitágoras de las reacciones fatales que provocaba en algunos individuos la ingestión de habas, consecuencia de la anemia hemolítica en sujetos deficientes en glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. A finales de la década de los 50, Motulsky (1957) y Vogel (1959) describieron las primeras asociaciones entre reacciones adversas a fármacos y variaciones hereditarias en actividades enzimáticas (neuropatía periférica con isoniazida y apnea con succinilcolina). Desde la caracterización por Bertilsson et al en 1980 del primer polimorfismo en CYP2D6, enzima de metabolización de la debrisoquina hidroxilasa, se han identificado polimorfismos genéticos en varias enzimas de metabolización.

Los antineoplásicos que se utilizan en el tratamiento de primera o segunda línea del CCR son: 5-FU, levamisol, leucovorin, irinotecan y oxaliplatino.

Los polimorfismos genéticos de respuesta a estos fármacos se presentan en la **tabla VIII** . Y pueden ser marcadores útiles de respuesta farmacológica, supervivencia y toxicidad (Givens et al 2003).

| Tabla VIII.- Polimorfismos genéticas en la terapéutica antineoplásica colorrectal | | | |
|--|--------------------|----------------------|---------------------------------------|
| FARMACO | GEN | POLIMORFISMOS | INFLUENCIA FENOTIPICA |
| 5-FU | TS | TSER*3 | Toxicidad |
| | DPD | DPD*2A | Toxicidad severa |
| | | MSI- | Aumento supervivencia |
| Irinotecam | UGT1A1 | UGT1A1*28 | Toxicidad: Neutropenia, diarrea |
| Oxaliplatino | XRCC1 (BER) | R399Q | No respuesta |
| | ERCC2 | | |
| | GSTP1 | | |
| | XPD (NER) | K751Q | No respuesta |
| 5FU/Metotrexato | MTHFR | C677T | Toxicidad |

MSI – Tumores estables con relación a la inestabilidad en microsatélites

2.-HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Nuestra hipótesis de trabajo es:

- *Sí la identificación de ciertos polimorfismos en genes de activación, detoxificación y del metabolismo de folatos puede contribuir a definir poblaciones de mayor riesgo frente al cáncer colorrectal .*

Esta hipótesis de trabajo se materializa en los siguientes objetivos:

Objetivo Principal 1 :

Determinar la frecuencia de los polimorfismos nulo y salvaje en los genes **GSTM1** y **GSTT1**; de los polimorfismos de corte Msp I, Ile472Val y salvaje en **CYP1A1** y **C677T** y salvaje en el gen **MTHFR** en una población de pacientes diagnosticados de adenocarcinomas colorrectales y compararlos con la frecuencia de los polimorfismos citados en una población de pacientes sin patología neoplásica colorrectal control.

Este objetivo principal 1 se subdivide en los siguientes objetivos secundarios:

1.1.- Determinar si en la población estudiada el polimorfismo nulo en el **gen GSTM1** está asociado a un mayor riesgo frente al **CCR**.

1.2.- Determinar si en la población estudiada el polimorfismo nulo en el **gen GSTT1** está asociado a un mayor riesgo frente al **CCR**.

1.3.- Determinar si los polimorfismos MspI e Ile-Val en el **gen CYP1A1** están asociados a un mayor riesgo frente al **CCR**.

1.4.- Determinar si el polimorfismo C677T en el **gen MTHFR** está asociado a riesgo o protección frente al **CCR**.

1.5.- Establecer si existen interacciones entre los polimorfismos de los genes **GSTM1, GSTT1, CYP1A1 y MTHFR** que confieran un mayor riesgo o protección frente al **CCR**.

Objetivo principal Dos:

Establecer si existe correlación significativa entre alguno de los polimorfismos estudiados y las variables: localización, estadio tumoral y tipo histológico de las neoplasias colorrectales en la población estudiada que implique un mayor riesgo.

Objetivo principal Tres:

Establecer si existe una correlación significativa entre alguno de los polimorfismos estudiados y factores dependientes del paciente como edad, género, obesidad, hábito tabáquico o ingesta alcohólica que impliquen un mayor riesgo.