



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Metilación en p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1 en cáncer colorectal: influencia de la dieta y el genotipo MTHFR

Sergi Mas Herrero



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**“Metilación en p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1 en
Cáncer Colorectal. Influencia de la dieta y
del genotipo MTHFR.”**

Tesis Doctoral
SERGI MAS HERRERO
Dirección; Dra Amalia Lafuente Fló



Dept Farmacología y Química Terapéutica
Unidad Facultad de Medicina (Campus Casanova)
Universidad de Barcelona

Barcelona, 2004

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701216117



Casanova, 143
08036 Barcelona
Tel. (93) 402 45 26
Fax (93) 403 52 60

Amalia Lafuente Flo, Profesora Titular de Farmacología de la Universidad de Barcelona, como directora del presente trabajo de tesis doctoral,

CERTIFICA:

Que dicho estudio, titulado:

Metilación en $p16^{INK4a}$, $p14^{ARF}$ y $hMLH$ en cáncer colorectal. Influencia de la dieta y del genotipo $MTHFR$.

ha sido realizado bajo su dirección y que considerándolo finalizado, autoriza su presentación y defensa frente al tribunal que corresponda. Y para que así conste y a los efectos oportunos, firmo el presente documento en,

Barcelona, 25 de Julio de 2004



UNITAT DE FARMACOLOGIA

1. INTRODUCCIÓN.	
1.1. Impacto Sanitario del Cáncer Colorectal.	1
1.2. Tipos de CRC: Hereditario y Esporádico.	2
1.2.1. Aspectos Moleculares del CRC; inestabilidad en microsatélites (MSI) y metilación	4
1.2.2. MSI; Bases para la Clasificación Tumoral?	6
1.2.3. Modelos de Iniciación y Progresión en el CRC	8
1.2.4. Principales Genes Supresores de Tumores (TSGs) en el CRC.	10
1.2.4.1. Loci INK4a/ARF	10
1.2.4.2. Sistemas de Reparación del DNA Mismatch. Gen hMLH1	15
1.3. Alteraciones epigenéticas. Metilación Aberrante.	17
1.3.1. Mecanismos Epigenéticos.	17
1.3.1.1. Hipometilación y Activación Génica.	18
1.3.1.2. Hipermetilación y Silenciamiento Génico.	20
1.3.1.3. Otros Mecanismos Epigenéticos	22
1.3.2. Metilación en Islas CpG y Envejecimiento.	25
1.4. Metilación Aberrante en el CRC.	28
1.4.1 Fenotipo Metilador de islas CpG en CRC.	30
1.5. Metilación en Genes Supresores de Tumores.	36
1.5.1. Metilación p16 ^{INK4a}	37
1.5.2. Metilación p14 ^{ARF}	38
1.5.3. Metilación en hMLH1	39
1.6. Quimioterapia Epigenética.	39
1.6.1. Inhibidores de la Metilación.	39
1.6.2. Inhibidores de la modificación de las histonas.	42
1.7. Dieta y Cáncer Colorectal.	45
1.7.1. Efecto de los Nutrientes en la Integridad del Genoma y la Metilación del DNA.	48

1.8. Folatos en la Dieta y Cáncer Colorectal.	50
1.8.1. Los Folatos en el Metabolismo Celular; Síntesis de Nucleótidos y Metilación.	51
1.8.2. Evidencias del Papel de los Folatos en la Carcinogénesis Colorectal.	55
1.8.2.1. Evidencias Epidemiológicas.	55
1.8.2.2. Estudios de Intervención con Folatos en Humanos.	56
1.8.3. Mecanismos Carcinogénicos de la Deficiencia en Folatos.	58
1.8.3.1. Alteración del “pool” de Nucleótidos.	58
1.8.3.2. Alteración de la Metilación del DNA.	59
1.8.4. Genotipos Relacionados con el Metabolismo de los Folatos.	61
1.8.4.1. MTHFR C677T y Cáncer Colorectal.	62
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.	
2.1. Hipotesis.	66
2.2. Objetivos.	66
2.2.1. Objetivo General.	66
2.2.2. Objetivos Concretos.	67
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	
3.1. Diseño del Estudio.	68
3.2. Poblacion de Pacientes e Informacion Clinicopatológica.	68
3.3. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.	70
3.4. Criterios de Selección de Micronutrientes.	71
3.5. Aislamiento de DNA a partir de sangre periférica.	72
3.6. Aislamiento de DNA a partir de tejido.	73
3.7. Cuantificación del DNA.	73
3.8. Análisis de Metilación ; p16 ^{INK4a} .	74
3.9. Análisis de Metilación ; p14 ^{ARF} .	75
3.10. Análisis de Metilación ; hMLH11	77
3.11. Genotipo MTHFR	80
3.12. Análisis estadístico.	80

4. RESULTADOS.	
4.1. Características de las Poblaciones Estudiadas.	82
4.2. Características clinicopatológicas y metilación en hMLH1.	83
4.3. Características clinicopatológicas y metilación en p16 ^{INK4a}	85
4.4. Características clinicopatológicas y metilación en p14 ^{ARF}	87
4.5. Metilación en p16 ^{INK4a} , p14 ^{ARF} y hMLH1.	89
4.6. Metilación en p16 ^{INK4a} , p14 ^{ARF} y hMLH1 y otras variables patológicas (K Ras) y genéticas (COMT).	91
4.7. Características clinicopatológicas y genotipo MTHFR.	93
4.8. MTHFR y riesgo de metilación.	94
4.9. Dieta y riesgo de metilación.	97
5. DISCUSIÓN.	102
6. CONCLUSIONES.	116
7. BIBLIOGRAFIA.	117
8. ANEXO	
I. Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos.	156
IIa. Valores Promedio de la Ingesta de Micronutrientes en Casos y Controles.	167
IIb. Selección de Micronutrientes y análisis del Riesgo de CRC.	171
III. Índice de Figuras.	172
IV. Índice de Tablas.	173

Abreviaturas

APC	<i>Adenomatous Poliposis Coli, gen</i>
CdK	<i>Ciclina Dependientes de Kinasas</i>
CIMP	<i>Fenotipo Metilador de Islas CpG</i>
CKI	<i>Inhibidor de las Ciclinas dependientes de Kinasas</i>
COMT	<i>Catecol-Orto-MetilTransferasa</i>
CRC	<i>Cáncer Colorectal</i>
DHF	<i>Dihidrofolato</i>
DNA	<i>ADN, Ácido DesoxiriboNucléico</i>
DNMT	<i>DNA MetilTransferasas</i>
ER	<i>Receptor Estrogénico</i>
FAP	<i>Poliposis Adenomatosa Familiar</i>
FDA	<i>Agencia Alimentaria y del Medicamento, USA</i>
HDAC	<i>Histona DeAcetilasa</i>
HMT	<i>Histona Metiltransferasa</i>
HP-1	<i>Proteína de la Heterocromatina 1</i>
HPNCC	<i>Cáncer Colorectal Hereditario No Polipósico</i>
LOH	<i>Perdida de Heterozigosidad</i>
MBD	<i>Proteínas de Unión a CpGs Metiladas</i>
MDR1	<i>Gen de la Resistencia Múltiple a los Fármacos 1</i>
MGMT	<i>Metil-Guanina MetilTransferasa</i>
MMR	<i>Sistema de Reparación Mismatch del DNA</i>
MNT	<i>Metilado Normalmente en Tumor</i>
mRNA	<i>mARN, Ácido RiboNucléico mensajero</i>
MSI	<i>Inestabilidad en Microsatélites</i>
MS-PCR	<i>PCR Específica de Metilación</i>
MSS	<i>Estabilidad en Microsatélites</i>
MTHFR	<i>Metilen-TetraHidrofolico Reductasa</i>
MTS1	<i>Gen Supresor de Múltiples Tumores 1</i>
NCI	<i>Instituto Nacional del Cáncer, USA</i>
Rb	<i>Retinoblastoma</i>
SAH	<i>S-Adenosina-Homocisteina</i>
SAM	<i>S-Adenosina-Metionina</i>
THF	<i>Tetrahidrofolato</i>
TSGs	<i>Genes Supresores de Tumores</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Impacto Sanitario del Cáncer Colorectal.

El cáncer colorectal (CRC) es la 3ª enfermedad maligna en los países occidentales. Los estudios epidemiológicos de migración señalan que los factores ambientales juegan un papel importante en la etiología de esta enfermedad. De hecho los individuos que emigran de un país de bajo a otro de alto riesgo de CRC, adquieren en una sola generación, el incremento de riesgo¹.

Numerosos estudios epidemiológicos sugieren que las dietas ricas en frutas y verduras protegen contra la mayoría de cánceres humanos^{2,3} y especialmente el cáncer colorectal^{4,5}. A pesar de que existen algunas diferencias regionales, no hay discrepancias significativas en el consumo de frutas y verduras entre el norte y el sur de España^{6,7}. En general se puede decir que el consumo de frutas y verduras es considerablemente mayor en España respecto la mayoría de países europeos o Estado Unidos⁷.

Esto se corresponde con los aspectos beneficiosos que se le imputan a la dieta mediterránea. Sin embargo la incidencia del cáncer colorectal en España sigue una tendencia al alza en ambos sexos⁸, aunque la mortalidad asociada se encuentra estabilizada^{9,10}. En Cataluña el cáncer colorectal es la segunda causa de muerte por cáncer en ambos sexos¹⁰.

Por tanto aunque se ha imputado a la dieta y al estilo de vida un papel preponderante en la etiología del CRC, quedan aun por esclarecer muchos aspectos epidemiológicos, como son las variaciones del riesgo en relación al género y la localización anatómica del tumor. Numerosos estudios han sugerido influencias hormonales y reproductivas en la etiología del CRC en las mujeres¹¹. Ejemplos recientes incluyen estudios que describen una reducción

del riesgo de CRC y pólipos adenomatosos en mujeres que reciben terapia hormonal substitutiva. Además existe un inexplicable exceso de tumores con localización proximal en mujeres de todas las edades y un exceso de localización distal en varones. La influencia del sexo en la distribución anatómica del tumor se ha querido explicar en parte a través del papel de las hormonas femeninas sobre el metabolismo de los ácidos biliares¹².

1.2 Tipos de CRC: Hereditario y Esporádico.

En el modelo de carcinogénesis colorectal se asumen una serie de pasos temporales que finalmente darán lugar a una acumulación de alteraciones genéticas que facilitaran la progresión de adenoma a carcinoma. La identificación de mutaciones genéticas características del cáncer familiar, como la poliposis adenomatosa familiar (FAP)¹³ y la forma hereditaria no polipósica (HNPCC)¹⁴, han ayudado a explicar las formas hereditarias del CRC. Estos procesos participan únicamente en una pequeña parte (~5%) de todos los CRC, sin embargo los loci involucrados en las formas hereditarias del CRC están frecuentemente alterados en el CRC no familiar o esporádico¹⁵, lo que constituye un puente de comunicación mecanicista entre ambos tipos de CRC (**Figura 1**).

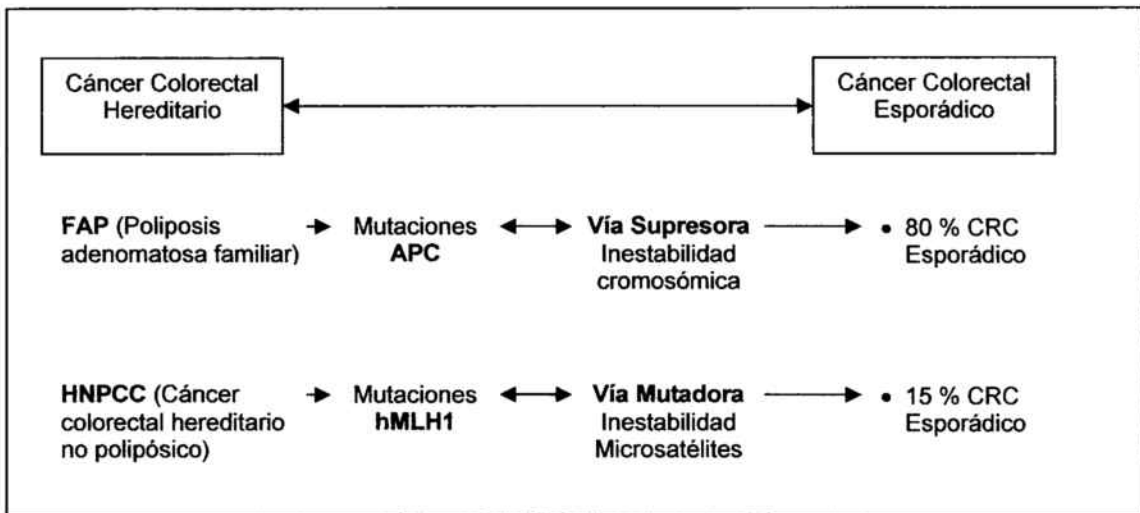


Figura 1. Vías de comunicación entre las formas de CRC hereditario y esporádico.

La condición autosómica dominante para la poliposis adenomatosa familiar (FAP) se ha contemplado como la contrapartida hereditaria al cáncer colorectal esporádico. El descubrimiento de las bases genéticas del FAP con alteraciones en el gen APC (Adenomatous poliposys coli)¹⁶⁻¹⁹ y la demostración de las alteraciones en este gen en el CRC esporádico²⁰, establecieron las mutaciones en APC como un elemento crítico y limitante en la iniciación de la neoplasia colorectal²¹. Kinzler y Vogelstein²² especularon sobre la posibilidad de que este único gen actuara como “gatekeeper” (iniciador) para la proliferación epitelial, tomando una posición prioritaria en el modelo por etapas de la tumorigénesis colorectal.

La tumorigénesis del HNPCC se desarrolla más rápidamente que el FAP, pero no difiere cualitativamente del modelo genético básico²³. La causa fundamental del HNPCC²⁴⁻²⁸ son las alteraciones en los genes reparadores “mismatch”, que se investigaron como genes “caretaking”, es decir como acelerador de la progresión de la neoplasia que sigue a la iniciación.

Recientemente los conceptos “gatekeeper” y “caretaking” han sido más discutidos²⁹. APC puede actuar como “caretaker” mientras los genes

reparadores "mismatch" pueden influir la proliferación celular en presencia de lesiones en el DNA, señalizando el arresto celular o la apoptosis. La pérdida de la función "mismatch" de reparación del DNA podría por tanto resultar en la continuación de la proliferación celular ya, que las lesiones celulares no podrían repararse^{30, 31}.

Se han propuesto dos vías moleculares que se conocen como la *vía supresora* y la *vía mutadora* (**Figura 1**). Cada vía presenta una inestabilidad genómica distinta. A la vía supresora le acompaña una inestabilidad cromosómica (aneuploidia) y a la vía mutadora una inestabilidad de microsatélites (repeticiones cortas de mono y/o dinucleótidos). El primer grupo de tumores se caracteriza por presentar pérdidas de heterocigosidad (LOH) en múltiples loci, así como mutaciones que activan oncogenes (K-Ras) o bloquean genes supresores de tumores o TSGs (APC, p53). En este grupo estarían incluidos el 80% de CRC esporádicos y los hereditarios de la poliposis familiar. El segundo grupo manifiestan inestabilidad de secuencias repetidas o microsatélites e integraría los hereditarios no polipósicos y un 15% de los esporádicos.

1.2.1. Aspectos Moleculares del CRC; Inestabilidad en Microsatélites (MSI) y Metilación.

Después del descubrimiento de los genes reparadores "mismatch" del DNA se asoció su deficiencia con un fenotipo caracterizado por una extensa inestabilidad en microsatélites (MSI)³²⁻³⁴. Algunos genes contienen repeticiones cortas de mononucleótidos en sus regiones codificantes. Estas secuencias repetitivas de nucleótidos son altamente inestables o propensas a copiarse incorrectamente en la fase S del ciclo celular. En ausencia de un sistema de

reparación eficaz del DNA, los errores de replicación no son corregidos y las copias imperfectas se convierten en sustrato para las próximas replications, generando mutaciones permanentes para las células descendientes.

Se apreció que muchos cánceres con el fenotipo mutador no eran hereditarios como resultado de una inactivación somática de estos genes de los sistemas de reparación del DNA. El gen que habitualmente se asoció con la deficiencia en el sistema de reparación mismatch fue hMLH1³⁵ y la forma más común de inactivación resultó ser la metilación de la región promotora del gen³⁶⁻³⁸.

Después de estos hallazgos se iniciaron estudios para delimitar diferencias entre el 15% de cánceres MSI y el resto que mostraban estabilidad en microsatélites (Microsatellite Stability, MSS) (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los tumores de CRC con MSI respecto los tumores MSS³⁹.

- Características clinicopatológicas
 - Mayor frecuencia de localización proximal,
 - Preferentemente en mujeres,
 - Aparecen a edad avanzada.
- Características morfológicas,
 - Aspecto mucinoso,
 - Pobremente diferenciados,
 - Infiltración de linfocitos,
- Características genético-moleculares
 - Patrones inmunohistoquímicos normales para β -catenin y p53,
 - No hay pérdida de heterocigosidad en loci que corresponden a TSGs como APC, p53 o otros candidatos del cromosoma 18q,
 - Baja frecuencia de mutaciones en TSGs

Recientemente se ha reconocido una nueva alteración molecular que se da frecuentemente en cánceres MSI, aunque no es exclusiva de este grupo, el

denominado fenotipo metilador de islas CpG (CIMP)^{40,41} (discutido posteriormente). En las regiones promotoras de los genes pueden encontrarse densas agregaciones de sitios CpG, llamadas islas CpG. La metilación extensa de las citosinas de estas islas CpG se asocia con el silenciamiento transcripcional del promotor. Cánceres que demuestran metilación y silenciamiento en múltiples genes se describen como CIMP.

Por las razones expuestas con anterioridad, existen evidencias para diferenciar el cáncer colorectal en dos subgrupos independientes; MSI y MSS. Se asume, que la división entre MSS y MSI ocurre después de la mutación en APC y de la iniciación a microadenoma²². Es importante establecer como la mutación en APC necesariamente ocurre en el punto de inicio del cáncer colorectal o como otras vías pueden iniciarlo independientemente de este mecanismo. La comprensión de los primeros acontecimientos en la evolución de las neoplasias es esencial para el desarrollo de dianas para la quimioprevención.

1.2.2. MSI; Bases para la Clasificación Tumoral?

Como ya se apuntó anteriormente, se ha propuesto la clasificación de los cánceres colorectales diferenciándolos por la presencia o ausencia de MSI. También debe considerarse la posibilidad de clasificar los tumores en función de su estatus de metilación del DNA. Ya que los tumores MSI en cáncer colorectal son debidos a la metilación del gen reparador "mismatch" hMLH1, podría existir una asociación entre MSI y metilación, pero la sobreposición del fenotipo "mutador" y "metilador" no es exacta. En particular, algunos tumores con metilación extensa de DNA no muestran el fenotipo mutador. Además los

cánceres muestran distintos grados de MSI y diferentes grados de metilación. Esto añade una mayor complejidad a la clasificación molecular de los tumores. Los paneles de marcadores de microsatélites que típicamente indican el estado de MSI de los tumores siguen una distribución bimodal con un punto de corte del 40%⁴². Tumores con una inestabilidad de entre 30-40% de los marcadores o más se han definido como MSI-High⁴³. El panel definido por el National Cancer Institute (NCI) consiste en 2 mononucleótidos (BAT25 y BAT26) y 3 binucleótidos (D5S346, D2S123 y D17S250) (**Figura 2**). Tumores con inestabilidad en dos o más de estos marcadores son clasificados como MSI-High⁴³. Muchos de los tumores, pero no todos, clasificados como MSI-High, según estos criterios, muestran las características clínicas, patológicas y moleculares descritas anteriormente para los cánceres MSI. Además, se caracterizan por metilación en hMLH1 y otros genes⁴⁴.

Cánceres MSI-Low y con inestabilidad limitada a los marcadores de dinucleótidos, no muestran todas las características de los cánceres MSI, pero pueden presentar los caracteres de la metilación del DNA⁴⁵. Es importante que muchos de estos tumores no presentan metilado el gen hMLH1, pero se caracterizan por la metilación en otro gen reparador, el O6-Metil-guanina-Metiltransferasa (MGMT)⁴⁵. Aquellos tumores con inestabilidad que afecta 2 marcadores de dinucleótidos del panel NCI técnicamente son MSI-High, pero no presentan las características patológicas, clínicas o moleculares y probablemente deberían considerarse MSI-Low⁴⁶ (**Figura 2**).

La proporción de tumores que no son MSI-High y que son MSI-Low dependen del número de marcadores utilizados. Si se utiliza el panel del NCI más del 10% son MSI-Low. Como ya se ha comentado los cánceres MSI-Low son más

susceptibles de presentar metilación en MGMT⁴⁵. La metilación en MGMT se describe en el 64% de los cánceres MSI-Low y en el 26% de los MSS.

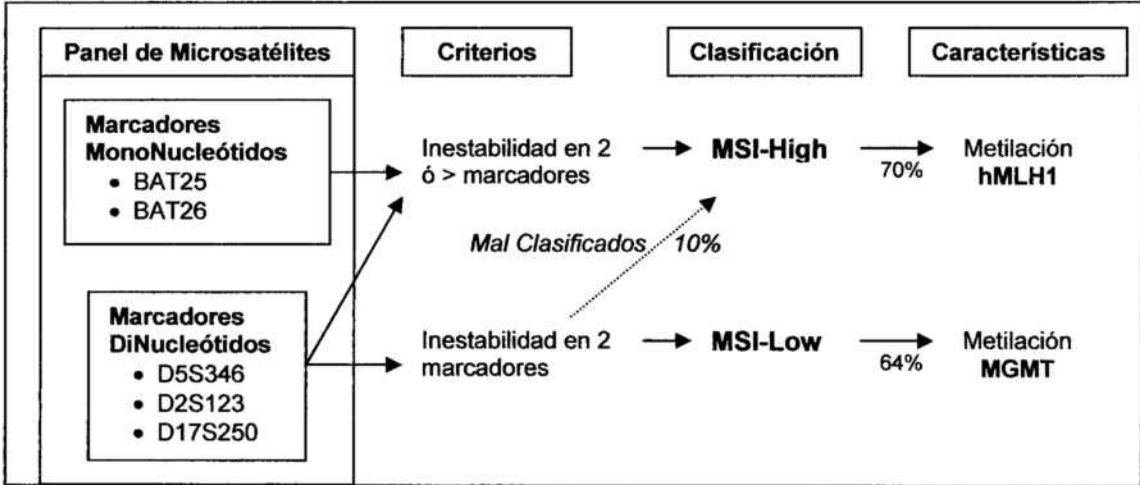


Figura 2. Panel para la clasificación del estatus de estabilidad en microsatélites de tumores definido por el NCI.

Es, por tanto, evidente que la clasificación del cáncer colorectal en base al estatus MSI es “per se” insatisfactoria y posiblemente debería basarse en el mecanismo que provoca la inestabilidad genética⁴⁵.

1.2.3. Modelos de Iniciación y Progresión en el Cáncer Colorectal.

Aspectos Moleculares.

Como ya se ha comentado anteriormente las formas hereditarias de cáncer colorectal sirven como modelos para el estudio de los cánceres esporádicos. A continuación en la **Tabla 2** se comentan algunos de estos modelos, así como sus limitaciones. En todos ellos, las alteraciones epigenéticas como la metilación del DNA juegan un papel importante.

Tabla 2. Modelos de iniciación y progresión al CRC.^{4/}

	FAP	ACF (Aberrant Crypt Foci)	POLIPOS SERRADOS	MODELOS DE PROGRESIÓN	POLIPOSIS HIPERPLÁSICA
Características	Formación de cientos de adenomas potencialmente limitados para la transformación, la progresión puede tardar décadas.	Lesiones epiteliales microscópicas. Se describen los displásicos (son el 5%, parecidos a los microadenomas) y no-displásicos (indiferenciables de los pólipos hiperplásicos)	Los pólipos serrados (ACF nodioplásicos, pólipos hiperplásicos y pólipos mixtos) presentan dos vías de progresión que culminan con tumores MSI-H o MSI-L. Ambas vías se caracterizan por el silenciamiento epigenético, por metilación del DNA.	Los adenomas siguen el denominado modelo de "top-down", y los pólipos hiperplásicos o serrados el modelo "bottom-up".	La poliposis hiperplásica es un buen modelo ya que presenta todo tipo de pólipos, tumores MSI-H, MSI-L y MSS, y metilación en promotores de diversos genes
Mecanismos de Iniciación/ Progresión	Mutaciones en el gen APC o pérdidas de heterocigosidad en el cromosoma 5q. Existen mecanismos alternativos para la iniciación, como la metilación de APC, o las mutaciones en AXIN-2 y BAX.	Los ACF displásicos progresan a adenomas a través de mutaciones en APC. Los no-displásicos se convierten en pólipos hiperplásicos por mutaciones en K-Ras, o en adenomas por mutaciones en genes distintos a APC o b-catenin.	La vía que culmina en tumores MSI-H se caracteriza por la metilación del gen reparador mismatch hMLH1. La vía MSI-L se caracteriza por metilación de MGMT, responsable de la reparación de aductos en el DNA.	El modelo top-down se caracteriza por las alteraciones en la vía WNT (mutaciones APC, b-catenin) El modelo bottom-up se caracteriza por la alteración de la apoptosis (mutaciones en Fas, K-Ras...)	Las bases genéticas son aún hoy desconocidas.
Conclusiones	Las mutaciones en APC solo ocurren en el 60% de CRC esporádicos. Por lo tanto, las mutaciones en APC son un evento temprano de la carcinogénesis colorectal, pero no necesario para la iniciación.	Las mutaciones en K-Ras solo ocurren en el 40% de CRCs esporádicos, por lo cual no puede sustituir a APC como principal evento "iniciador". Por lo tanto, las mutaciones en APC, o la alteración en otros genes de la vía de señalización de WNT (wingless) como b-catenin no son esenciales para la iniciación de la carcinogénesis colorectal.	El silenciamiento en genes reparadores resulta en la adquisición de una resistencia al daño, que en un ambiente selectivo permite adquirir ventajas normales. Se asume que este silenciamiento es posterior a las mutaciones o alteraciones "iniciadoras" como las mutaciones en APC, b-catenin o K-Ras	La disrupción de la apoptosis juega un papel permisivo respecto a la subsiguiente inactivación de los sistemas de reparación del DNA	Este modelo resulta especialmente interesante por la supuesta influencia de polimorfismos genéticos de susceptibilidad como MTHFR.

1.2.4.Principales Genes Supresores de Tumores (TSGs) Implicados en el CRC.

Los Genes Supresores de Tumores son aquellos genes cuya proteína participa en la regulación del ciclo celular, regulando la proliferación y actuando como un freno para la progresión aberrante. La pérdida de su función, por mutación, LOH o metilación es común en la célula tumoral que progresa sin control. El primer TSG identificado fue el gen del retinoblastoma (RB1). RB1 se identificó a través del análisis de pacientes con mutaciones en la línea germinal responsable de un tipo de tumor de retina, el retinoblastoma⁴⁸. La progresión de la célula en la fase S es controlada por RB1 y finaliza con la inactivación funcional de esta proteína vía fosforilación en la fase G1⁴⁹. Sin embargo la frecuencia de mutaciones en el CRC esporádico es relativamente baja, y existen otros TSGs implicados, incluyendo en este grupo de genes los sistemas de reparación del DNA.

1.2.4.1 Loci INK4a/ARF

Localizado en el cromosoma 9p21 en humanos, el loci INK4a/ARF codifica dos productos protéicos; la proteína p16^{INK4a} y la proteína p14^{ARF}. La arquitectura del loci es compleja (**Figura 3**), donde cada proteína está codificada por distintos mRNA, iniciados en distintos promotores. p16^{INK4a}, está codificada por un transcrito que contiene el exón 1 α , 2 y 3, mientras que en p14^{ARF}, el transcrito contiene el exón 1 β , 2 y 3⁵⁰. A pesar de que los exones 2 y 3 son comunes, la secuencia de las proteínas p16^{INK4a} y p14^{ARF} es única y distinta, ya que los exones compartidos se leen en distintas pautas de lectura. Ambas proteínas poseen actividad biológica antiproliferativa e interactúan con las vías

supresoras de tumores dependientes de p53 y de la proteína del retinoblastoma (pRb).

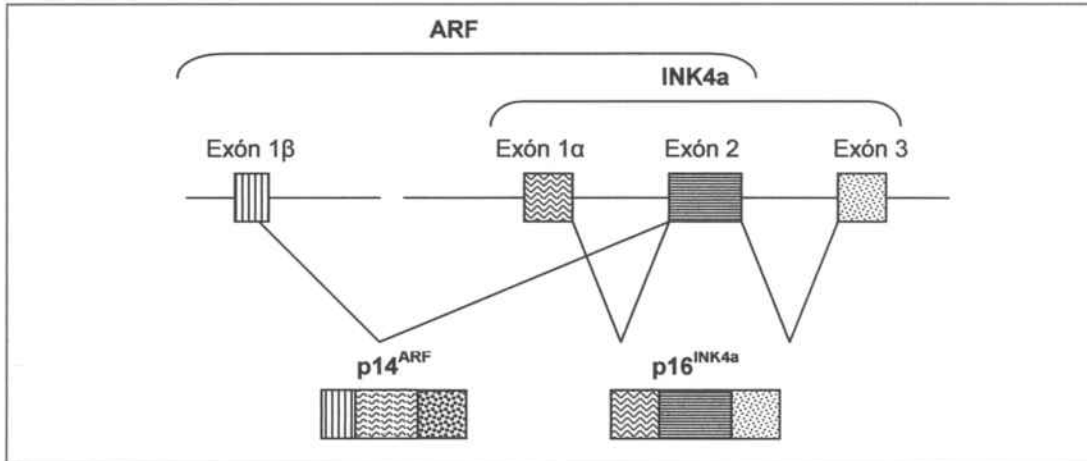


Figura 3. Estructura y organización del loci INK4a/ARF.

p16^{INK4a} pertenece a la familia INK de inhibidores (CKIs) de las quinasas dependientes de ciclinas (Cdk), que también incluyen p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}^{51,52}. Estas proteínas estructuralmente pequeñas, se caracterizan por la presencia de un motivo repetitivo de interacción proteína-proteína, que permite la formación de complejos con Cdk4 y Cdk6. La unión de las proteínas INK a Cdk4/6 induce un cambio alostérico de conformación que interrumpe la interacción con las ciclinas de tipo D⁵³, y esto antagoniza la unión de las ciclinas y la activación de Cdk (**Figura 4**). La familia INK de CKIs no interacciona con otras Cdk y por esta razón su actividad está limitada a la primera mitad de la fase G1 del ciclo celular. p16^{INK4a} actúa en la vía de retinoblastoma, previniendo la activación de Cdk4/6, considerada en muchas situaciones fisiológicas como un evento temprano y esencial para la

fosforilación de la proteína del Rb^{54, 55}. Por lo tanto, la función de p16^{INK4a} es mantener pRb en su estado activo de inhibición del crecimiento, en el cual bloquea la expresión de genes regulados por el factor de transcripción E2F, previniendo la transición de G1 a la fase S. pRb interactúa físicamente con numerosas proteínas, y en muchos casos no se conoce su significado biológico. Una misión importante de pRb consiste en el reclutamiento de complejos de histona-deacetilasas en genes diana específicos. A través de este proceso se mediaría la represión de la expresión⁵⁶. Debido a que pRb no posee motivos de unión a la secuencia de DNA, estos efectos estarían mediados por interacción con factores de unión al DNA específicos.

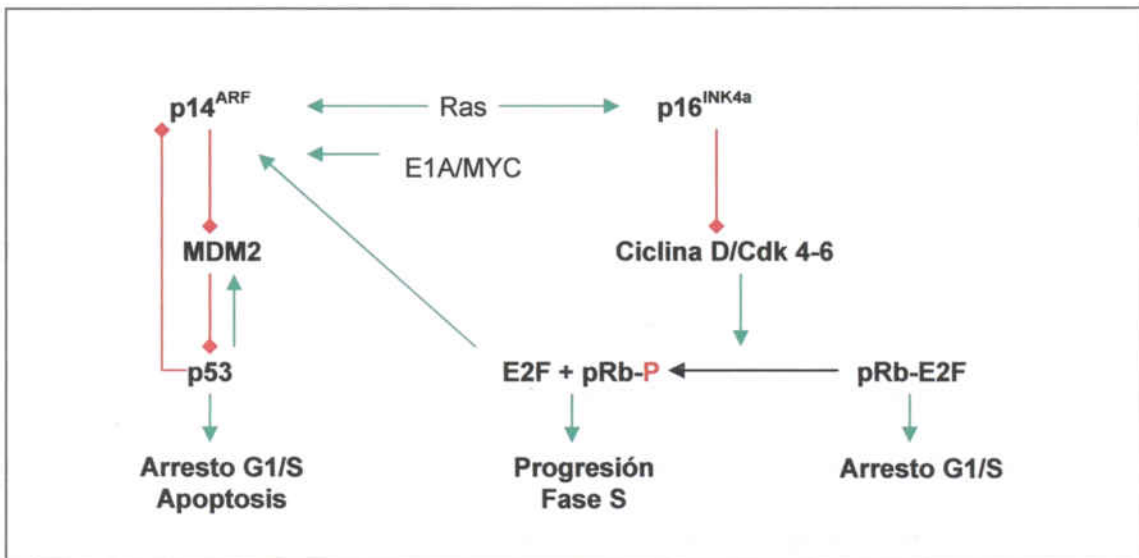


Figura 4. Vías para la supresión de tumores implicada en el locus INK4a/ARF.

p14^{ARF} es una pequeña proteína sin motivos estructurales obvios. ARF se une a la proteína MDM2, la función de la cual es regular negativamente la función de la proteína supresora de tumores p53 (**Figura 4**). p53 es un factor de transcripción que regula baterías de genes implicados en puntos de control del ciclo celular, respuesta al stress, a la reparación del DNA y la apoptosis^{57,58}. MDM2 desempeña distintas actividades; se une a p53 interfiriendo en su actividad de transactivación de genes diana; también sirve como señal para la ligación de ubiquitina que convierte p53 en diana para la degradación; finalmente también puede provocar la translocación de p53 del núcleo al citoplasma⁵⁹. Ya que ARF interfiere con la función de MDM2, la inactivación o supresión de ARF inhibe la expresión de p53. Una diana importante de p53 es la CKI p21CIP1/Waf1 que antagoniza la actividad de diversos complejos Cdk/ciclina, pudiendo parar la célula tanto en la fase G1 como G2⁶⁰. La manera como la célula decide parar el crecimiento o entrar en apoptosis en respuesta a la activación de p53 es compleja y aún parcialmente incomprendida⁶¹, pero este proceso parece estar influenciado por circuitos secundarios de transcripción que podrían modular la respuesta a la activación de p53⁶². Se requiere la inactivación de pRb para permitir la entrada en el ciclo celular y también se requiere cada vez que se decida entrar en la fase S. El promotor de p16^{INK4a} se expresa de forma constitutiva a niveles bajos en distintas situaciones fisiológicas. Se ha descrito la fosforilación de la proteína p16^{INK4a}^{63,64} pero su significado no se conoce todavía. Parece ser que p16^{INK4a} actúa normalmente como un freno constante que debería ser superado por las células que evalúan la decisión de entrar en el ciclo celular en respuesta a una variedad de estímulos positivos. Esta hipótesis es consistente con las

observaciones realizadas con ratones knock-out para p16^{INK4a}, que pueden desarrollarse normalmente y son fértiles, pero sufren una variedad de enfermedades malignas de larga latencia a lo largo de su vida^{65,66}. El gen p16^{INK4a} fué identificado en 1994 como MTS1 (multiple tumor supresor 1)⁶⁷ y se observó que estaba mutado en > 30% de cánceres⁶⁸. Además la cascada D-Cdk4/6-INK4a-Rb-E2F también se ha visto comprometida en prácticamente todos los cánceres humanos, por mutaciones en los genes implicados o alteraciones en reguladores “upstream” de esta cascada⁶⁹.

La expresión de ARF es baja, o esta ausente en muchos tejidos normales. Ratones knock-out para p14^{ARF} se desarrollan normalmente y son fértiles, pero la pérdida de la expresión de p14^{ARF} y de su función, causa un fenotipo con predisposición al cáncer más severo que la pérdida de p16^{INK4a}⁷⁰. La ausencia de ARF debería esperarse que comprometiera la activación de p53 en respuesta a determinados estímulos y la severidad de la predisposición al cáncer pondría de manifiesto la importancia de p53 como punto de control y como regulador de la respuesta apoptótica como mecanismos de supervivencia tumoral. Aún queda por determinar qué supondría la pérdida de expresión de ARF en cánceres humanos.

Los estímulos que activan los promotores de p16^{INK4a} y p14^{ARF} son distintos y podrían explicar el porqué genes, que no son esenciales para el desarrollo normal de la célula, son críticos para la transformación maligna. En principio se describió que p16^{INK4a} era activada durante la replicación senescente y posteriormente en respuesta a la activación de oncogenes como Ras, Raf o MEK⁷¹. El promotor ARF contiene secuencias de unión para E2F y se ha visto que puede ser inducido por niveles altos de expresión de E2F o el proto-

oncogen c-myc⁷². Sin embargo aún hay que conocer su regulación bajo condiciones fisiológicas⁷⁷. Por lo tanto ARF aparece como un puente de unión entre las rutas de pRb y p53 (**Figura 4**) y podría actuar como una válvula de seguridad que desencadena el punto de control dependiente de p53 en respuesta a una hiperactividad comprometida de la cascada D-Cdk4/6-INK4a-Rb-E2F⁷⁴.

1.2.4.2. Sistemas de Reparación Mismatch del DNA. Gen hMLH1.

El gen hMLH1 codifica por una proteína del MMR (sistema de reparación mismatch del DNA). Este sistema participa en la reparación de errores producidos durante la replicación por las DNA polimerasas. Además de corregir los nucleótidos mal incorporados, las proteínas del MMR también participan en la reparación de roturas en la doble hélice del DNA y de errores de recombinación⁷⁵. Concretamente, MMR reconoce “mismatches” en heterodúplex intermedios de la recombinación previniendo la finalización de la recombinación entre secuencias divergentes, la cual cosa promueve la estabilidad genética⁷⁶. MMR también participa en otros procesos de reparación del DNA, como la vía de reparación unida a la transcripción⁷⁶. Finalmente algunos componentes de MMR están involucrados en la regulación del ciclo celular y en la respuesta apoptótica dependiente de p53 en respuesta al daño en el DNA⁷⁷. Esta última observación puede ser muy interesante para el tratamiento quimioterápico de cánceres colorectales con deficiencias en MMR^{76, 81-83}.

La principal función de MMR es la reparación postreplicativa del DNA, tanto la incorporación errónea de bases con unión deficiente entre nucleótidos, como

los “loops” que forman las inserciones o deleciones (IDL). Se postula que este proceso se da en tres etapas; primero el reconocimiento del error en la cadena del DNA, a continuación el ensamblaje del complejo de reparación y finalmente la degradación de la cadena con la secuencia errónea y la síntesis “de novo”⁸¹ (Figura 5). El reconocimiento de bases mal apareadas o de IDLs se lleva a cabo por heterodímeros de proteínas llamadas MutSH, principalmente hMSH2 y hMSH6, que forman el complejo hMutS α (Figura 5). Existe un segundo heterodímero formado por hMSH2 y hMSH3, llamado hMutS β , que reconoce preferentemente IDLs, y que por tanto no puede compensar una pérdida de hMutS α ⁸¹ (Figura 6).

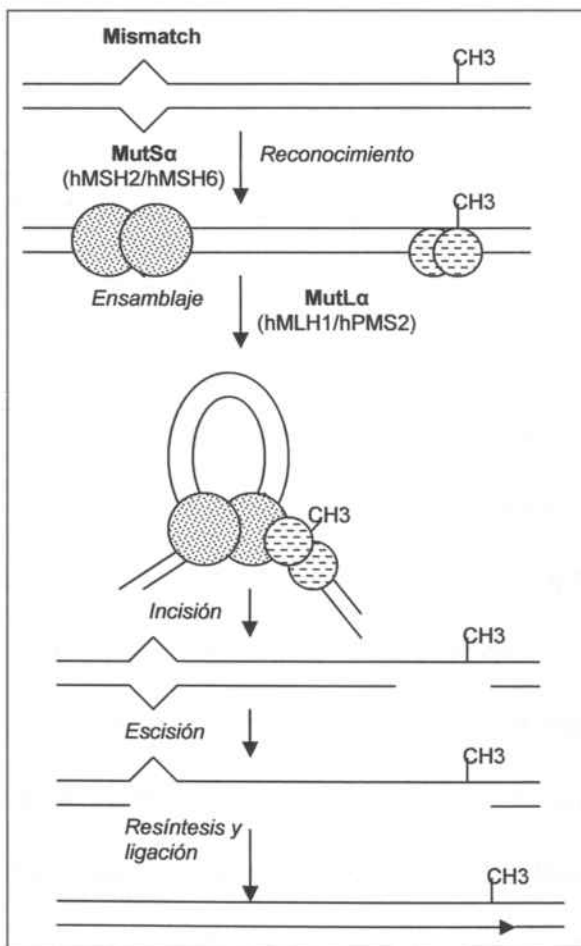


Figura 5. Sistema de reparación Mismatch. El reconocimiento de bases mal apareadas o de IDLs se lleva a cabo por heterodímeros de proteínas llamadas MutSH, principalmente hMSH2 y hMSH6, que forman el complejo hMutS α . A continuación, el extremo carboxiterminal de las proteínas MutS, que codifica por una ATPasa, provoca un cambio conformacional en la proteína que permite el ensamblaje del resto de componentes de MMR⁷². Este complejo esencial es un heterodímero de proteínas MutL., concretamente hMLH1 y hPSM2, que forman el complejo hMutL α . El complejo que se une a continuación es esencial para que se produzca la reparación in situ, que es llevada a cabo por un complejo proteico de polimerasas y endonucleasas que también participan en la replicación⁷⁷.

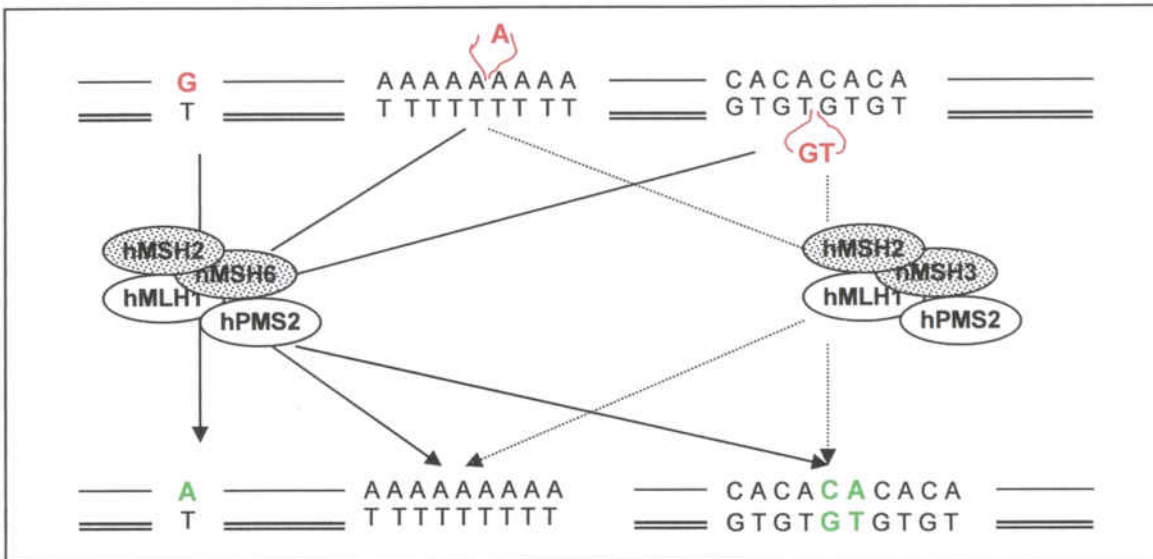


Figura 6. Complejos proteínicos involucrados en el sistema de reparación mismatch. Los tres errores que aparecen; mal apareamiento de bases, loop de inserción de una sola base y deleción de dos bases, son reparados por los complejos hMSH2/hMSH6 (MutS α)-hMLH1/hPMS2 (MutL α). Nótese, que todas las reparaciones se realizan sobre una cadena (línea simple), que es la copia respecto al molde original (doble línea). En ausencia de hMSH6, los loops de inserción/deleción pueden ser reparados por el complejo hMSH2/hSMH3(MutS β)- MutL α (líneas discontinua).

1.3. Alteraciones epigenéticas. Metilación Aberrante

1.3.1. Mecanismos Epigenéticos.

La herencia epigenética se define como la información celular, que es heredable durante la división celular y diferente de la secuencia de DNA en si misma. Existen tres formas, interrelacionadas de herencia epigenética; la metilación de DNA, el "imprinting" genómico y las modificaciones en las histonas. La herencia epigenética es aparentemente importante en muchos procesos fisiológicos y patofisiológicos. Es clave para diferenciar entre células en crecimiento, senescentes e inmortales; entre células tumorales y normales; entre distintos tipos de células diferenciadas y células envejecidas. Los patrones epigenéticos que controlan la expresión génica y que se transmiten a las células hijas, son pues independientes de la secuencia de DNA. Estos patrones pueden convertirse en anormales en ciertas condiciones durante el

desarrollo del feto, predisponiendo a cánceres pediátricos y pueden verse alterados durante el proceso de envejecimiento normal predisponiendo al cáncer en adultos. Además pueden implicar evolución clonal, contribuyendo a la progresión tumoral⁸².

1.3.1.1. Hipometilación y activación de genes.

La pérdida de la metilación en los dinucleótidos CpG fue la primera anomalía epigenética descrita en células cancerígenas. En un simposium de la John Hopkins en 1982, Feinberg y Vogelstein⁸³ propusieron este mecanismo para explicar las altas frecuencias de mutación, la adaptación microambiental del tumor y la plasticidad en determinados tipos de cáncer.

Feinberg y Vogelstein buscaron diferencias entre tejidos normales y tumores⁸⁴. La pérdida de la metilación se observó en todos los tipos de tumor estudiados, benignos y malignos, incluidos los adenomas pre-malignos⁸⁴⁻⁸⁶.

La hipometilación del DNA tiene implicaciones mecánicas. En primer lugar, puede conllevar la activación de genes. Se ha descubierto recientemente que la mayoría de islas CpG se encuentran metiladas en tejidos somáticos normales⁸⁷. Estas islas metiladas, podrían hipometilarse en el cáncer y dar lugar a la activación de la expresión de genes. Ejemplos de genes afectados por hipometilación incluyen el oncogen H-Ras⁸⁸ y en los genes CT (*Cancer Testis Genes*, expresados normalmente en testículo y aberrantemente en cánceres)⁸⁹. La frecuencia de islas hipometiladas puede ser superior, como indican los análisis de tumores por "high-throughput genomic methylation análisis"^{90, 91}, incluyendo cánceres de estómago, riñón, colon, páncreas, hígado, útero, pulmón y cervicales. La idea de que la hipometilación conlleva la

expresión, proviene de estudios donde se observa la activación de genes importantes en el cáncer por demetilación de su promotor, en carcinoma gástrico⁹², en carcinoma renal⁹³, en cáncer colorectal⁹⁴ y en cáncer cervical⁹⁵,⁹⁶. También en cáncer de páncreas se asoció hipometilación con la expresión de genes ligados a proliferación celular^{91, 97}.

En segundo lugar, "el fenotipo metilador" se ha asociado con la reparación "mismatch". Lengauer demostró que las células deficientes en los sistemas de reparación "mismatch" silenciaban construcciones retrovirales por metilación del promotor⁹⁸. Esta idea fue cuestionada por Jones⁹⁹. Sin embargo la hipótesis tiene sentido, ya que la hipermetilación del gen reparador "mismatch" hMLH1 es común en cánceres defectivos de estos sistemas, como demostró primero Kolodner¹⁰⁰.

En tercer lugar Ehrlich¹⁰¹ ha asociado recientemente la hipometilación en cáncer con la inestabilidad cromosómica. La hipometilación es particularmente severa en las secuencias satélite pericentroméricas. En algunos tumores se pueden observar translocaciones cromosómicas con puntos de rotura en el DNA de los pericentromeros de los cromosomas 1 y 16¹⁰¹. Estos reordenamientos son específicos, y no son debidos a la inestabilidad genómica global. La desmetilación de las secuencias de microsatélites podría predisponer a su rotura y recombinación. Sin embargo la presunta relación causal de la hipometilación con estos cánceres no ha podido ser demostrada.

En cuarto lugar, la hipometilación es un mecanismo mediante el cual se modifica la respuesta a fármacos, tóxicos y virus. A parte de la amplificación génica, la hipometilación de MDR1 se correlaciona con un incremento de su expresión y con la resistencia a los fármacos en leucemia mieloide aguda¹⁰². El

mecanismo de acción de alguna sustancia carcinógena podría explicarse a través de la modificación de la metilación. Por ejemplo, el cadmio inhibe las DNA metiltransferasas (DNMT) y conlleva una hipometilación aguda, que va seguida de hipermetilación¹⁰³. De un modo similar el arsénico induce la hipometilación de Ras en ratón¹⁰⁴. Finalmente, la latencia del cáncer cervical parece ser causada en parte por la hipermetilación del genoma HPV16, y el virus Epstein-Barr en células de linfoma utiliza una estrategia similar para silenciar a un subgrupo de genes^{96, 105}. En el cáncer cervical, la activación del genoma HPV y la progresión ocurren por una desmetilación progresiva del virus en lesiones precursoras.

Recientemente se ha descrito una nueva e interesante relación entre cáncer y metilación que incluye la dieta. Un polimorfismo común en el gen de la metileno-tetrahidrofolico-reductasa (MTHFR), del que hablaremos más adelante, que participa en la biosíntesis del SAM (S-adenosil-metionina), se ha asociado con un incremento de la prevalencia de cáncer colorectal, siendo menor su incidencia en individuos con mayor consumo de metionina, lo que incrementaría el contenido en metilos¹⁰⁶. Estos estudios son consistentes con estudios en roedores en los que se muestra como dietas deficientes en colina, o en colina y metionina, conducen a hepatoma, sin añadir ningún otro carcinógeno¹⁰⁷.

1.3.1.2. Hipermetilación y silenciamiento génico.

Baylin y Nelkin¹⁰⁸, en 1986, examinando la calcitonina se sorprendieron al encontrar hipermetilación locus-específica, en las islas CpG del promotor, con un relativo silenciamiento de la expresión del gen. Sin embargo, el gen de la

calcitonina no es un TSG. La primera evidencia de la relación entre hipermetilación y silenciamiento de TSGs se encontró con el primer TSG descrito, el gen del retinoblastoma Rb. En 1991 Dryja demostró que el silenciamiento era específico y estaba confinado a un alelo^{109, 110}. Sakai¹¹¹ demostró posteriormente, en 1993, un 92% de reducción en la expresión de Rb en tumores con hipermetilación. En 1995, diversos grupos, incluidos Baylin, Jones y Sidransky, confirmaron hipermetilación en los promotores de numerosos loci en células cancerígenas, reforzando el rol principal de la inactivación epigenética en el cáncer. TSG clave, como p16^{INK4a}, hMLH1, VHL, y E-catenin, habrían desaparecido en líneas celulares y en tumores primarios a través de una densa metilación en las islas CpG de los promotores de estos genes¹¹². Issa¹¹³ encontró patrones de metilación que indicaban una clasificación dicotómica de los carcinomas humanos en grupos de tumores con metilación en promotores frecuente, y tumores infrecuentemente metilados. Esto la llevó a la idea del fenotipo metilador de islas CpG (CIMP).

El papel de la metilación del DNA como conservador del estado de silenciamiento epigenético, se puso de manifiesto por la potencia de los fármacos demetilantes en reactivar la expresión génica y por estudios recientes usando células somáticas knock-out y RNA antisense para eliminar las DNA metiltransferasa celulares^{114, 115}. Estas manipulaciones resultan en la reactivación de TSGs, pero los detalles dependen del método utilizado debido a que el grado de eliminación varía en función del método.

Otro punto discutible es que el mecanismo inicial del silenciamiento de los genes es la hipermetilación. Por ejemplo¹¹², se demostró que la reactivación de hMLH1 con 5-azaCdR es revertida rápidamente de forma espontánea. Por lo

tanto, los cambios en la metilación podrían seguir otros cambios epigenéticos, como la modificación de la cromatina, ayudando entonces al estado de silenciamiento. También se ha descrito la metilación de la lisina 9 de la histona H3 (modificación de cromatina) que ocurre juntamente con el re-silenciamiento de p16^{INK4a} en ausencia de metilación del DNA, en células en las que previamente se había eliminado la expresión de DNA metiltransferasas por Knock-Out¹¹⁶. También Clarck y Melki¹¹⁷ describen el silenciamiento de p16^{INK4a} en colonias proliferativas de células epiteliales mamarias que escapan de la senescencia, en ausencia de metilación, sugiriendo que dicha metilación no es responsable del silenciamiento, pero lo puede favorecer.

1.3.1.3 Otros mecanismos epigenético; “imprinting” genético y modificación de histonas.

El tercer mecanismo epigenético, la modificación de las histonas, es el último vinculado al estudio del cáncer. La relación entre metilación del DNA y estructura de la cromatina se reveló en los años 80 con el estudio de Cedar y Graessmann^{118, 119} en el que fragmentos de DNA, pre-metilados in vitro y microinyectados o transfectados en células, sólo eran transcripcionalmente silenciados después de ser empaquetados en una forma de cromatina que reprimía su expresión. La proteínas que se unen a las CpG metiladas MECP2 y MBD2 (identificadas por Bird, Baylin y Wolfe)^{120, 121}, así como las DNA metiltransferas (DNMT1, DNMT3A, y DNMT3B), están asociadas físicamente con las histonas deacetilasas^{122, 123} (**Figura 7**). DNMT1 mantiene los patrones de metilación durante la replicación, mientras DNMT3A y DNMT3B pueden añadir metilos en el DNA previamente no metilado (metilacion “de novo”).

Jenuwein y Allis^{124, 125} han reconocido que la metilación de los residuos lisina de las histonas es crucial en la regulación de la expresión. La metilación de las histonas es una explicación de la perpetuación del silenciamiento génico a través de las divisiones celulares. El estado de silenciamiento puede ser mantenido por un ciclo de metilación de histonas, que es catalizado por la histona metiltransferasa SUV39H1 seguido del reclutamiento de la proteína heterocromatina -1 (HP-1) que se une a la lisina 9 de la histona metilada, lo que perpetua el ciclo reclutando a SUV39H1. Jones encontró que la metilación en la lisina 9 de la histona H3 correlacionaba con el silenciamiento de p16^{INK4a}¹²⁶. Sin embargo, Volgstein encontró que en células sin DNA metiltransferasa sometidas a pases prolongados en cultivo, la metilación de la lisina 9 acompañaba al resilenciamiento independiente de la metilación de p16^{INK4a} demetilada¹¹⁶. El ciclo de metilación de histonas/HP-1 está presente en diversos organismos, desde los hongos hasta la *Drosophilla* y también en el hombre. Es un mecanismo antiguo de propagación del estado epigenético, mientras que el mecanismo análogo de metilación de CpG/ unión histona deacetilasa es evidentemente de aparición más tardía¹²⁷.

Heinkoff y Ahmad¹²⁸ observaron que las histonas pueden ser reemplazadas selectivamente en loci activos transcripcionalmente, de manera independiente a la replicación del DNA. Este proceso supone la acumulación dependiente de la transcripción de una variante de las histonas altamente conservada (H3.3) que substituye a la H3 habitual.

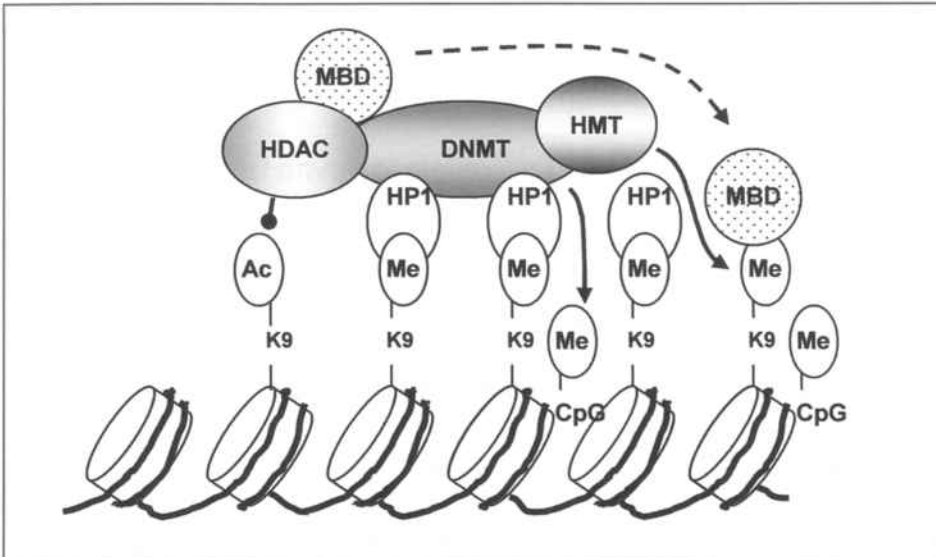


Figura 7. Organización y cooperación de los mecanismos implicados en la organización de la cromatina responsable del silenciamiento génico en células normales y tumorales. Las modificaciones en las histonas, especialmente en los residuos lisina (K9), incluyen la acetilación (Ac) y la metilación (Me). HP-1 reconoce los residuos lisina metilados y a su vez favorece la unión de HMT (histona metiltransferasa). Las histonas deacetilasas (HDAC) deacetilan los residuos lisina como paso previo a su metilación. Las DNA metil transferasas (DNMT) participan formando un complejo multiproteico con HDAC y HMT, así como MBD (methyl-C binding proteins) que se une al DNA metilado a través del complejo anterior.

El reemplazamiento de histonas, que probablemente ocurre después de la invasión del promotor por factores de transcripción fuertemente activados, es un mecanismo para explicar la reactivación de la expresión de genes silenciados vía metilación de histonas, ya que no se han descrito histonas demetiladas¹²⁹.

El término "Imprinting" se refiere al condicionamiento de los genomas materno y paterno durante la gameto génesis, de modo que un alelo parental específico es más abundante o exclusivamente expresado en la descendencia¹³⁰. Este silenciamiento se mantiene por la acción conjunta de la metilación en el DNA y las modificaciones en las histonas.

1.3.2. Metilación Aberrante en Islas CpG en el Envejecimiento

Las alteraciones epigenéticas se han implicado en la etiología y/o en las consecuencias del envejecimiento¹³¹. Debido a que la metilación es un mecanismo importante de regulación epigenética, el proceso ha sido estudiado en células envejecidas, es decir sometidas a múltiples procesos de división¹³². Estos estudios demuestran una hipometilación global relacionada con la edad^{133, 134}. Sin embargo, el mecanismo y la significación funcional de esta hipometilación, también observada en distintos tipos de cáncer, permanece sin esclarecer. Recientemente, se ha descrito hipermetilación en islas CpG localizadas en promotores de diversos genes relacionados con la edad. El primer gen bien caracterizado relacionado con el envejecimiento y la metilación de islas CpG en tejidos normales, fue el gen del receptor estrogénico (ER)¹³⁵. La metilación de ER en mucosa colónica normal, incrementa linealmente con la edad y es muy frecuente en cáncer colorectal. Líneas celulares de cáncer de colon y mama con dicha metilación, no expresan ER y la expresión de mRNA puede ser restaurada con inhibidores de la metilación. Estos resultados indican que la hipermetilación del promotor de ER correlaciona con el silenciamiento transcripcional de este gen. Cual es el significado de la metilación del gen ER en el desarrollo del cáncer colorectal ?. La re-expresión de ER, por introducción de una construcción exógena en líneas celulares que habían perdido la expresión, puede suprimir el desarrollo de estas células cancerígenas. Estos resultados indican que la disrupción de la señalización vía ER puede ser un evento importante y temprano en la carcinogénesis colorectal. Además el CRC es principalmente una enfermedad de individuos de edad avanzada. Por lo tanto es posible que la metilación de

ER sirva como puente de unión entre envejecimiento y cáncer por desregulación del crecimiento y diferenciación del epitelio colónico normal, predisponiendo estas células a la transformación neoplásica.

Otro gen afectado por la metilación relacionada con el envejecimiento es el “insulin-like growth factor 2” (IGF2). IGF2 regula el crecimiento y desarrollo en tejidos normales y malignos¹³⁶. En individuos jóvenes, el promotor P2-4 se encuentra metilado únicamente en el alelo materno silenciado. Durante el envejecimiento, la metilación del promotor se extiende e implica al alelo originalmente no metilado¹³⁷. Muchos tumores en adultos, incluidos los de colon, mama, pulmón y leucemias, muestran un incremento en la metilación del promotor P2-4 IGF2, sugiriendo una propagación durante el proceso neoplásico. En estos tumores, esta metilación se asocia con una disminución o una inhibición de la expresión de IGF2 a partir del promotor P3 metilado, pero no del promotor P1, situado fuera de la isla CpG de IGF2. Debe añadirse que el cerebro de rata adulta expresa IGF2, y que su expresión disminuye con la edad¹³⁸, sugiriendo una posible regulación a través de metilación dependiente del envejecimiento.

Otros estudios muestran en diferentes tejidos que muchos genes frecuentemente metilados en cáncer presentan un cierto grado de metilación en tejido normal. Por ejemplo Liang et al¹³⁹, encontraron que muchos loci metilados en cáncer de colon, vejiga y próstata también estaban parcialmente metilados en los tejidos normales. Se han obtenido resultados similares en cáncer de mama¹⁴⁰ y en cáncer de pulmón¹⁴¹. Si bien no se ha determinado el papel del envejecimiento en estos tejidos, parece claro que muchos eventos de

metilación en el cáncer, reflejan el hecho de que el tumor deriva de células normales con un alto grado de metilación en islas CpG.

Las causas de la relación envejecimiento-metilación son desconocidas. La especificidad de tejido sugiere, para algunos genes, que el nivel de expresión es importante para proteger de la metilación de novo. Por otra parte, la variabilidad interindividual es alta entre personas de la misma edad¹³⁹, lo que podría explicarse por factores ambientales y genéticos¹⁴³.

Está generalmente aceptado que la acumulación de mutaciones en células somáticas juega un papel clave en las múltiples etapas de la carcinogénesis²². Aunque estos cambios genéticos pueden explicar, por sí solos, el incremento de la incidencia del cáncer con la edad, otros factores como los cambios epigenéticos, pueden influenciar la susceptibilidad individual. La metilación relacionada con el envejecimiento en determinados genes, como ER, puede suponer una ventaja selectiva para que células colónicas normales presenten un crecimiento y una diferenciación descontrolada¹³⁵. Estas células tendrían entonces una mayor susceptibilidad para adquirir lesiones genéticas, como mutaciones en APC. Esta situación no es aplicable para otros genes como MyoD que no se expresa en colon normal. En este aspecto, la metilación relacionada con el envejecimiento actuaría como las deficiencias en los genes reparadores mismatch, donde existen varios loci afectados, pero sólo unos pocos con relevancia funcional.

Los loci que aparecen metilados con la edad se ha propuesto agruparlos bajo el nombre de loci tipo A, por "aging-dependent methylation".

1.4. Metilación Aberrante en el CRC.

La alteración en los patrones de metilación puede ir ligada a procesos fisiológicos o a procesos patológicos. Como se ha comentado anteriormente, la metilación aberrante está relacionada con el proceso fisiológico del envejecimiento, afectando a un conjunto de genes que han sido agrupados como genes tipo A (aging-dependent methylation). En contraposición a esta alteración en tejidos normales, existe un proceso de metilación aberrante que exclusivamente afecta a las células tumorales y concretamente a un grupo de genes que se han llamado genes tipo C (cancer-dependent methylation). Estos genes solo aparecen metilados en el cáncer y no en tejidos normales, envejecidos o no (**Figura 8**).

Como ya se ha dicho, además de los cambios mutacionales que pueden inactivar los genes supresores de tumores, los mecanismos epigenéticos juegan un papel predominante en el CRC. La metilación aberrante de DNA ocurre frecuentemente en la carcinogénesis del colon. Constituye un desequilibrio en la metilación del DNA que se cree ocurre tempranamente en el desarrollo del tumor y que se caracteriza por una amplia hipometilación del genoma y una hipermetilación regional y locus-específica¹⁴⁴. La metilación de los residuos de citosina en las zonas CpG (5'citosina-guanina3') en las regiones reguladoras de los genes puede reducir o suprimir su expresión (silenciación transcripcional). La metilación por tanto, representa una alternativa a la mutación como mecanismo de inactivar a los genes supresores de tumores.

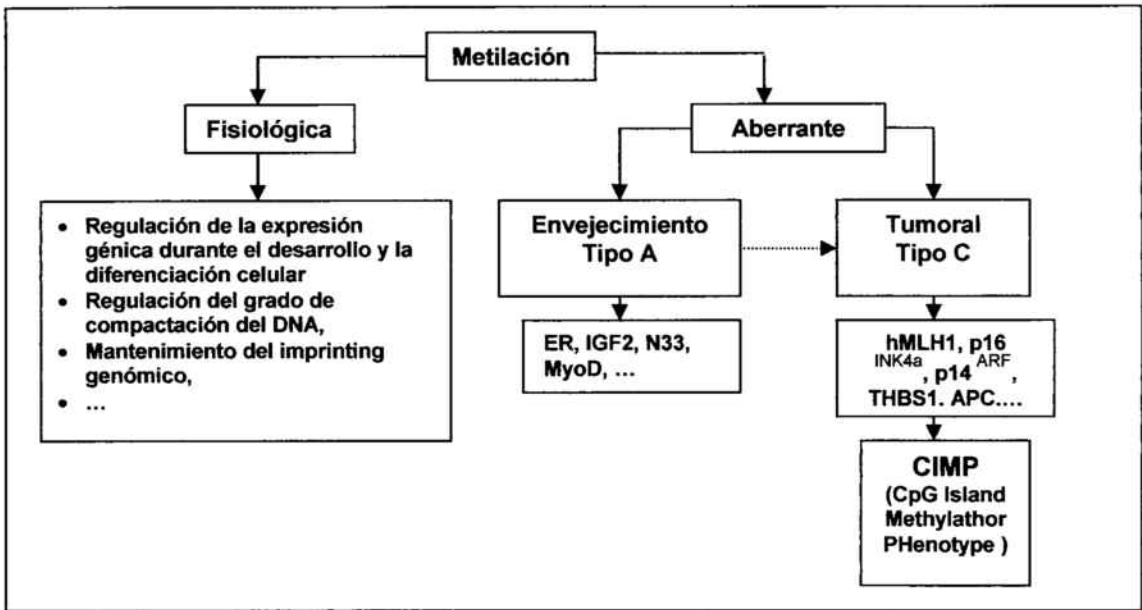


Figura 8. Tipos de Metilación en el CRC. La metilación de tipo A, asociada al envejecimiento puede ser un factor que predisponga al desarrollo del tumor y es anterior a la metilación de tipo C. En cualquier caso, tanto la metilación de tipo A como de tipo C, son dos alteraciones del patrón de metilación normal y fisiológico, esencial para diferenciar entre células senescentes y en crecimiento y entre distintos tipos de célula diferenciada.

Se conoce desde las últimas dos décadas que el DNA de tumores colorectales se encuentra hipometilado respecto el DNA de epitelio colónico normal^{95, 96}. Recientemente se ha observado que dinucleótidos CpG específicos, se encuentran frecuentemente metilados en este tipo de tumores¹⁴⁵, dando lugar al denominado “CpG Island Methylator Phenotype” o CIMP+, como ya se ha comentado con anterioridad¹⁴⁶. La hipometilación contribuye a la activación de oncogenes, mientras que la hipermetilación específica de islas CpG se asocia al silenciamiento transcripcional de genes supresores de tumores. Sin embargo la relación entre estos dos fenómenos epigenéticos no ha sido descrita en el CRC. Intuitivamente uno podría esperar que los tumores con hipometilación general severa pudieran presentar una menor frecuencia de metilación en CpG, debido a la menor disponibilidad de grupos metilo. Sin embargo no existe asociación aparente entre los dos fenómenos.

La hipometilación general del genoma en la mucosa colónica puede ser un factor que predisponga al desarrollo del CRC, por lo tanto la identificación de factores ambientales y factores genéticos de riesgo asociados a esta condición constituye una importante área de investigación. En estudios recientes¹⁴⁶ se ha asociado la hipometilación con la edad, pero no existe relación aparente con el género o la localización anatómica del tumor. Los dos principales resultados de este estudio son; 1) la hipometilación global del genoma ocurre independientemente de la hipermetilación locus específica, 2) la hipermetilación ocurre de forma más frecuente en pólipos hiperplásicos que en adenomas del mismo tamaño, particularmente en el colon proximal.

Por tanto, la hipometilación no identifica realmente subtipos moleculares de CRC, mientras que la hipermetilación específica de CpG, describe distintos tipos de tumores; CIMP(+)/CIMP(-). Los tumores CIMP(+) se caracterizan por ser pobremente diferenciados, localizarse en el colon proximal y parecen derivar posiblemente de pólipos hiperplásicos. Aparentemente también tienen menor grado de mutaciones en K-Ras o p53, una mayor frecuencia de MSI (+) (vinculado a la metilación de hMLH1) y un peor pronóstico en comparación con tumores CIMP(-)^{125,147, 148}.

1.4.1. Fenotipo Metilador de Islas CpG (CIMP) en CRC.

A pesar de que la frecuencia de metilación aberrante en loci tipo A (aging-dependent methylation genes) es bastante elevada, la metilación de islas CpG de otros genes es relativamente rara y detectada específicamente en tumores. Estos genes, como ya se ha comentado anteriormente, se han agrupado como de tipo C (Cancer Specific Genes) (**Tabla 3**)¹⁵¹.

Muchos TSGs metilados en cáncer, como VHL, p16^{INK4a} o hMLH1 se encuentran en esta categoría. La metilación en genes de tipo C no se ha detectado en tejido sano¹⁴⁹ y de hecho muchas de las islas CpG en región 5' se encuentran libres de metilación, permitiendo la expresión de dichos genes¹⁵⁰.

Tabla 3. Genes Metilados en el Cáncer Colorectal³⁹.

Gen	Función
hMLH1	Reparador DNA mismatch
P16^{INK4a}	Control ciclo celular
P14^{ARF}	Regulación p53
HPP1/TPEF (hyperplasic polyposis protein1/transmembrane protein Epidermal growth factor)	Pro-anoikis/apoptosis
MGMT (O-6-methylguanine-DNA methyltransferasa)	Reparación DNA
THBS1 (thrombospondin 1)	Angiogénesis
APC (adenomatous polyposis coli)	Crecimiento y diferenciación
COX-2 (cyclooxygenase-2)	Regulación del crecimiento
CDH1 (E-cadherin)	Adhesión celular
RIZ1 (retinoblastoma protein-interacting zinc finger)	Regulación transcripción
RASSF1A (Ras-association/Ras-efector Nore 1)	Señalización celular

La metilación en genes de tipo C en cáncer colorectal, sin embargo, no parece ser un proceso totalmente aleatorio. Previamente se ha descrito la relación entre MSI y metilación en p16^{INK4a} en cáncer colorectal sugiriendo que esta relación estaba causada por un fenotipo hipermetilador⁴⁰. Para estudiar esta relación con mas detenimiento, JP Issa¹⁵¹ estudió clones de islas CpG de

cáncer colorectal obtenidos por MCA/RDA (methylation-sensitive representational difference análisis)¹⁵². De los 33 clones, siete estaban metilados únicamente en tumores y se englobaron en la categoría de tipo C. La metilación de estos clones de tipo C se detectó únicamente en un subgrupo de tumores y todos ellos mostraron metilación en múltiples islas CpG simultáneamente. Este fenotipo se ha designado como CIMP(+). Los tumores CIMP(+) de cáncer colorectal promediaban metilación en 5.1 loci (sobre siete), versus el 0.3 de los tumores CIMP(-). Además, CIMP afecta la metilación de TSGs conocidos. Por ejemplo, p16^{INK4a}, el inhibidor de CDK que más frecuentemente se encuentra alterado en neoplasias humanas¹⁵³, está metilado exclusivamente en tumores CIMP(+) (69% vs 0%). Otra diana para CIMP en cáncer colorectal es THBS1⁴⁰, un inhibidor de la angiogenesis regulado por p53¹⁵⁴. La metilación aberrante del promotor del gen THBS1, se detecta únicamente en tumores CIMP(+). Por lo tanto, CIMP contribuye a la formación y progresión del cáncer, afectando la expresión de múltiples genes, alguno de los cuales se encuentra implicado en la regulación del ciclo celular, la angiogenesis y la apoptosis.

Un interesante ejemplo de las consecuencias potenciales del fenotipo CIMP en cáncer colorectal se encuentra en los tumores que muestran MSI, como ya se ha discutido en apartados anteriores, a través de la metilación de hMLH1.

Existiría la posibilidad de que los defectos en "mismatch", por ellos mismos, pudieran causar la metilación aberrante, ya que los errores en CpG son un sustrato altamente eficientes para las metiltransferasas¹⁵⁵. Sin embargo, dos líneas de evidencia sugirieron que la inestabilidad en microsatélites seguía, y era consecuencia, de CIMP y metilación aberrante en hMLH1. Primero, CIMP

era detectable en aproximadamente la mitad de los adenomas colónicos pre-neoplásicos, pero ninguno de ellos presentaba metilación en hMLH1 y MSI es muy raro en este tipo de lesiones¹⁵⁶. Segundo, CIMP no es simplemente causado por deficiencias en "mismatch", ya que MSI esta ausente en la mitad de los tumores CIMP y CIMP está ausente en una tercera parte de los tumores con MSI. Estos resultados sugieren que las alteraciones epigenéticas inducidas por CIMP son capaces de causar otras alteraciones genéticas a través de la inactivación de los genes reparadores "mismatch", lo que conlleva mutaciones en TSGs como TGFbRII¹⁵⁷ y BAX¹⁵⁸.

A pesar de que CIMP se observó primero en cáncer colorectal, existen evidencias que soportan que éste sea un evento común en neoplasias en distintos tejidos. Este hecho se ha observado en cáncer gástrico (donde hMLH1 y p16^{INK4a} son dianas) y en cáncer de endometrio con metilación en hMLH1. Otros estudios han explorado el fenotipo CIMP en cáncer de vejiga, próstata y mama^{139, 140}.

CIMP fue originalmente definido usando un panel de seis clones nuevos, con diferente metilación en islas CpG requiriéndose que los tumores estén metilados en tres o más de estos loci (MNT; Methylation Normal in Tumor)¹⁵⁹. Este umbral de tres loci está basado en la distribución de la metilación; la mayoría de los casos (93%) no tenían ningún loci metilado, o un único loci, o como mínimo cuatro loci metilados. Por lo tanto, cambiar el umbral de dos a cuatro loci no cambiaba significativamente la clasificación CIMP. Además, los casos que presentaban metilación en los tres loci MNT también metilaban p16^{INK4a}, sugiriendo un fenotipo hipermetilador real en todos los casos¹⁵⁹.

1.4.2. Papel de la Metilación Aberrante en Islas CpG en el Desarrollo del CRC.

Basándonos en estudios anteriores, se ha propuesto un modelo (**Figura 9**) que integra la metilación en las islas CpG en el desarrollo del cáncer colorectal. En este modelo la metilación en las islas CpG juega dos papeles diferenciados con distintos mecanismos. Inicialmente, la metilación de tipo A aparece en función de la edad en células epiteliales normales. Cuando se afectan genes que regulan el crecimiento y/o la diferenciación de dichas células, esta metilación resulta en un estado de hiperproliferación, que podría preceder a la formación de un tumor en el colon¹⁶⁰. Esta hiperproliferación puede darse con el envejecimiento del epitelio colónico¹⁶¹ y es más pronunciada en pacientes con cáncer colorectal. Las causas de la metilación de tipo A son desconocidas, pero se especula que está relacionada con factores endógenos inherentes a la estructura del DNA y podría ser influenciada por factores como los niveles de expresión de los genes y la exposición a carcinógenos.

Un segundo rol de la mutación en islas CpG aparece, tal vez, en la aparición del adenoma. Esta metilación de tipo C, afecta únicamente a un subgrupo de tumores, que entonces evolucionan a través de la ruta CIMP inactivando simultáneamente múltiples TSGs como p16^{INK4a} o hMLH1. La causa de esta hipermetilación global no se conoce, pero podría estar relacionada con la inactivación de genes que protegen contra la metilación de novo. Finalmente proponemos que los tumores sin CIMP evolucionan siguiendo vías clásicas de inestabilidad genómica. Esta hipótesis se basa en el hecho de que estos tumores presentan con mayor frecuencia mutaciones en p53, que tumores colorectales CIMP(+)¹⁵⁹.

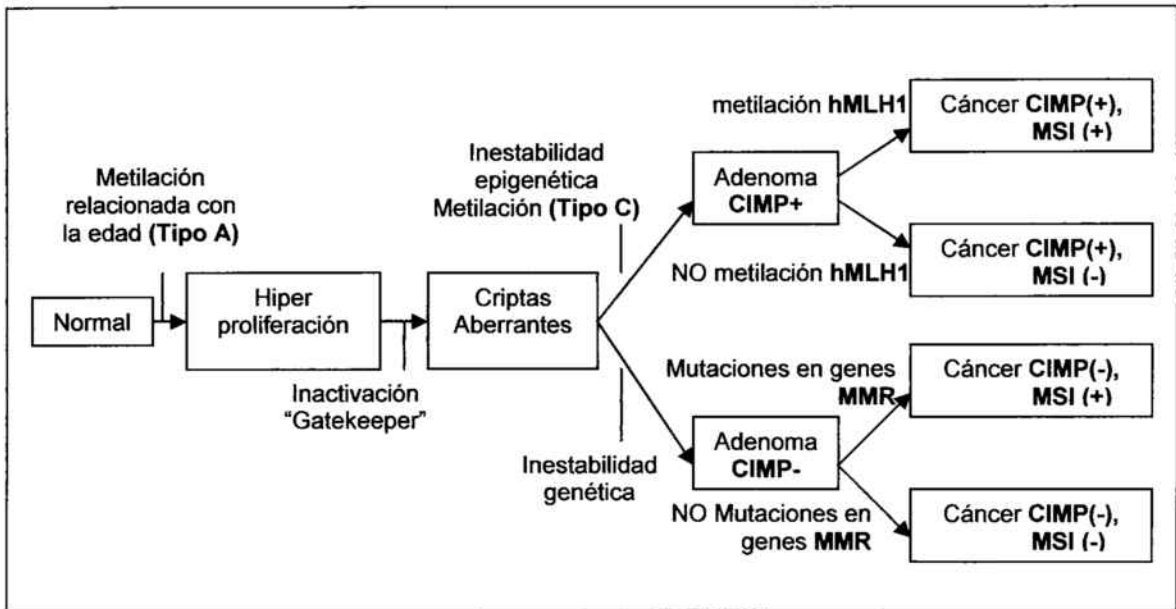


Figura 9. Modelo de carcinogénesis colorectal integrando las alteraciones epigenéticas.

Inicialmente, en función de eventos relacionados con la edad, unas pocas células del epitelio padecen alteraciones en la metilación, desde una hipometilación general del genoma, a una hipermetilación locus específica. Esto implica un progresivo estado de hiperproliferación. Algunas de estas células pueden adquirir otras alteraciones, como mutaciones en APC y b-catenin (que pueden considerarse "gate-keeper"), promoviendo la formación de criptas aberrantes. Estas lesiones premalignas pueden convertirse en adenoma y carcinoma a través de la vía clásica de inestabilidad genómica (mutaciones p53,...), o a través de la vía del fenotipo metilador (Metilación tipo C), es decir la vía de la inestabilidad epigenética.

Este modelo puede ser aplicado a otras enfermedades malignas. De hecho, se han observado evidencias de metilación de tipo A y tipo C en tumores de cerebro y como ya se ha mencionado, la presencia de CIMP puede darse en diversos tipos de cáncer, incluidos cánceres gástricos, endometrio, y enfermedades malignas hematopoiéticas¹⁵⁹. Se sugiere por tanto, que la metilación aberrante en islas CpG debe verse como un proceso profundamente alterado en células tumorales. Como en los defectos del sistema de reparación "mismatch", este proceso resulta en la inactivación de múltiples genes, algunos de los cuales son críticos para la formación y progresión del tumor. Es importante que, al contrario que los defectos genéticos, la metilación en las

islas CpG puede ser revertido, utilizando inhibidores específicos, indicando nuevas oportunidades terapéuticas en la prevención y tratamiento de neoplasias.

1.5. Metilación en los Genes Supresores de Tumores (TSG).

La inactivación de TSGs por metilación aberrante se describió por primera vez para el gen del retinoblastoma (RB1)¹⁰⁶. A pesar de que se detectaron mutaciones en RB1 en la mayoría de casos esporádicos de retinoblastoma, no en todos los casos se encontraron mutaciones. Una serie de estudios indican ahora que aproximadamente entre el 10-15% de casos de retinoblastoma esporádico se asocian con hipermetilación de las islas CpG del promotor de RB1^{106, 162}. La hipermetilación de RB1 impide la unión del "retinoblastoma binding factor 1" (RB1F1) y de otros factores activadores de la transcripción, todo ello resultando en una considerable reducción de la expresión de RB1¹⁰⁷. Además, mutaciones y metilación de RB1 son mutuamente excluyentes en tumores, sugiriendo una implicación funcional similar.

Recientemente, se ha descrito hipermetilación en aproximadamente la mitad de los TSGs responsables de síndromes familiares de cáncer, como VHL¹¹⁰, p16^{INK4a}¹¹¹, E-Cadherin¹⁶³, BRCA1¹⁶⁴ y hMLH1³⁶, en varios cánceres esporádicos jugando un papel predominante en la inactivación de estos TSGs. Otros genes con funciones potenciales de TSG también aparecen inactivados por metilación en cánceres esporádicos como p15^{INK4b}¹⁶⁵ o MGMT^{166, 167}.

1.5.1. Metilación p16^{INK4a}

La pérdida de la función p16^{INK4a} se observó inicialmente en diversas líneas celulares de tumores humanos^{67, 167}, debida principalmente a deleciones del gen. Esta inactivación se daba muy frecuentemente, pero contrastaba con la baja frecuencia de deleciones en p16^{INK4a} o mutaciones intragénicas en homocigosis en tumores primarios¹⁶⁰ (**Tabla 4**).

Tabla 4. Frecuencia de inactivación de p16^{INK4a} en distintos tipos de tumor y por diversos mecanismos¹⁷².

Tipo de Tumor	% Delección	% Mutación	% Metilación	% Total
Páncreas	30	32	13	75
Esófago	22	14	35	71
Cabeza y cuello	27	11	30	68
Glioma	33	4	29	66
Pituitaria	6	0	59	65
Leucemia	25	2	34	61
Vejiga	32	4	23	59
NSCLC	20	14	24	58
Mesoepitelioma	56	0	0	56
Gástrico	4	1	39	44
Linfoma	12	2	19	33
Mama	7	4	20	31
Colon	0	0	27	27
Melanoma	14	7	5	26
Ovario	6	4	15	25
SCLC	3	12	0	15
Próstata	4	3	7	14
Sarcoma	8	1	46	9
Células Renales	8	0	0	8

Finalmente se describió la metilación de las islas CpG del promotor de p16^{INK4a} como mecanismo de silenciamiento de la expresión del gen. La hipermetilación de dicho promotor se ha asociado con ausencia completa de la expresión del gen en cánceres de cabeza y cuello, pulmón, cerebro, colon, esófago y de vejiga¹⁷². Estudios por inmunohistoquímica correlacionan el estatus de metilación de gen con los niveles de expresión¹⁷¹.

El tratamiento con inhibidores de la metilación, como 5-azacitidina da lugar a una disminución de la metilación del promotor de p16^{INK4a}, con la recuperación de la expresión y retención del ciclo celular en la transición G1/S¹¹³.

1.5.2. Metilación p14^{ARF}

Las deleciones observadas en líneas celulares que afectan a INK4a también afectan a la funcionalidad de p14^{ARF}, así como las pequeñas deleciones o las mutaciones puntuales en exones compartidos entre ambas proteínas¹⁷³.

Diversos estudios han descrito que la pérdida de expresión en p14^{ARF} afecta también a p16^{INK4a} en melanoma¹⁷⁴ y glioma¹⁷⁵.

Un análisis reciente examinó 714 tumores primarios y líneas celulares para observar el estatus de p14^{ARF}, p16^{INK4a} y p53¹⁷⁶. En conclusión los autores adjudicaron a p14^{ARF} un papel menor que p16^{INK4a}, ya que las mutaciones y deleciones que afectaban a uno afectaban a otro y las alteraciones en p16^{INK4a} eran más frecuentes. El papel de p14^{ARF} en la ruta de p53, permite especular una relación inversa entre las alteraciones en ambos genes, como ocurre con p16^{INK4a} y Rb^{172, 176}. En el caso de p14^{ARF} y p53 esta relación no se observa, la cual cosa implica que la inactivación de uno u otro tiene consecuencias funcionales distintas.

Recientemente se ha descrito la hipermetilación del promotor de p14^{ARF} en líneas celulares de CRC y ello estaría asociado con la inhibición de la expresión de p14^{ARF}¹⁷⁷.

1.5.3. Metilación en hMLH1.

El loci hMLH1 se encuentra en el cromosoma 3p21.3, contiene 19 exones y codifica una proteína de 756 aminoácidos. Como ya se ha comentado anteriormente se han descrito un gran número de mutaciones en este gen, en el 60-70% de los casos de HNPCC^{178, 179}. Estas deficiencias, como también se ha comentado, favorecen la aparición del fenotipo MSI que caracteriza estos tumores. Sin embargo, la frecuencia de las más de 200 mutaciones descritas en el gen hMLH1 en cánceres esporádicos era muy baja, a pesar de presentar el fenotipo MSI. La hipermetilación de las islas CpG del promotor del gen, se demostró como la principal causa de la inactivación de hMLH1 en el cáncer esporádico, relacionándose con, aproximadamente, el 70 % de cánceres MSI^{77, 78}. Las características de este tipo de tumor ya han sido comentadas en apartados anteriores.

1.6. Quimioterapia Epigenética.

1.6.1. Inhibidores de la Metilación.

Se han desarrollado diversas moléculas de deoxicitidina, cada una con modificaciones en la posición 5 del anillo pirimidínico. Esta característica distintiva es responsable de la inhibición de las DNA Metil Transferasas (DNMTs). Análogos como el ara-C y la gemcitabina, que no poseen estos cambios en el anillo pirimidínico, no son capaces de inhibir la metilación¹⁸⁰. Clínicamente se están utilizando cuatro compuestos; 5-azacitidina (azacitidine), 5-aza-2-deoxicitidina (decitabine), 1-b-D-arabinofuranosyl-5-azacitidina (fazarabine) y dihidro-5-azacitidina (DHAC). Estos agentes no son nuevos: azacitidine y decitabine fueron sintetizados en 1964 por Sörm^{181, 182}. Estos

agentes han sido empleados en numerosos ensayos clínicos como queda expuesto en la **Tabla 5**.

Estos fármacos actúan evitando la metilación, pero también pueden actuar a través de otros mecanismos. Después de ser fosforilados, son incorporados al DNA y al RNA¹⁸³. Por ejemplo, decitabina, es incorporado al DNA, mientras que azacitidina lo es preferentemente al RNA¹⁸⁰. Una vez incorporados al DNA, se unen covalentemente a DNMT pudiendo inducir la muerte celular por obstrucción de la síntesis de DNA¹⁸⁴. Esto también podría lesionar la célula por alteración estructural en el sitio de incorporación^{185, 186}. DNMT se encuentra deplecionada al estar unida a estos compuestos, de modo que no es apta para la metilación, resultando en una desmetilación significativa, después de repetidas rondas de replicación¹⁸⁰. La desmetilación por decitabina se ha visto que permite la reexpresión de genes silenciados¹⁸⁷ y la diferenciación celular¹⁸⁸. Además la incorporación de estos agentes al RNA provoca el desamblamiento de los ribosomas, defectos en la función del tRNA e inhibición de la producción de proteínas¹⁸⁰. Azacitidina exhibe una elevada citotoxicidad durante la fase S del ciclo celular, reforzando la importancia de sus efectos sobre el DNA¹⁸⁹. Estos fármacos son inactivados por desaminación a través de la citidina deaminasa¹⁸¹.

Un mecanismo alternativo para la inhibición de las DNMTs es el uso de oligodeoxinucleótidos (ODNs) "antisense". Se trata de fragmentos pequeños de ácido nucleico sintetizados in vitro y diseñados para hibridar específicamente con secuencias de mRNA. La hibridación puede bloquear la traducción y provocar la degradación del mRNA¹⁹⁰. Estos ODNs antisense han sido dirigidos contra el mRNA de DNMT en ratón, causando una disminución de los niveles

de mRNA y proteína de DNMT, desmetilación¹⁹¹, normalización de la expresión génica y finalmente reducción del tamaño del tumor¹⁹².

Acerca de la interferencia potencial con la actividad de las células normales, hay razones básicamente teóricas para pensar que su efecto es mucho menor en estas células que en células tumorales. Por un lado, en células normales, la mayor parte de islas CpG parecen estar desmetiladas y la desmetilación de genes "imprinting" parece ser mucho más importante en la embriogénesis que en tejido adulto¹⁹³. En lo que refiere a la reactivación del cromosoma X silenciado en mujeres, en estudios con cultivos de fibroblastos, estos no parecían ser afectados a concentraciones en las que las células neoplásicas si respondían¹⁸⁷.

Sin embargo existen evidencias de que la demetilación puede ser perjudicial en algunos casos. Por ejemplo, en líneas celulares de leucemia, la hipometilación del gen de la resistencia a fármacos (MDR1) se relaciona con su resistencia al tratamiento y decitabina podría aumentar la expresión de MDR1 y de su producto la glicoproteína-P¹⁹³. En ratones, dietas deficientes en colina y metionina, ambas necesarias para la síntesis de S-adenosil-metionina, se han asociado con la hipometilación del oncogen H-Ras y con el desarrollo de carcinoma hepático¹⁹⁴. Estos aspectos pueden ser poco relevantes en el tratamiento de cánceres avanzados, pero podrían tener implicaciones en terapias a largo plazo.

Tabla 5. Ensayos Clínicos Fase II con inhibidores de las DNMTs en tumores sólidos y linfomas¹⁹³.

Agente, dosis y posología	Tejido	n
Azacitidine		
500-750mg/m ² /día 5 o 10 días cada 5 semanas	Gastrointestinal	29
60 mg/m ² 1-10 días, entonces 100mg/m ² dos veces por semana	Mama	27
1,6mg/kg/d 1-10 días, entonces 2,4mg/kg dos veces por semana	Mama	29
	Pulmón	24
	Colorectal	26
	Melanoma	12
	Enf. Hodgkin	6
	NHL	8
150-225mg/m ² /día 1-5 días durante 3 o 4 semanas	NSC pulmón	38
	Testicular	4
	Otros	125
	Osteosarcoma	8
150mg/m ² dos veces por semana durante 6 semanas	NSC pulmón	26
	Riñón	10
	Otros	55
150mg/m ² /d 1-5 días, cada 3 semanas CIVI	Testicular	16
DHAC		
5g/m ² CIVI día cada 28 días	NSC pulmón	17
	Mesotelioma	15
	Melanoma	40
1,5g/m ² /día CIVI 1-5 días durante 21 días	Mesotelioma	41
Fazarabine		
30-45mg/m ² /día 1-5 días	Gliomas	27
	Cuello	18
	Cerviz	19
	Ovario	19
1.75-2mg/m ² /h CIVI durant3 3 días cada 3-4 semanas	NSC pulmón	23
	Mama	14
	Colon	18
	Colorectal	15
	Páncreas	14
Decitabine		
75mg/m ² cada 7-8 h tres veces durante 7-8 semanas	Colon	42
	Cuello	27
	Melanoma	18
	Riñón	14
	Testículo	14
	Próstata	14
	Ovario	24
	Cervix	15

1.6.2. Inhibidores de la modificación de las histonas.

Diversos compuestos, con estructuras variadas, pueden unirse a las Histonas Deacetilasas (HDACs), provocando la acetilación de las histonas (**Tabla 6**).

Estos compuestos inhiben a HDAC por unión al centro catalítico de estos

enzimas, evitando así el acceso al sustrato¹⁹⁵. Los inhibidores de las HDAC,

en su mayoría son capaces de inducir el paro del ciclo celular, la diferenciación

y la apoptosis in vitro, presentando una potente actividad antitumoral in vivo^{196, 197}.

Ácidos grasos de cadena corta, como fenilbutirato y fenilacetato y el ácido valpróico (fármaco antiepiléptico), inhiben la actividad de HDAC y afectan a la expresión de numerosos genes con diversas funciones celulares^{197, 198}. Estos agentes han sido ensayados en la práctica clínica, pero el tiempo de semi-vida en plasma es bajo y las concentraciones para ejercer su acción son relativamente altas (milimolar). Ácidos "hidroxámicos" como TSA, SAHA, CBHA y oxamflatin podrían ser utilizados a concentraciones de micromolar o nanomolar siendo su tiempo de semi-vida más largo y su biodisponibilidad mayor que los ácidos grasos de cadena corta. Metabolitos de hongos, como la trapoxina A, apicidin, y depsipeptido (FR901228), son tripéptidos con potente actividad inhibitoria de HDAC. Además trapoxin puede unirse irreversiblemente al dominio catalítico de HDAC^{197, 198}. Se han desarrollado compuestos sintéticos, los ácidos hidroxámicos cíclicos que contienen péptidos (CHAP), híbridos entre tripéptidos y ácidos hidroxámicos. En el análisis de la función estructural de diversos compuestos derivados de CHAP, estos han sido identificados como compuestos que pueden inducir la expresión génica a concentraciones nanomolares, de forma reversible^{199, 200}. Resulta interesante, que a diferencia de otros inhibidores de HDAC, los CHAPs parecen tener especificidad de sustrato, de las seis isoformas descritas de HDAC muestran una preferencia por HDAC1 y por HDAC4 respecto HDAC6. También depudecin (un epóxido natural) y MS-27-275 (una benzamida) funcionan a concentración micromolar (**Tabla 6**).

Tabla 6. Inhibidores de las HDAC en ensayos clínicos.(Información detallada sobre estos ensayos clínicos puede obtenerse a través de la web; http://www.cancer.gov/cancer_information/)

Inhibidor HDAC	Clase estructural	Rango []	Fase	Enfermedad
Fenilbutirato + <i>Ácido retinoico</i>	SCFA	nM	I	Leucemias
Arginina Butirato + <i>Ganciclovir</i>	SCFA	nM	I	Tumores inducidos por EBV
Fenilbutirato + <i>Azacitidina</i>	SCFA	nM	I	Tumores sólidos refractarios
			I	Leucemias
Fenilbutirato + <i>fluoracilo</i> + <i>indometacina</i>	SCFA	nM	I/II	Adenocarcinoma Colorectal
Fenilbutirato + <i>Azacitidina</i>	SCFA	nM	II	Carcinoma de próstata, leucemias
Fenilbutirato	SCFA	nM	I/II	Glioma Maligno
Fenilbutirato + <i>dexametasona</i> + <i>GM-CSF</i>	SCFA	nM	II	Leucemia Mieloide Aguda
Depsipeptido	Tetrapéptido	μM	I	Leucemias
			II	Carcinoma de pulmón
			II	Linfomas
SAHA (Suberoylaminide hidroxaminc acid)	Ácido hidroxamínico	μM	I	Tumores primarios o metastásicos
MS-27-275	Benzamida	μM	I	Tumores sólidos avanzados o linfomas
			I	Leucemias

A pesar de que la desacetilación de las histonas tiene un papel fundamental en la regulación de la expresión génica, los inhibidores de HDAC parecen afectar directamente la transcripción de un número relativamente pequeño de genes. Estudios recientes mediante técnicas de “differential display” estiman que únicamente el 2% de los genes se ven afectados, mientras que estudios con microarrays elevan este valor al 10%. Como se observa en la tabla, diversos inhibidores de HDAC afectan a un subgrupo de genes, demostrando que ciertos loci son más susceptibles que otros a estos compuestos. Los genes investigados, aquellos afectados por los inhibidores de HDAC, son aquellos que participan en la regulación del ciclo celular y en la supervivencia, lo que explicaría las propiedades anticancerígenas de estos fármacos. El porqué únicamente se activan un subgrupo de genes puede ser debido a la existencia de otras modificaciones covalentes de las histonas que también afectan a la expresión génica²⁰¹. Particularmente hay que destacar la metilación de las

histonas, que se produce después de la deacetilación y que también induce el silenciamiento génico²⁰¹.

Como hemos visto, en muchas ocasiones la inhibición de las HDAC no es un mecanismo suficiente para reactivar genes silenciados por mecanismos epigenéticos; entonces se requieren la acción sinérgica de los agentes demetilantes, como los inhibidores de las DNA metiltransferasas.

Experimentalmente se ha probado un efecto sinérgico, utilizando 5-azadC y TSA²⁰². TSA no afecta la transcripción de genes metilados, mientras que 5-azadC rápidamente induce la transcripción. Sin embargo, la combinación de los dos compuestos provoca una mayor inducción de la expresión génica, demostrándose la sinergia entre ambos²⁰².

1.7. Dieta y Cáncer Colorectal.

Armstrong and Doll²⁰³ desarrollaron un estudio epidemiológico que incluía 23 países, para relacionar los factores dietéticos con la incidencia y mortalidad del cáncer en distintos lugares. En general, la grasa fue el componente dietético de mayor correlación con el riesgo de cáncer de colon, recto, mama, ovario y próstata. Los autores presentaron esta correlación con cautela, determinando que “deben de ser tenidas en cuenta como sugerencias para posteriores investigaciones y no como evidencias de causalidad o como bases de una acción preventiva”. Unos años más tarde Doll y Peto²⁰⁴ discutieron los factores evitables de riesgo de cáncer en USA. En una tabla listaron decenas de posibles factores. La dieta se estimó como la principal responsable en la mayoría de neoplasias.

Des de entonces, se han identificado una gran variedad de factores que afectan el curso de la carcinogénesis. Muchos de los estudios tienen una tendencia reduccionista, analizando el papel de un factor, de forma individual. Pero en la dieta encontramos muchos componentes que interactúan entre ellos y aun debe ser elucidado el papel de dicha interacción. El mayor esfuerzo epidemiológico se ha desarrollado entorno a la dieta y cáncer de colon.

Tabla 7. Efecto de distintos factores de riesgo en las distintas etapas de la secuencia adenoma carcinoma.

Factor de riesgo	Formación Adenoma	Crecimiento Adenoma	Transformación Carcinoma
Tabaco	↑	0	0
Alcohol	±	↑	0
Actividad Física	±	±	↓
Elevada ingesta de energía	±	±	↑
Elevado Índice de Masa Corporal	±	↑	↑

El cáncer progresa a través de diversas etapas, y resulta razonable pensar que los distintos componentes dietéticos no ejercen el mismo efecto a través del desarrollo carcinogénico. Boutron et al²⁰⁶ estudiaron el efecto de diversos factores en el riesgo de la transición de adenoma a carcinoma (**Tabla 7**). El tabaco induce la formación del adenoma, pero en cambio no modifica el crecimiento del adenoma ni del carcinoma. El alcohol, por otro lado, tiene un efecto moderado en la formación del adenoma, pero incide en su crecimiento. Los efectos del tabaco inciden principalmente en el colon proximal, mientras que el alcohol lo hace principalmente en el recto (**Tabla 8**)²⁰⁷. Respecto al papel protector de la fibra en el cáncer de colon no hay unanimidad, ya que muchos estudios describen un papel protector, mientras que muchos otros no observan ningún efecto^{210, 211}. Un estudio epidemiológico

reciente, analizando la asociación entre consumo de fibra y incidencia de CRC en 591.978 europeos, concluyó que un incremento en el consumo de fibra en individuos que presentaban niveles bajos, podía significar una disminución del 40% del riesgo de incidencia de CRC²⁰⁵. Giovanucci et al²⁰⁸ encontró que la fibra presente en la dieta reducía el riesgo de formación de adenomas, pero más tarde presentó resultados donde no se halló efecto sobre el riesgo de CRC²⁰⁹. Esto podría ser debido a que la fibra protege de la formación del adenoma, pero otros factores resultan más importantes en la progresión a carcinoma y la fibra no parece afectarles.

Tabla 8. Epidemiología del cáncer colorectal en función de la localización.

Agente	Localización		
	Colon Proximal	Colon Distal	Recto
Tabaco	+	-	-
Alcohol	-	+	++
Factores Familiares	+	-	-
Variación geográfica	+	+++	+

Otros factores que parecen prevenir el desarrollo del cáncer son los antioxidantes como el tocoferol y el β -caroteno que parece ser que podrían ofrecer las mejores opciones de inhibición del crecimiento tumoral. Estudios clínicos que intentaban relacionar el efecto de tocoferol, caroteno y vitamina A en cáncer de pulmón^{212, 213} no han conseguido demostrar estos efectos. Debido a que se han identificado diversos factores que influyen en distintos estadios de la progresión cancerígena, los estudios de intervención dietética deberían llevarse a cabo en las distintas etapas de la misma.

El bajo consumo de fruta y vegetales ha sido consistentemente relacionado con un incremento en la incidencia del cáncer. Muchos componentes de frutas y verduras pueden ser responsables de esta reducción del riesgo de cáncer, entre ellos la fibra y los antioxidantes ya comentados, así como los folatos. A un nivel muy simple, se puede considerar que el cáncer se produce por un exceso de alteraciones en el DNA y la expresión inapropiada de genes críticos. Consecuentemente y concretamente, los folatos son de particular interés como agente protector debido a su papel en la síntesis de nucleótidos, así como en la metilación de moléculas como el DNA, RNA, proteínas y fosfolípidos. Estudios epidemiológicos han observado que una disminución del consumo de folatos está asociada con un mayor riesgo de cáncer de cérvix, colorectal, pulmón, esófago, cerebro, páncreas y mama²¹⁴.

1.7.1. Efecto de los Nutrientes en la Integridad del Genoma y la Metilación del DNA.

La reducción en la ingesta o los niveles bajos de diversos nutrientes en tejidos, o en plasma, ha sido asociada con un mayor riesgo de desarrollo de tumores. Muchos micronutrientes y vitaminas son indispensables en las vías metabólicas del DNA^{215, 216}.

A pesar de que se han realizado numerosos estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, no existen evidencias claras para definir unos rangos dietéticos que garanticen la protección del DNA. Existen evidencias que relacionan diversos nutrientes con el mantenimiento de la estabilidad genómica. Por ejemplo, la deficiencia de vitaminas C y E se sabe que favorece la oxidación del DNA y

que puede causar alteraciones cromosómicas^{217, 218}. La vitamina D también ejerce funciones antioxidantes, estabilizando la estructura de los cromosomas y previniendo las roturas en las cadenas de DNA²¹⁹. El magnesio es un cofactor esencial en el metabolismo del DNA y juega un papel fundamental en el mantenimiento de la alta fidelidad en la transcripción del DNA²²⁰. Otros estudios señalan que el hierro puede causar roturas en el DNA²²¹ y que una dieta rica en b-caroteno reduce las alteraciones en el DNA²²². También la deficiencia de vitamina B12 está asociada con la formación de micronúcleos²²³.

También se han descrito asociaciones entre nutrientes y metilación del DNA, especialmente metilación global del genoma. La deficiencia de Zinc puede reducir la utilización de los grupos metilos provenientes de SAM en hígado de rata resultando en una hipometilación global del genoma y una hipometilación de las histonas^{224, 225}. Deficiencias dietéticas en selenio disminuyen la metilación del DNA en células Caco-2 así como en hígado de rata y colon^{226, 227}. La deficiencia en vitamina C se ha asociado con la hipermetilación en células de cáncer de pulmón^{228, 229}. Resulta interesante que la niacina, precursor del NAD+, es necesaria para mantener el estado de desmetilación de las islas CpG por inhibición enzimática de la metilación del DNA^{230, 231}, ya que es necesaria para la síntesis de poly-ADP-ribosa polimerasa I, que convierte la H1 a formas poly-ADP-ribosiladas, que son la forma responsable de la inhibición de la metilación del DNA^{229, 230}.

Sin embargo, los folatos y otros donadores de metilos de la dieta aportan los datos más claros respecto a la interacción entre nutrientes y metilación del DNA, ya que estos componentes dietéticos están involucrados directamente en el metabolismo de los ácidos nucleicos. La función metabólica de todas las

formas coenzimáticas de folatos es la transferencia de unidades de un carbono. Esta función está centrada en la síntesis de SAM, donador de metilos universal en multitud de reacciones biológicas de metilación, y la síntesis de dinucleótidos trifosfato.

1.8. Folatos y Cáncer Colorectal

Los folatos se han revelado recientemente como un factor nutricional importante, con un papel relevante en la patogénesis de distintas enfermedades como la anemia macrocítica, enfermedades cardiovasculares, procesos trombóticos, defectos en el tubo neural o otros defectos congénitos, efectos adversos en el embarazo y desordenes neuropsiquiátricos²³¹⁻²³⁵. La importancia de los folatos en la nutrición y salud se ha evidenciado por ejemplo en la protección que ejerce frente a las alteraciones en el tubo neural. La "US Food & Drug Administration" (FDA) impuso en 1998, la fortificación del cereal en grano, crudo o cocinado, con ácido fólico (140µg/100g)²³⁶. Esta suplementación también ha sido implantada en Canadá²³⁷. Por otra parte se han ido acumulando evidencias en las últimas décadas que sugieren que los folatos podrían tener un papel en el desarrollo y la prevención de enfermedades malignas como el cáncer colorectal, de pulmón, páncreas, esófago, estómago, cervical, mama, neuroblastoma y leucemia^{224, 238}. Estos estudios muestran una relación inversa (en algunos casos dependiente de la dosis) entre niveles de folatos (valorados en dieta o como niveles plasmáticos) y el riesgo de estas patologías^{224, 238}.

1.8.1. Los Folatos en el Metabolismo Celular; Síntesis de Nucleótidos y metilación.

El ácido fólico es una vitamina esencial, asociada con dos procesos clave en el metabolismo de los ácidos nucleicos (**Figura 10**), (1) la síntesis de purinas y pirimidinas para la síntesis de DNA y RNA, y (2) la formación de S-adenosilmetionina (SAM), donador de metilos universal, esencial para la metilación del DNA.

Los folatos se encuentran en nuestra dieta de forma natural como poliglutamatos. La principal fuente de folatos en la dieta son las verduras verdes y el hígado²³⁹. Durante el proceso de cocción, digestión intestinal y absorción, los folatos poliglutamatos se rompen en monoglutamatos por conjugación enzimática con enzimas presentes en la superficie de las vellosidades de los enterocitos²⁴⁰. Los monoglutamatos son transportados a través de los enterocitos a la circulación sanguínea en la forma reducida y metilada de folatos, 5-Metil-tetrahidrofolato (5-metil-THF), que se une a una gran variedad de proteínas de unión a folatos. La entrada de 5-Metil-THF en las células es mediada por un receptor de membrana específico^{241, 242}. Una vez en la célula es demetilado por la metionina sintasa para producir tetrahidrofolato (THF). THF se convierte en la forma pentaglutamato THFGlu₅, por una enzima ligasa. Si la demetilación no se produce, se acumula 5-Metil-THF, que es un substrato pobre para la ligasa, por lo tanto la síntesis de THFGlu₅ es necesaria para estabilizar la presencia de folatos en la célula. Por lo tanto, la metionina sintasa, dependiente de cobalamina es esencial para el proceso y eso explica porque los niveles intracelulares de folato, medido como niveles en células rojas, se encuentran disminuidos en estados de deficiencia de cobalamina.

Una vez formado el THFGlu₅ está preparado para recibir las estructuras C1, las llamadas “pool de un carbono”, y que consisten en metil (-CH₃), metenil (-CH=) y formil (-CHO). Cuando se añaden a THFGlu₅ forman 5-MetilTHF, 5-10-MetilenTHF y 10-FormilTHF respectivamente (**Figura 10**).

Así pues, THFGlu₅ es el receptor universal de las estructuras C1, mientras que los compuestos que los recibirán son los donadores para la síntesis de purinas y pirimidinas o para remetilar la homocisteína y formar metionina y SAM, que mantiene las reacciones de metilación del metabolismo interno, por lo cual, todas estas reacciones son llamadas “reacciones de transferencia de un carbono”²⁴³.

5-metilTHF, 5-10-metilenTHF y 10-formilTHF están en equilibrio intercambiable según sea el requerimiento del organismo. La mayoría de estructuras C1 derivan de la serina, que produce glicina y 5-10-metilenTHF, o formato, que produce 10-formilTHF (**Figura 10**).

El grupo CHO de las formas 10-formilTHF forma el anillo purínico por donación de los carbonos 2 y 8 para guanina y adenosina. La síntesis de las pirimidinas utiliza el grupo metilen (-CH₂-) del 5-10-metilenTHF que se transfiere a uridilato para formar timidilato por acción de la timidilato sintasa, diana del fármaco antineoplásico 5-fluoracilo. El producto intermedio en la síntesis de purinas es THF, mientras que en las pirimidinas es dihidrofolato (DHF), que es más inestable y con mayor tendencia al catabolismo (**Figura 10**). El enzima que media la reducción de DHF a THF, dihidrofolato reductasa, es la diana principal de fármaco metotrexato.

5-10-metilenTHF se sitúa en el cruce entre las vías de síntesis del DNA y el ciclo de metilación. El proceso está controlado por el enzima MTHFR, la

función del cual es reducir 5-10-metilenTHF a 5-metilTHF, que a su vez remetila la homocisteína vía metionina sintasa para producir metionina y THF. SAM es un derivado de la metionina altamente energético que actúa como cofactor de múltiples metiltransferasas. S-adenosin-homocisteína (SAH), el producto de las reacciones de metilación, es el principal inhibidor de las reacciones de metilación mediadas por SAM. SAH, es a su vez hidrolizada para formar homocisteína y adenosina por la SAH hidrolasa. Homocisteína puede ser entonces remetilada hacia metionina, o catabolizada vía transulfuración a cistationa y cisteína. En el hígado, la homocisteína también puede ser remetilada a metionina por la betaina metiltransferasa, independiente de cobalamina. Si la homocisteína es remetilada o catabolizada está en función de los niveles celulares de homocisteína y metionina. Cuando estos son altos, como ocurre después de una comida con alto contenido de proteínas, la vía catabólica (con mayor K_m) está activa, mientras que con niveles intracelulares bajos, la reacción de remetilación, con menor K_m , es dominante.

SAM se encuentra bajo un estricto control en la célula. Cuando los niveles de SAM son elevados la SAM sintasa se inhibe. 5-metilTHF disminuye la actividad de la glicinametiltransferasa, que utiliza los grupos metilo de SAM para formar sarcosina, un desecho metabólico²⁴⁴. MTHFR se inhibe alostericamente por SAM²⁴⁵ y la actividad de la cistationa sintasa se encuentra incrementada, activando el catabolismo de la homocisteína²⁴⁶. Estos eventos tienen el efecto de reducir el aporte de estructuras C1 para la síntesis de SAM e incrementar el catabolismo de los esqueletos sulfurados de SAM. Alternativamente, cuando los niveles de SAM son bajos, la cistationa sintasa no se activa, metionina sintasa funciona normalmente y MTHFR no se encuentra inhibida. A no ser que

los niveles de 5-metilTHF estén anormalmente incrementados, la glicina metiltransferasa no se inhibe. Todos estos factores se combinan para aumentar la producción de 5-metilTHF, reducir el catabolismo de los esqueletos sulfurados y activar la producción de SAM.

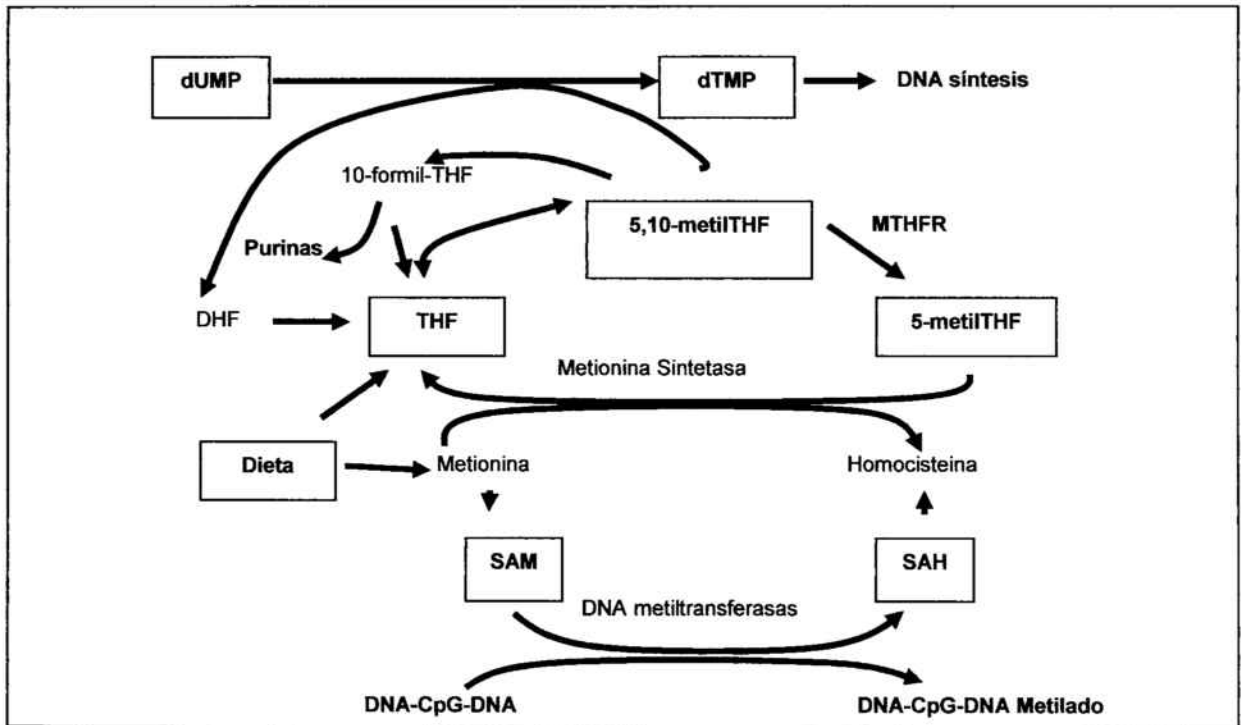


Figura 10. Metabolismo del folato, importancia en la síntesis de ácidos nucleicos y en la metilación del DNA

1.8.2. Evidencias del Papel de los Folatos en la Carcinogénesis Colorectal

1.8.2.1. Evidencias epidemiológicas.

El papel de los folatos en la carcinogénesis ha sido estudiado principalmente en el cáncer colorectal^{224, 247, 248}. Entre las 15 revisiones publicadas sobre estudios epidemiológicos retrospectivos que investigan la relación entre folatos (ingesta dietética o niveles en sangre) con el riesgo de cáncer colorectal o su precursor el adenoma, la mayoría muestran una relación inversa, positiva o equívoca, que no es estadísticamente significativa, o que no lo es después de ajustar, o que no puede distinguirse de otros factores en su relación con el riesgo^{224, 247, 248}. Algunos de estos estudios demuestran una asociación específica de localización y sexo, dependiente de la dosis^{224, 247, 248}. La relación entre niveles de folatos en sangre y riesgo de adenoma, está menos definida que el riesgo de cáncer colorectal y los niveles de ingesta en dieta^{224, 247, 248}. Colectivamente estos estudios retrospectivos sugieren una reducción del 40% en el riesgo de neoplasia colorectal en sujetos con los mayores niveles de ingesta de folatos, respecto aquellos con los niveles más bajos^{224, 247, 248}. Estos estudios sugieren que una modesta reducción en los niveles de folatos, sin una evidencia clínica de deficiencia, es suficiente para favorecer la aparición del cáncer colorectal^{224, 247, 248}. Recientemente, un meta-análisis de 11 estudios epidemiológicos prospectivos de US, Canadá, Holanda y Suecia, incluyendo 500,000 hombres y mujeres demostró una asociación inversa y estadísticamente significativa entre ingesta de folatos (dieta y suplementos) y el riesgo de CRC²⁴⁹. Este meta-análisis también demostró una reducción del 20 % en el riesgo de CRC en individuos con mayores niveles de ingesta de folatos, respecto aquellos con las menores dosis.

En algunos estudios epidemiológicos esta asociación inversa entre niveles de folatos y riesgo de cáncer colorectal aparece modulada por la ingesta de alcohol, un antagonista del folato²⁵⁰ y otros donadores de grupos metilo (p.e. metionina, vit.B-6 y B-12) que están implicados en el metabolismo de los folatos^{224, 247, 248}.

En resumen, los estudios epidemiológicos sugieren que la deficiencia de folatos incrementa, mientras que la suplementación disminuye, el riesgo de cáncer colorectal. El conjunto de evidencias por tanto soportan esta relación inversa, aunque no pueden establecer una relación causal definitiva entre folatos y riesgo de CRC.

1.8.2.2. Estudios de intervención con folatos en humanos.

En teoría, los estudios aleatorios de intervención con folatos en humanos deberían proveer el soporte definitivo para establecer la relación causal entre folatos y riesgo de CRC. Hasta el momento no existen evidencias concluyentes en este tipo de estudios que corroboren el efecto protector de la suplementación con folatos en el cáncer colorectal (**Tabla 9**).

Tabla 9. Resumen de distintos estudios de intervención con folatos en humanos

Autor	País	Pacientes	Folatos	Tiempo	Resultados
Cravo et al ²⁵⁰	Potugal	22, adenoma seccionado	10 mg/día	6 meses	Reversión de la hipometilación gnómica en la mucosa rectal normal.
Cravo et al ²⁵¹	Potugal	20, adenoma seccionado	5 mg/día	3 meses	Reversión de la hipometilación gnómica en la mucosa rectal normal.
Paspatis et al ²⁵²	Grecia	60, adenoma post polipectomía	1 mg/día	12 meses	Disminución de la recurrencia en un 46% respecto al placebo (n.s.).
Kim et al ²⁵³	USA	20, adenoma seccionado	5 mg/día	12 meses	Disminución de las hipometilación genómica y de las roturas en los exones 5-8 de p53.
Khosraviani et al ²⁵⁴	Gran Bretaña	11, adenoma seccionado	2 mg/día	3 meses	Disminución de la proliferación celular en la mucosa rectal.
Cravo et al ²⁵⁵	Potugal	Colitis Ulcerosa	5 mg/día	6 meses	No hay reversión de la hipometilación genómica.
Boland et al ²⁵⁶ , Brentnall et al ²⁵⁷ , Cravo et al ²⁵⁸	Varios	CRC esporádico, hereditario y colitis	5 mg/día	6 meses	Corrección parcial de la inestabilidad en microsatélites causada por hipermetilación de hMLH1

En la mayoría de estos trabajos, el tamaño de la muestra es muy pequeño, la duración es relativamente corta, y muchos utilizan biomarcadores o SEPBS (Surrogate End Point Biomarker)²⁵⁹ que no están bien definidos (hipometilación genómica, proliferación de la mucosa rectal, ...). Por lo tanto es difícil extraer conclusiones definitivas de estos trabajos. Existen estudios más extensos, aleatorios, doble ciego y multicéntricos placebo-control sobre la quimioprevención por suplementación con folatos en los US (National Cancer Institute communications 2003), que deben ser interpretados con cautela por las importantes limitaciones que presentan (**Tabla 10**).

Tabla 10. Principales Limitaciones de los Estudios de Intervención con Folatos en Humanos.

- Actúan sobre vías biológicas complejas en poblaciones especiales de adultos con alto riesgo de desarrollar cáncer (p.e. individuos con adenomas seccionados),
- El tiempo que transcurre desde que se realiza la intervención hasta que se observa la incidencia del efecto podrían ser insuficientes (entre 3-5 años),
- Los pacientes que aceptan entrar en estos estudios tienden a estar altamente motivados, conscientes de la importancia de la salud, seleccionados en base a la dieta y por tanto susceptibles de no ser representativos de la población.
- En lugar de utilizar la ocurrencia o recurrencia del cáncer estos estudios utilizan biomarcadores o SEPBS, muchos de los cuales no han sido validados para ensayos clínicos, no están claramente ligados a la incidencia o la mortalidad y por tanto tienen un valor relativo.

1.8.3. Mecanismos Carcinogénicos de la Deficiencia de Folatos

1.8.3.1. Alteración del Pool de Nucleótidos.

Wickranasibgeh and Fida²⁶⁰ demostraron que el crecimiento de líneas celulares mieloides en medios deficientes en folatos incrementaba la incorporación errónea de uracilos en el DNA. James et al²⁶¹ también demostraron alteraciones en el equilibrio del pool de deoxynucleótidos en células de ovario de hámster chino con deficiencia de folatos. A partir del metabolismo de los folatos (**Figura 10**), puede observarse como su deficiencia puede causar una alteración en la conversión de dUMP a dTMP debido a una falta de 5-10metilenTHF, en lo que se conoce como “dTMP stress”, y que conlleva un incremento en la relación dUMP/dTMP. Un incremento crónico de la relación dUMP/dTMP tiene diversos efectos potenciales. Por un lado puede conllevar una incorporación errónea de uracilos en el DNA, lo que podría llevar a ciclos fútiles de escisión y reiterada incorporación errónea de uracilos²⁶². El uracilo se escinde del DNA por Uracil-DNA glicosilasas específicas, provocando la formación de sitios apirimidinicos en el DNA, así como roturas en la cadena de DNA, ambos procesos promutagénicos. Además, como se comenta más tarde, los estados de deficiencia en folatos provocan la

progresiva acumulación de residuos de citosina no metiladas, que pueden ser desaminadas a uracilos, forzando el sistema de reparación de uracilos mal incorporados.

Se han desarrollado diversos modelos animales y estudios en humanos para investigar el efecto de la deficiencia en folatos en la incorporación de uracilos en el DNA y la mayoría de ellos confirman que la incorporación errónea de uracilos en el DNA y la alteración del equilibrio en el pool de dioxinucleótidos, son efectos derivados de la deficiencia de folatos. Son fenómenos que ocurren tanto in vivo como in vitro y dan como resultado final una alteración de los sistemas de reparación, la cual cosa conlleva la adquisición de mutaciones y la predisposición a la rotura en las cadenas de DNA. Estas alteraciones pueden afectar tanto a genes supresores de tumores como oncogenes críticos para el desarrollo de la neoplasia²⁶¹.

1.8.3.2. Alteración de la metilación del DNA y la proliferación celular.

La hipometilación global del genoma, como se comentó anteriormente, es un fenómeno epigenético que se da en los estadios iniciales de la carcinogénesis colorectal²⁶². Esta hipometilación global del DNA es potencialmente carcinogénica por distintos mecanismos. Por un lado la hipometilación global del DNA puede facilitar un incremento generalizado de la expresión génica, que afectaría a varios oncogenes, lo que podría conllevar un incremento de la proliferación celular. Se han descrito en cáncer de colon la hipometilación de diversos genes, incluidos los oncogenes ras y c-myc^{263, 264}. Por otro lado la hipometilación global del genoma predispone a la formación de roturas en las cadenas de DNA, la cual cosa puede causar la adquisición de mutaciones o

contribuir a los errores de alineamiento cromosómico durante la mitosis. La suplementación con folatos incrementó la metilación del DNA en epitelio colorectal de pacientes con historial de adenomas colorectales²⁵⁰. Kim et al demostraron que la hipometilación y la deficiencia en folatos inducía la rotura de las cadenas de DNA, afectando a genes como p53 o APC en epitelio colónico en un modelo de rata con carcinogénesis colorectal^{263, 265, 266}.

Estas observaciones suponen una relación directa entre la deficiencia en folatos, la hipometilación del gen de p53, las roturas en las cadenas de DNA y las mutaciones en exones del gen de p53, así como una reducción de la expresión del mRNA de p53, todo ello eventos potencialmente carcinogénicos. Las mutaciones de p53 en cáncer están relacionadas con un incremento de la expresión de la proteína, causado por la estabilización post-transcripcional de la proteína mutada²⁶⁷.

Otro mecanismo a través del cual la hipometilación global del DNA puede contribuir al proceso carcinogénico es la alteración de la conformación de la cromatina^{121, 268} que puede producir inestabilidad cromosómica, que durante la mitosis puede suponer la pérdida o ganancia de cromosomas, característica de muchos tipos de cáncer, incluido el colorectal.

Finalmente la hipermetilación locus específica, asociada a los procesos carcinogénicos, como se comenta extensamente con anterioridad, no ha sido relacionada hasta el momento con el consumo de folatos.

1.8.4. Genotipos Relacionados con el Metabolismo de los Folatos y la Metilación.

MTHFR cataliza la reducción biológica irreversible del 5-10-metileneTHF a 5-metilTHF, el donador de metilos para la síntesis de metionina a partir de homocisteina (**Figura 10**). La mutación, o polimorfismo más común de MTHFR es una sustitución C→T en la posición 677 del gen, que causa un cambio de aminoácido de valina por alanina en el enzima funcional²⁶⁹. Esta sustitución puede ser detectada funcionalmente, ya que reduce la estabilidad del enzima durante la incubación in vitro de las células a 46 °C durante 5 minutos²⁷⁰. Esta es una mutación autosómica recesiva. Los individuos homocigotos para la mutación C677T (individuos TT) muestran menor actividad específica de MTHFR en linfocitos y una menor estabilidad del enzima, por la cual cosa se le conoce como MTHFR termolábil. Estudios en sistemas bacterianos de expresión apuntan que la forma termolábil de MTHFR podría tener menor afinidad para su coenzima FAD²⁷¹. Los individuos homocigotos CC tienen una actividad MTHFR del 100%, los individuos heterocigotos CT aproximadamente el 65%, y los homocigotos TT un 30% de la actividad²⁶⁹.

La frecuencia del polimorfismo C677T MTHFR varía entre distintos grupos raciales y étnicos. Análisis de poblaciones asiáticas y caucásicas muestran frecuencias de ~ 12% de individuos TT, y de un 50% de individuos heterocigotos^{269, 271, 275}. En afro-americanos existe una incidencia muy baja del polimorfismo MTHFR C677T²⁷², mientras que entre caucásicos europeos existe una gran variabilidad^{273, 274}.

1.8.4.1 MTHFR C677T y Cáncer Colorectal

En la **Tabla 11** se muestran estudios recientes sobre la influencia del polimorfismo MTHFR C677T en el riesgo de cáncer colorectal y la formación de adenomas. También se incluye un trabajo de cáncer de endometrio con población española. Como se puede observar en la actualidad, el papel de MTHFR en la modulación del riesgo de CRC es controvertido y los mecanismos patogénicos por los cuales podría asociarse a la carcinogénesis ha dado lugar a distintas hipótesis que comentaremos a continuación.

Tabla 11. Resumen de estudios que investigan el papel del genotipo MTHFR en CRC y otras neoplasias.

Autor	Ref.	País	Diagnóstico	Principales hallazgos
Chen et al ²⁷⁶	367	USA	CRC	Reducción del riesgo de CRC en TTs (OR=0,62), también en TTs con deficiencias de folatos (OR=0,11).
Esteller et al ²⁷⁷	368	España	Cáncer Endometrio	Incremento del riesgo de cáncer de endometrio en portadores del alelo T (CT/TT), OR= 2,8.
Ma et al ²⁷⁸	369	USA	CRC	Reducción del riesgo de CRC en TTs con deficiencia de folatos.
Chen et al ²⁷⁹	370	USA	Adenoma Colorectal	No hay asociación significativa entre el genotipo MTHFR y el riesgo de adenoma, pero existe una tendencia a aumentar el riesgo en TTs.
Slattery et al ²⁸⁰	371	USA	CRC	No hay asociación entre CRC y el genotipo MTHFR.
Ulrich et al ²⁸¹	372	USA	Adenoma Colorectal	Tendencia no significativa a un mayor riesgo de adenoma en TTs con deficiencia de folatos
Ulrich et al ²⁸²	373	USA	Pólipos Hperplásicos	No hay asociación entre CRC y el genotipo MTHFR.
Marugane et al ²⁸³	374	Japón	Adenoma Colorectal	Tendencia a mayor riesgo de adenoma en TTs
Ryan et al ²⁸⁴	375	Irlanda	CRC	Mayor riesgo de CRC en CTs (OR=1.86), pero no en TTs

- **Reducción de la Metilación.** La actividad MTHFR se encuentra disminuida tanto en los individuos TT como en los CT respecto individuos wild-type (wt) CC, lo que resulta en una reducción de la capacidad de metilación celular y un incremento de los niveles de homocisteína^{284, 285}, con una hipometilación global del genoma como posible secuela. La hipometilación general del DNA tiene, como ya se

discutió anteriormente diversos efectos carcinogénicos, lo que podría explicar el incremento del riesgo de adenomas colorectales en individuos homocigotos TT que se ha descrito en distintos estudios^{278, 280, 282}. Cualquier asociación con la deficiencia de folatos debería incrementar el grado de hipometilación en individuos CT y TT. Esto podría explicar los resultados de Ulrich et al¹¹⁹, que describió que los individuos TT con deficiencia de folatos presentaban mayor riesgo de desarrollar adenomas colónicos que individuos homocigotos TT con dietas con niveles de folatos normales. Esta hipótesis sin embargo no explicaría los resultados del grupo de Harvard^{275, 276}, que describe una protección frente el CRC en los individuos TT, pero únicamente en individuos con niveles normales de folatos.

- **Alteración del pool de nucleótidos.** Esta hipótesis fue planteada por el grupo de Harvard^{275, 276} para explicar sus hallazgos. Como ya se comentó anteriormente la deficiencia de folatos puede provocar una alteración del equilibrio dUMP/dTMP, que es un evento carcinogénico bien conocido²⁶¹. Extrapolando estos datos, la actividad MTHFR en individuos TT puede prevenir la depleción de 5,10-metilenTHF, que es el cofactor para la síntesis de nucleótidos. Esto podría llevar a un incremento de los niveles de dTMP libre, previniendo el desarrollo de un desequilibrio dUMP/dTMP, o “estrés dTMP”²⁶¹. Sin embargo este mecanismo serviría para proteger, probablemente, individuos con deficiencia de folatos y no individuos con niveles normales. Sin embargo, estas teorías no son mutuamente excluyentes y el efecto sobre la proliferación celular, podría depender del balance entre ambos

procesos en un individuo, que a su vez dependería del consumo y de los niveles de distintos micronutrientes individualmente (folatos, vitamina B6, vitamina B12, ...). Por lo tanto, a pesar de que el genotipo TT podría tener un efecto deletéreo sobre la capacidad de metilación celular, en individuos con niveles normales de folatos, los homocigotos TT podrían disponer de suficientes niveles de SAM para mantener la metilación del DNA y a su vez incrementar los niveles de 5-10metilenTHF, protegiendo la célula del estrés dTMP. Sin embargo, esta teoría no explica otros resultados como los del grupo de Ryan y Weir²⁸³, que describen una asociación del genotipo CT, pero no de los TT con el CRC, o los resultados similares de Esteller et al²⁷⁶ en cáncer de endometrio.

- **Hipótesis de la Progresión.** En este modelo, la iniciación de la progresión neoplásica por un lado y la supervivencia y progresión por otro, son debidos a distintos procesos. Ser portador del alelo T puede aumentar el riesgo de formación de adenomas por reducción de la capacidad de metilación en las células colónicas epiteliales. La baja actividad MTHFR en individuos TT podría inducir niveles de hipometilación celular incompatibles con la progresión de un clon neoplásico temprano y por lo tanto no se encontrarían sobrerrepresentados en la población de pacientes con cáncer. Por otro lado, la actividad MTHFR en heterocigotos CT podría ser suficiente para mantener la progresión de un clon neoplásico inicial, a carcinoma. Se conoce que las células neoplásicas exhiben auxotrofia de metionina²⁸⁶,²⁸⁷ y por tanto, una neoplasia que se desarrolla en un individuo TT, por dicha deficiencia en metionina debería presentar menor probabilidad de

supervivencia y progresión. Esta hipótesis supondría una mayor frecuencia de homocigotos TT en pacientes con adenomas colónicos en comparación con individuos control normales, pero no con pacientes con CRC. Este razonamiento se ha utilizado en numerosos estudios que investigan el papel de MTHFR en la formación de adenomas colorectales^{278, 281, 282}. Sin embargo estas ideas estarían en contradicción con los estudios del grupo de Harvard que otorgan un papel protector al genotipo TT en condiciones de dieta normal de folatos^{275, 276}. Otros estudios que han investigado LOH en el locus MTHFR en CRC, apoyan esta teoría^{283, 288}. LOH se observó en el 16% y 18% de CRCs respectivamente. En la mayoría de los casos exclusivamente se produjo pérdida del alelo T, quedando un hemicigoto (individuo que ha perdido uno de los dos alelos) C en el tumor, hemicigoto puede tener una actividad MTHFR de tan solo el 50% la actividad normal del genotipo CC. Sin embargo esta actividad sería superior a la de un individuo TT (30%)²⁸⁴ y por tanto podría llegar a mantener los requerimientos metabólicos de la célula. LOH del alelo C ocurre únicamente en el 14% de los casos con LOH, sugiriendo que LOH del alelo C es un evento no viable para el desarrollo del clon en la mayoría de los casos. Extrapolando los resultados de Frosst²⁸⁴, un hemicigoto T podría tener una actividad MTHFR alrededor del 15% la actividad normal, lo cual podría ser incompatible con la supervivencia celular, especialmente en un ambiente de elevada demanda de folatos y metionina, como es el caso del desarrollo de la tumorigénesis.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

Los tumores que presentan alteraciones en los patrones de metilación podrían constituir un subtipo molecular de CRC con entidad etiológica y clínico-patológica propia. Los conocimientos recientes en la biología del CRC han permitido diferenciar distintos subtipos moleculares de CRC, que en los próximos años podrían incorporar nuevos conocimientos en metilación aberrante y las posibles causas ambientales relacionadas.

Además, estas alteraciones epigenéticas que suprimen la expresión génica son potencialmente reversibles, lo que ofrece una oportunidad única para el desarrollo de nuevas terapias; además pueden ser el punto de partida de estrategias preventivas. Sidransky, Baylin, Herman y otros autores, han demostrado recientemente que la metilación de p16^{INK4a} puede ser detectada en suero de pacientes de CRC con tumores metilados, lo que abre posibilidades adicionales para monitorizar las recidivas o incluso el diagnóstico precoz.

Nuestra hipótesis es que la etiología de dichos subtipos moleculares podría estar fundamentada en factores genéticos y/o dietéticos.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo general.

Dada la importancia de los problemas de metilación en la patogenia del CRC y la escasez de datos respecto a sus posibles causas, proponemos un estudio focalizado en factores de riesgo genéticos y metabólico-dietéticos para el CRC que presente alteraciones de metilación.

2.2.2. Objetivos concretos.

1. Estudiar la frecuencia y distribución de la metilación de los genes p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1 en pacientes de CRC; identificación de subtipos moleculares de CRC y su posible relación con características clínicas, patológicas y genéticas.
2. Estudio del polimorfismo C677T MTHFR; distribución según las características clinicopatológicas previstas en el estudio.
3. Estudiar la relación entre el consumo de folatos y otros micronutrientes con la presencia de metilación tumoral en p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1.
4. Estudiar la relación del genotipo MTHFR y la metilación tumoral en p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño del Estudio.

Este trabajo se ha diseñado como un estudio prospectivo, caso-control y doble ciego. Se han utilizado dos poblaciones de base hospitalaria, una de casos y otra de controles que se describen en el siguiente apartado. Dentro del grupo de casos, formado por los pacientes de CRC (grupo CRC), se constituyó un subgrupo a partir del cual se realizó el estudio molecular de metilación (grupo CRC molecular)(Figura 11).

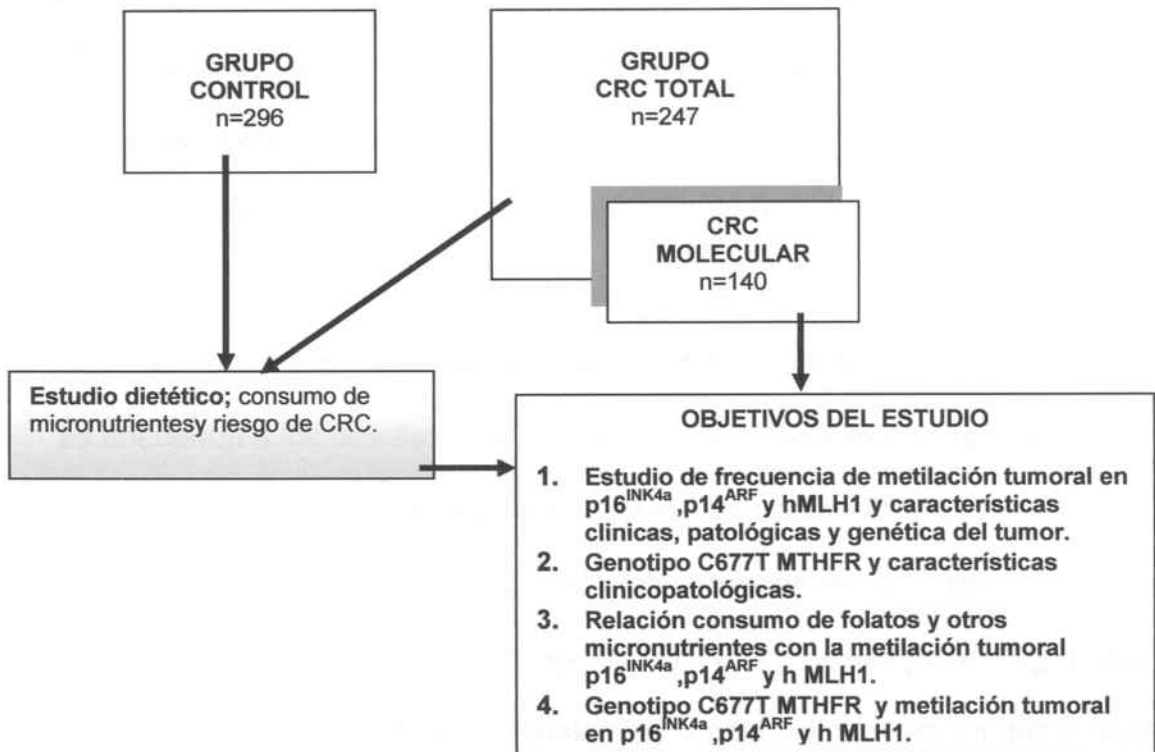


Figura 11. Diseño del Estudio y Poblaciones Estudiadas.

3.2. Población de Pacientes e Información Clinicopatológica

Los pacientes fueron reclutados a través del Hospital Clínico, Universidad de Barcelona. El Hospital Clínico es una institución de 900 camas con alrededor

de 33,000 pacientes admitidos por año y servicios que cubren aproximadamente 600,000 habitantes de Cataluña. Durante el período 1996-1997, se reclutaron 275 pacientes de CRC de forma consecutiva en dos servicios de cirugía del mismo hospital. Se incluyeron aquellos pacientes con más de 35 años y menos de 90 años. Finalmente, dieciocho pacientes no aceptaron participar, quedando un total de 249 sujetos enrolados (132 hombres y 117 mujeres). De ellos, 140 pacientes también aportaron muestras de tejido tumoral para llevar a cabo el estudio molecular (grupo CRC molecular). Los pacientes firmaron el consentimiento informado; todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica. Los tumores primarios fueron diseccionados quirúrgicamente e inmediatamente congelados a -80°C . Cada paciente, en presencia de un encuestador, respondió a un cuestionario, que solicitaba información demográfica y ocupacional, dieta e historia médica personal. También se recogieron datos clinicopatológicos que se añadieron a los demás datos de los pacientes. Se usó una versión modificada del sistema de estadios de Duke. La clasificación quirúrgica identificó ocho subtipos; (a) ciego, (b) colon ascendente, (c) colon transverso, (d) colon descendente, (e) colon sigmoide, (f) cruce rectosigmoide, (g) recto, y (h) canal anal. Los tumores proximales fueron definidos como los que incluyen el lado derecho del colon y el colon descendente hasta el colon sigmoide. De estos pacientes se dispuso además de datos procedentes de estudios previos sobre mutaciones en el gen K-Ras²⁹⁵ y el genotipo COMT³³².

El grupo de controles poblacionales estaba formado por 296 pacientes del Servicio de Traumatología del Hospital Clínico que fueron reclutados consecutivamente durante el mismo período de tiempo que los casos. Este

servicio recibe aproximadamente 3,000 pacientes al año, que viven en la misma zona metropolitana que los casos. Para facilitar el muestreo se descartaron los individuos que habían realizado el preoperatorio en otros servicios, análisis de sangre incluido. Se incluyeron, como se hizo con los casos, aquellos pacientes con edades comprendidas entre los 40 y los 90 años de edad. Se obtuvieron los mismos datos epidemiológicos que en los casos, así como la muestra de sangre. La mayor parte de los pacientes del grupo control fueron ingresados para realizar intervenciones de prótesis de la rodilla o bien por fracturas en las costillas. Se descartaron los pacientes con antecedentes de enfermedades malignas.

3.3. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.

Los patrones dietéticos se establecieron con un cuestionario semi cuantitativo de frecuencia de consumo de alimentos²⁹⁰ diseñado para desarrollar estudios epidemiológicos y nutricionales en poblaciones de distintos lugares de España. Dicho cuestionario fue concebido específicamente para ser utilizado en estudios poblacionales de riesgo caso-control, para el cáncer de mama y el CRC. Incluye 118 alimentos estructurados en 11 categorías (alimentos lácteos, huevos carne y pescado, vegetales, frutas, legumbres, cereales, aceites y grasas, alimentos dulces y pastelería, alimentos precocinados y miscelania). El cuestionario se utilizó tanto en casos como en controles a través de una entrevista personal. Dicha entrevista fue seguida de una discusión informal con los participantes para verificar la realización del cuestionario en términos de claridad y comprensión. Los entrevistadores fueron instruidos para realizar una estimación del tamaño de las porciones descritas por los pacientes. La

composición nutricional se determinó utilizando un software de análisis dietético²⁹¹, adaptado para nuestro estudio a partir de tablas standard de composición de los alimentos en España²⁹²⁻²⁹⁴.

En la **tabla 12** se describen algunos parámetros nutricionales utilizados en el estudio.

Tabla 12. Parámetros nutricionales, características y unidades de medida

Parámetros nutricionales	Características
Energía	Los valores energéticos de los nutrientes se expresaron en kilocalorías (Kcal) por ser los valores más utilizados en la práctica. Estos valores han sido obtenidos a partir de las cantidades de proteínas (4 kcal/g), grasas (9 kcal/g), carbohidratos (4 kcal/g) y alcohol (7 kcal/g).
Nutrientes	Se incluyen proteínas, lípidos y carbohidratos en gramos.
Minerales	P, Mg, Ca, Fe, Zn, Na, K (en miligramos). I, F, Cu y Se (en microgramos).
Vitaminas	C, B1, B2, B6, Ácido Nicotínico (en miligramos). D, B12, Ácido Fólico (en microgramos) A (microgramos equivalentes de retinol) E (miligramos equivalentes de α -tocoferol)
Colesterol	Obtenido en miligramos, los ácidos grasos en gramos.
Alcohol	En gramos
Fibra	En gramos, se considera como la suma de celulosa, hemicelulosa, y pectina (carbohidratos no disponibles) así como lignina y gomas.

3.4. Criterios de Selección de Micronutrientes.

Los datos que se han utilizado en este estudio proceden de un análisis dietético comparativo previo²⁹⁵ entre las poblaciones de controles y de casos de CRC,

cuyos resultados globales se incluyen en el anexo (**ANEXO IIa**, ingestas promedio). A partir de este estudio se seleccionaron una serie de micronutrientes que se comportaron como factores de riesgo o protección para el CRC (**ANEXO IIb**, estudio de riesgo) y que aquí utilizaremos para estudiar su posible implicación en la aparición de metilación tumoral.

3.5. Aislamiento de DNA a partir de sangre periférica.

A partir de sangre periférica se realizó la extracción de DNA mediante el siguiente protocolo; 300 µl de sangre total se incubaron durante 10' a temperatura ambiente con 900µl de una solución para lisar los hematíes (cloruro de amoníaco, bicarbonato sódico y EDTA), separarlos por centrifugación y facilitar así el aislamiento. Una vez centrifugado, descartamos el sobrenadante y resuspendimos el precipitado con 300 µl de una solución para la lisis de los linfocitos, mediante un detergente aniónico y en presencia de un estabilizante del DNA que limitaba la actividad de las Dnasas (Tris-EDTA, Sulfato de sodio diacil). Este proceso de lisis requería la actividad mecánica mediante el pipeteo de la muestra. Esta solución de DNA es estable durante 18 meses a temperatura ambiente. A continuación se incubó la muestra con Rnasa a 37°C y se añadió una solución de acetato de amonio para favorecer la precipitación de las proteínas y su separación por centrifugación. El DNA se recuperó y precipitó mediante tratamiento con isopropanol 100% y etanol 70%. Finalmente el DNA se resuspendió con una solución tampón para estabilizarlo (Tris-Edta). Después de 24 horas a temperatura ambiente, la solución de DNA se congeló a -80°C.

3.6. Aislamiento de DNA a partir de tejido.

En este caso la extracción de DNA se realizó a partir de 10-20 mg de tejido mediante el siguiente protocolo: se añadió a la muestra de tejido 600 µl de una solución para la lisis de las células, mediante un detergente aniónico y en presencia de un estabilizante del DNA que limitaba la actividad de las Dnasas (Tris-EDTA, sulfato de sodio diacil). La muestra se mezcló vigorosamente para facilitar la lisis celular y a continuación se incubó con Proteinasa K a 55°C durante toda la noche, para degradar las matrices extracelulares.

Posteriormente se incubó con Rnasa a 37°C, y se añadió una solución de acetato de amonio para favorecer la precipitación de las proteínas y su separación por centrifugación. El DNA se recuperó y precipitó mediante tratamiento con isopropanol 100% y etanol 70%. Finalmente el DNA se resuspendió con una solución tampón de estabilización (Tris-Edta). Tras 24 horas a temperatura ambiente, la solución de DNA se almacenó a -80°C.

3.7. Cuantificación del DNA.

El DNA se cuantificó mediante técnicas fluorimétricas. Se utilizó bis-benzamida (Hoechst 33528), cuyas características fluorimétricas se modifican en presencia de DNA, permitiendo su cuantificación. La bis-benzamida se une a nivel del surco menor de la doble hélice de DNA, en ausencia de DNA, el espectro de excitación de la bis-benzamida es de 356 nm y el espectro de emisión de 492 nm. Cuando la bis-benzamida se une al DNA estos espectros varían, siendo 365 nm de excitación y 458 nm de emisión. En la cubeta, la muestra se expuso a una luz filtrada, procedente de una lámpara de mercurio, con una longitud de

onda de 365 ± 7 nm. Esta luz excita el complejo formado por la bis-benzamida unida al DNA, dando una emisión de fluorescencia a 458nm. Un filtro de emisión colocado frente del fotodetector permitió captar únicamente la fluorescencia de 460 ± 15 nm. Por tanto la medida de la fluorescencia es un indicador directo de la concentración de DNA.

En nuestros ensayos se disolvieron $2\mu\text{l}$ de la muestra en 2 ml de solución para ensayo (1X TNE; 100mM Tris, 10mM EDTA, 2 M NaCl) que contenía una solución de bis-benzamida de 0.1 mg/ml. Como Standard del ensayó se utilizó Calf Thymus DNA a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ para la lectura del DNA obtenido a partir de sangre periférica (concentraciones entre 10-500 ng/ml) y de 1 mg/ml para la lectura de muestras procedentes de aislamiento a partir de tejido (concentraciones entre 100-2000 ng/ml).

3.8. Análisis de Metilación ; p16^{INK4a}

Se realizó un tratamiento previo de las muestras de DNA, que consistió en una reacción de modificación con bisulfito sódico. Con esta reacción todas las citosinas no metiladas pasaron a uracilo y las citosinas metiladas se mantuvieron como tales. Esto nos permitió detectar la metilación del DNA con una PCR con primers específicos para la secuencia modificada (no metilada) y primers específicos para la secuencia no modificada (metilada).

El método se inició con una desnaturalización de 1 μg de DNA en 50 μl de agua, a la cual se añadió 5.5 μl de NaOH 2M y se procedió a una incubación de 10' a 37°C. A continuación se añadieron 30 μl de hidroquinona 10mM y 520 μl de bisulfito sódico 3M (pH 5) y se incubó a 55°C 16h. El DNA tratado se purificó

mediante un sistema de columnas y se recuperó en 50µl de agua. El paso final de la conversión citosina→uracilo se consiguió por tratamiento alcalino con NaOH 3M, neutralizado con acetato de amonio 10 M y finalmente precipitado con glicógeno y etanol y resuspendido en agua.

Las muestras tratadas son sometidas a dos reacciones de PCR; en una se utilizaron primers específicos para la secuencia metilada (primers M) para dar lugar a amplificaciones donde se mantuvieron las citosinas. En la otra se utilizaron primers específicos para la secuencia no metilada (primers UM) en donde las citosinas pasaron a uracilo.

Las condiciones para esta PCR fueron las siguientes; a partir de 1.6 µl del DNA tratado con bisulfito y en un volumen de 25 µl, con 200 µM de a nucleótido, 40 µM de cada primer (M o UM), 1.5 mM Cl₂Mg y 2.5 U TaqPolimerasa, suplementado con el buffer 1X correspondiente.

La reacción se iniciaba a 94°C 2' siguiendo con 35 ciclos de 94°C 30'', 65°C 30'' y 72°C 30'' y finalmente 4' a 72°C.

Los fragmentos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio y bajo luz ultravioleta. La presencia de banda en una ó otra PCR, definió el estatus de metilación de la región estudiada.

3.9. Análisis de Metilación ; p14^{ARF}.

También en este caso se realizó un tratamiento previo de las muestras de DNA, que consistía en una reacción de modificación con bisulfito sódico. Con esta reacción todas las citosinas no metiladas pasaban a uracilo. Las citosinas

metiladas se mantuvieron como tales. Esto nos permite detectar la metilación del DNA a través de una PCR con primers específicos para la secuencia modificada (no metilada) y primers específicos para la secuencia no modificada (metilada).

Inicialmente se disolvió 1 µg de DNA en 50 µl de agua, a la cual añadimos 5.5 µl de NaOH 2M y lo incubamos 10' a 37°C para desnaturalizar el DNA y facilitar la reacción. A continuación se añadieron 30 µl de hidroquinona 10mM y 520µl de bisulfito sódico 3M (pH 5) y se incubó a 55°C 16h. El DNA tratado se purificó mediante un sistema de columnas y se recuperó en 50µl de agua. El paso final de la conversión citosina→uracilo se consiguió por tratamiento alcalino con NaOH 3M, neutralizado con acetato de amonio 10 M y finalmente precipitado con glicógeno y etanol y resuspendido en agua.

Las muestras tratadas fueron sometidas a dos reacciones de PCR; en una usamos primers específicos para la secuencia metilada (primers M) donde se mantuvieron las citosinas y en la otra usamos primers específicos para la secuencia no metilada (primers UM), en donde las citosinas pasaron a uracilo. Las condiciones para esta PCR fueron las siguientes; a partir de 1.6 µl del DNA tratado con bisulfito y en un volumen de 25 µl, con 200 µM de cada nucleótido, 20 µM de cada primer (M o UM), 1,5 mM Cl₂Mg y 1 U TaqPolimerasa, suplementado con el buffer 1X correspondiente.

La reacción se inició con un *Hot-Start* a 95°C 5'. A continuación 35 ciclos de 95°C 30", 65°C 30" y 72°C 1' y finalmente 4' a 72°C.

Los fragmentos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y bajo luz ultravioleta. La presencia

de banda en una o otra PCR definió el estatus de metilación de la región estudiada.

3.10. Análisis de Metilación ; hMLH1.

Como en los casos anteriores se realizó un tratamiento previo de las muestras de DNA, que consistió en una reacción de modificación con bisulfito sódico. Con esta reacción todas las citosinas no metiladas pasaron a uracilo y las citosinas metiladas se mantuvieron como tales, con lo que pudimos detectar la metilación del DNA con una PCR con primers específicos para la secuencia modificada (no metilada) y primers específicos para la secuencia no modificada (metilada).

Para proceder a la desnaturalización 1 µg de DNA se disolvió en 50 µl de agua, a la cual se añadió 5.5µ l de NaOH 2M y se incubó 10' a 37°C. A continuación se introdujeron 30 µl de hidroquinona 10mM y 520µl de bisulfito sódico 3M (ph 5) y se incubó a 55°C 16h. El DNA tratado se purificó mediante un sistema de columnas y se recuperó en 50µl de agua. El paso final de la conversión citosina→uracilo se consiguió por tratamiento alcalino con NaOH 3M, neutralizado con acetato de amonio 10 M y finalmente precipitado con glicógeno y etanol y resuspendido en agua.

Las muestras tratadas fueron sometidas a dos reacciones de PCR; en una se utilizaron primers específicos para la secuencia metilada (primers M) y en la otra usamos primers específicos para la secuencia no metilada (primers UM).

Las condiciones para esta PCR fueron las siguientes; a partir de 1.6 µl del DNA tratado con bisulfito y en un volumen de 25 µl, se añadió 200 µM de cada

nucleótido, 20 μ M de cada primer (M o UM), 1.5 mM Cl_2Mg y 1 U

TaqPolimerasa, suplementado con el buffer 1X correspondiente.

La reacción se inició con un *Hot-Start* a 95°C 5' y a continuación se repitieron

35 ciclos de 95°C 30'', una temperatura de alineamiento de 30'' (varió si eran primers M, Ta 66.5°C, o primer UM, Ta 60°C) y 72°C 1'. Finalmente 4' a 72°C.

Los fragmentos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio y bajo luz ultravioleta. La

presencia de banda en una o otra PCR definió el estatus de metilación de la región estudiada.

Tabla 13. Primers utilizados en la MS-PCR para el estudio de la metilación en p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1.

	M-primers	UM-primers
p16 ^{INK4a}	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC GACCCCGAACCGCGACCGTAA	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT CCACCTAAATCAACCTCCAACCA
p14 ^{ARF}	AGGGAAGGTGGGTGTGTGTT ACCACACACACACCAAATCCA	GGAAGGCGGGTGC GCGTT CGCGACGAACCGCACGCGCG
hMLH1	TATATCGTTCGTAGTATTCGTGT TCCGACCCGAATAAACCCAA	TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT ACCACCTCATCATAACTACCCACA

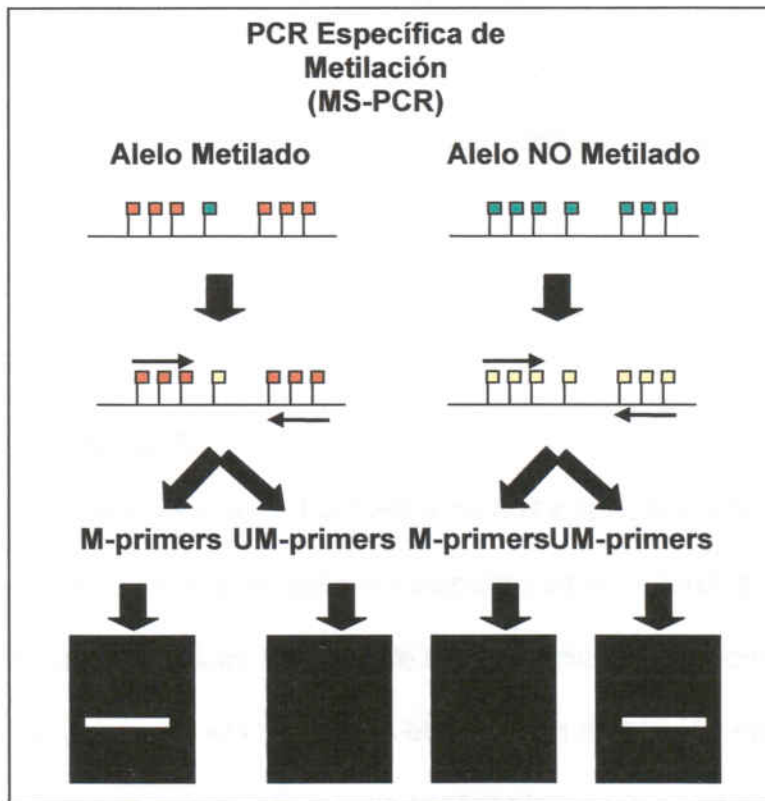
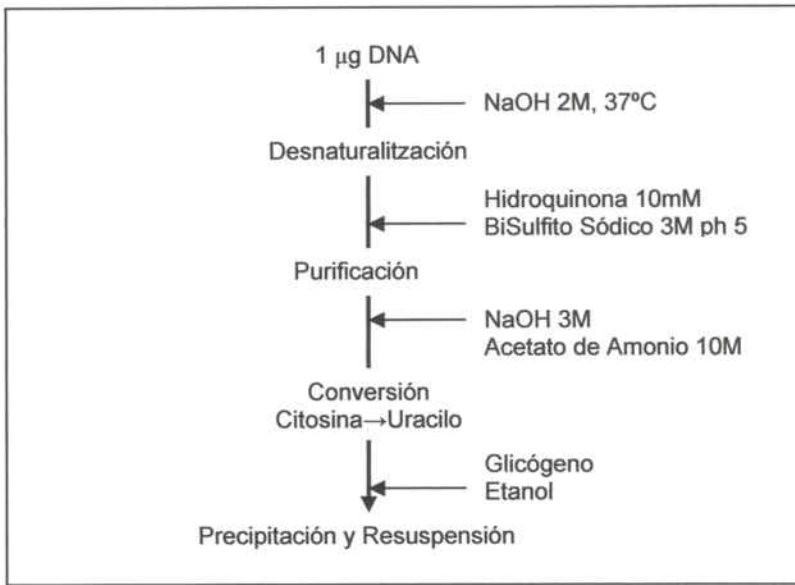


Figura 12. Protocolo para determinar la metilación de islas CpG en secuencias conocidas.

3.11. Genotipo MTHFR.

La variante alélica se crea por un cambio de C a T en la posición 677, que supone la aparición de una nueva diana para el enzima de restricción *Hinf I*. Por tanto, la identificación del genotipo MTHFR se realizó mediante PCR y una digestión con dicho enzima. La reacción de amplificación se llevó a cabo en 25 µl, con 200 µM de cada nucleótido, 25 µM de cada primer (5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' y 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG TG- 3'), 1.5 mM de Cl₂Mg y 1.5U TaqPolimerasa. Las condiciones se iniciaban con 1' a 95°C y 35 ciclos de 95°C 30", 56°C 30" y 72°C 60", seguidos por una extensión final de 72°C 4'. 5 µl del producto de PCR se digirieron con 5 U de *HinfI* durante 4h a 37°C.

El producto de la PCR no digerido fue de 198 pb. La presencia de la diana para *HinfI* provocaba una digestión del fragmento que visualizaba como una banda de 175 pb. Por lo tanto los individuos homocigotos para este polimorfismo presentaban una única banda de 175 pb; los heterocigotos mostraban las dos bandas, 198 y 175 pb; y los homocigotos para el alelo normal sólo la banda de 198pb.

3.12. Análisis estadístico.

Los datos fueron analizados con el software de análisis estadístico SPSS 10.0. Los cálculos de medianas y desviaciones standard se calcularon para las variables continuas. El análisis univariante se utilizó para identificar factores ambientales asociados con el CRC y con el CRC con metilación en p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1. También se utilizó para analizar la relación del genotipo

MTHFR con el riesgo de metilación en p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1, en pacientes de CRC. El análisis multivariante se usó para estimar la contribución independiente de cada variable identificada en los análisis univariantes de riesgo de CRC y riesgo de metilación en CRC. Los límites de confianza para las "odds ratio" ajustadas se calculó con los coeficientes logísticos y errores standard asociados.

En el estudio de los nutrientes, estos fueron analizados de forma independiente a través de análisis multivariantes ajustados por edad y Kilocalorías (Kcalorías).

4. RESULTADOS

4.1. Características de las Poblaciones Estudiadas.

En la **Tabla 14** se muestra las características del grupo de pacientes de CRC y el grupo control. El subgrupo de pacientes del que pudo obtenerse muestra tumoral (grupo CRC molecular) fue muy similar al grupo de pacientes de CRC totales en cuanto a la distribución por edad, sexo y consumo de tabaco.

Tabla 14. Características de los pacientes con CRC y controles.

	Controles	CRC	CRC molecular
n	296	247	140
Edad media	61.9±11.6	70.4±11.2	71.0±11.1
<u>Mujeres</u>			
n	62.5%	46.9%	47.8%
Fumadores	11.3%	3.4%	1.7%
Mediana pack year	2.2±7.7	0.8±6.0	0.07±0.5
<u>Hombres</u>			
n	37.5%	53.0%	52.1%
Fumadores	73.8%	72.5%	72.1%
Mediana pack year	34.6±35.0	38.7±43.6	35.2±40.6

Las características clínico-patológicas del grupo de pacientes con CRC se muestran en la **Tabla 15**. En ella se recogen los datos obtenidos a través de la historia clínica y los informes del Servicio de Anatomía Patológica.

Tabla 15. Características clinicopatológicas de los pacientes del grupo CRC y del subgrupo de CRC Molecular.

Variable	CRC	CRC molecular
Hombres	53.0%	52.1%
Mujeres	46.9 %	47.8%
Estadio		
A	1.6%	1.7%
B	40.2%	39.6%
C	28.3%	28.4%
D	29.6%	30.1%
Diferenciación		
Moderado/bien Dif.	91.8%	88.7%
Pobremente Dif.	8.1%	12.2%
Localización		
Ciego	8.0%	11.9%
Colon ascendente	13.7%	10.3%
Colon transversal	7.6%	7.6%
Colon descendente	3.6%	4.3%
Proximal		
Colon sigmoide	35.2%	34.1%
Rectosigmoide	7.6%	10.2%
Recto	23.8%	21.3%
Distal		
	66.8%	65.8%

4.2.Características clinicopatológicas y metilación en p16^{INK4a}.

La metilación en p16^{INK4a} se identificó en el 16% de los tumores del subgrupo de CRC molecular que analizamos. Usamos el análisis univariante para explorar la asociación de factores clínicos con la metilación en p16^{INK4a}. Se examinaron variables que habían sido identificadas como factores de riesgo para el CRC, o de importancia para el pronóstico. Entre estos se incluyeron la localización proximal, edad avanzada, género femenino y la pobre diferenciación histopatológica. El estadio no se asoció con el estatus de metilación en p16^{INK4a}. Para determinar que factores estaban asociados independientemente con la metilación en p16^{INK4a}, se llevó a cabo un análisis de regresión logística con las variables identificadas en las comparaciones univariantes. Como se muestra en la **Tabla 16**, la localización proximal, la pobre diferenciación y el género femenino mantuvieron la significación estadística cuando se incluyen en este modelo, sin embargo la edad no fue un valor predictivo. Así pues las mujeres tienen mayor probabilidad de presentar tumores con metilación en p16^{INK4a} respecto a los hombres (OR=6.5, p=0.01), así como los tumores pobremente diferenciados respecto los bien diferenciados (OR=10.1, p=0.001). En cuanto a la localización anatómica, los tumores metilados predominaron en localizaciones proximales desde el ciego, colon ascendente, transversal y tramos del descendente. Sin embargo fueron poco frecuentes en el colon sigmoide, el recto y el colon rectosigmoide. La asociación de la metilación en p16^{INK4a} con dicha localización proximal fue altamente significativa (OR=10.7 p<0.002).

En las **Figuras 13, 14 y 15** también quedan expuestos estos resultados.

Tabla 16. Características clinicopatológicas y distribución del del estatus de metilación de p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1 en el grupo CRC molecular.

Variable	p16 ^{INK4a}	p14 ^{ARF}	hMLH1
Hombres	5% ¹	10% ⁴	11.5%
Mujeres	32% ¹	25.4% ⁴	25%
Todos	18%	17.6%	18%
Estadio			
A+B	12.0%	13.7%	16.6%
C+D	5.0%	20.6%	19.1%
Diferenciación			
Moderado/bien Dif.	13.1% ²	13.7 %	13.6% ⁶
Pobremente Dif.	58% ²	33.3%	50% ⁶
Localización			
Proximal	42% ³	31.0% ⁵	32.5% ⁷
Distal	5% ³	10.3% ⁵	10.3% ⁷

¹p=0.001 ²p=0.001 ³p=0.001 ⁴p=0.03 ⁵p=0.005 ⁶p=0.022 ⁷p=0.01.

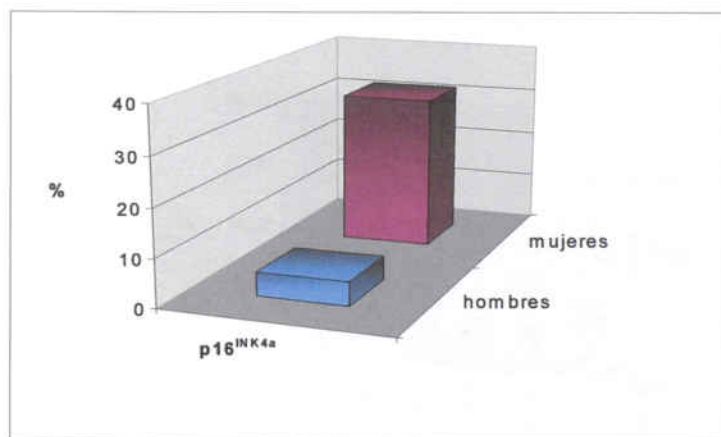


Figura 13. Distribución de la metilación en p16^{INK4a} entre hombres y mujeres.

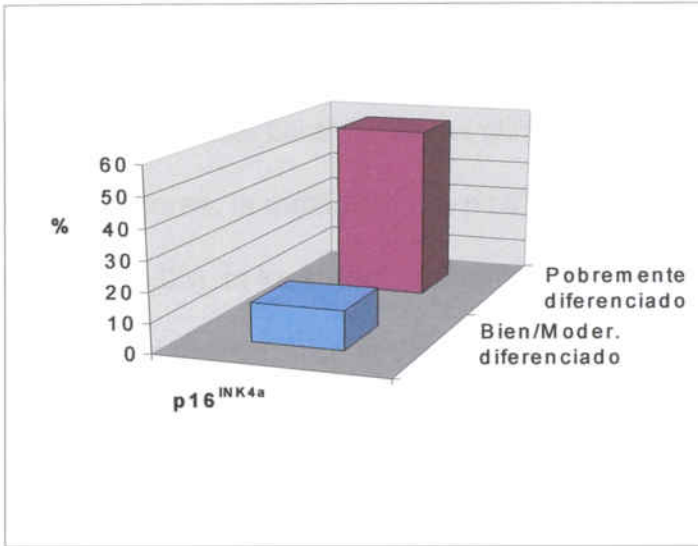


Figura 14. Distribución de la metilación en p16^{INK4a} en función del grado de diferenciación del tumor.

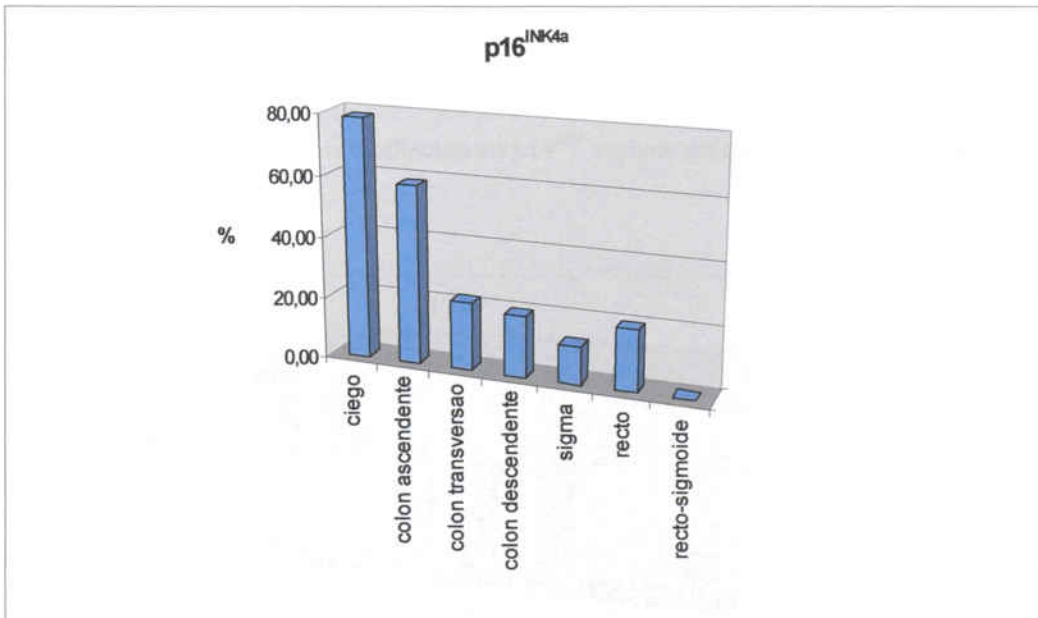


Figura 15. Distribución de la metilación en p16^{INK4a} en función de la localización anatómica del tumor.

4.3.Características clinicopatológicas y metilación en p14^{ARF}.

En los tumores analizados del grupo CRC molecular, la metilación en el promotor de p14^{ARF} fue del 17,6% (Tabla 16). El patrón de metilación se asoció con distintas características clinicopatológicas del tumor. Como en los casos anteriores, la metilación en p14^{ARF} correlacionó significativamente con el género (p=0.03), la localización anatómica (p=0.005) y en este caso también con la edad (p=0.05) . En la **Figura 16** y en la **Figura 17** se pueden observar estos resultados. En cuanto al grado de diferenciación la metilación en p14^{ARF} es superior en tumores pobremente diferenciados (33,3%) aunque no se alcanza la significación estadística (Tabla 16, Figura 18).

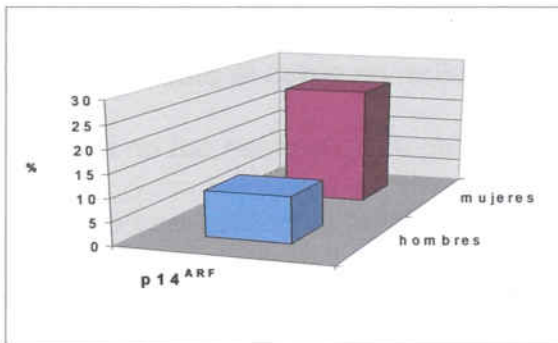
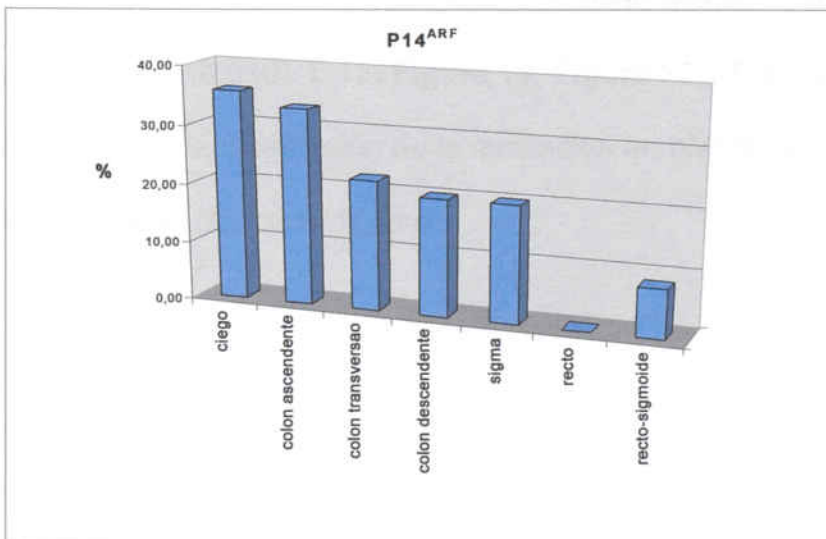


Figura 16. Distribución de la metilación en p14^{ARF} entre hombres y mujeres.

Figura 17. Distribución de la metilación en p14^{ARF} en función de la localización anatómica del tumor.



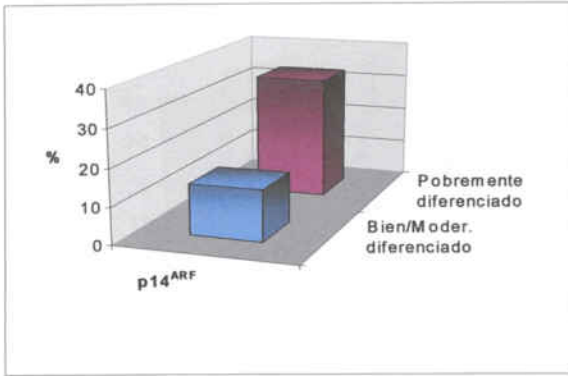


Figura 18. Distribución de la metilación en p14^{ARF} en función del grado de diferenciación del tumor

4.4. Características clinicopatológicas y metilación en hMLH1.

La metilación del gen hMLH1 se observó en el 18% del subgrupo molecular CRC (Tabla 16). A pesar de que la prevalencia de la metilación del gen hMLH1 es prácticamente el doble en mujeres (25%) que en hombres (11.5%), esta diferencia no fue estadísticamente significativa, aunque se puede considerar que existe una tendencia ($p= 0.098$). Cuando se compara la frecuencia de metilación en hMLH1 en los tumores pobremente diferenciados (50%) con la frecuencia en tumores entre moderado y bien diferenciados (13.6%), se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.02$). Del mismo modo, la diferencia entre la frecuencia de la metilación en hMLH1 en tumores proximales (32.5%) y distales (10.3%), también resultó estadísticamente significativa ($p=0.010$). En la Figura 19, Figura 20 y Figura 21 se reflejan las diferencias en la distribución de la metilación en hMLH1 según dichas características clinicopatológicas.

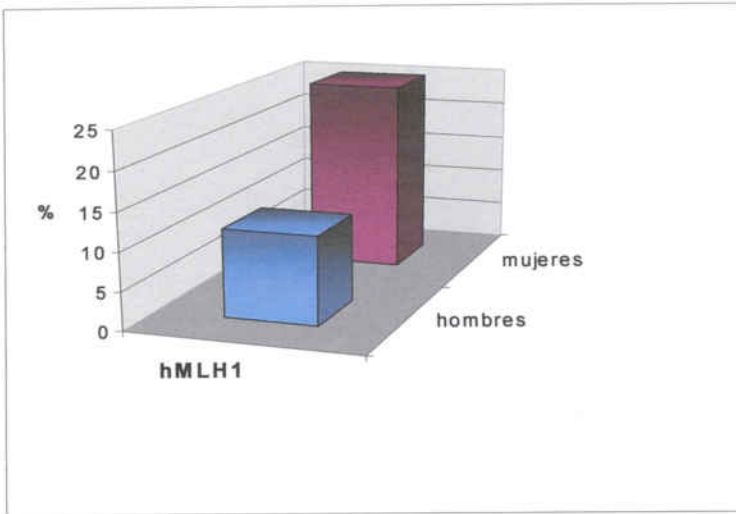


Figura 19. Distribución de la metilación en hMLH1 entre hombres y mujeres.

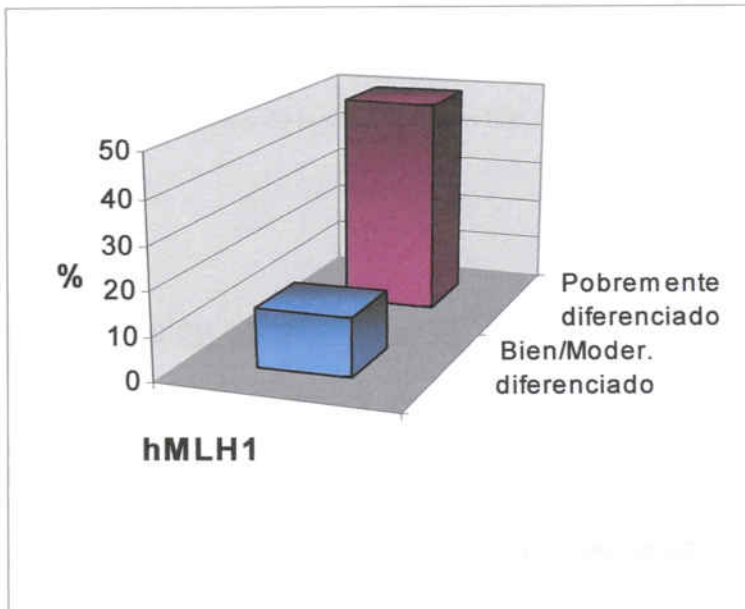


Figura 20. Distribución de la metilación en hMLH1 en función del grado de diferenciación del tumor.

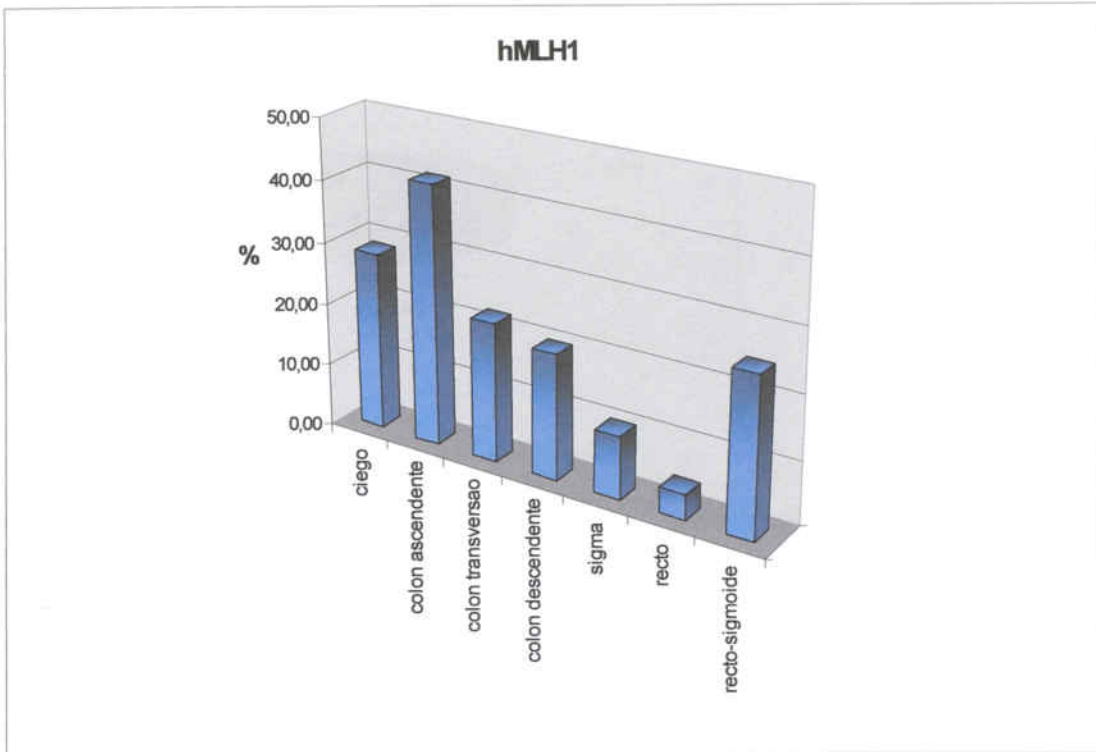


Figura 21. Distribución de la metilación en hMLH1 en función de la localización anatómica del tumor.

4.5. Metilación en p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1.

Los patrones de metilación de los distintos TSGs estudiados fueron muy similares en cuanto a su frecuencia. También fueron similares en cuanto a su distribución en ciertos tumores el género femenino, la localización anatómica proximal y la pobre diferenciación del tumor (**Tabla 16**). Sin embargo cuando se analizó la distribución de la metilación de los distintos loci estudiados se observó que del 48% de tumores que presentan metilación en algún loci, el 21% presentaban dos loci metilados (**Figura 22**) y la metilación en los tres promotores estudiados en un mismo tumor se produjo en el 3 % de tumores metilados (**Figura 23**).

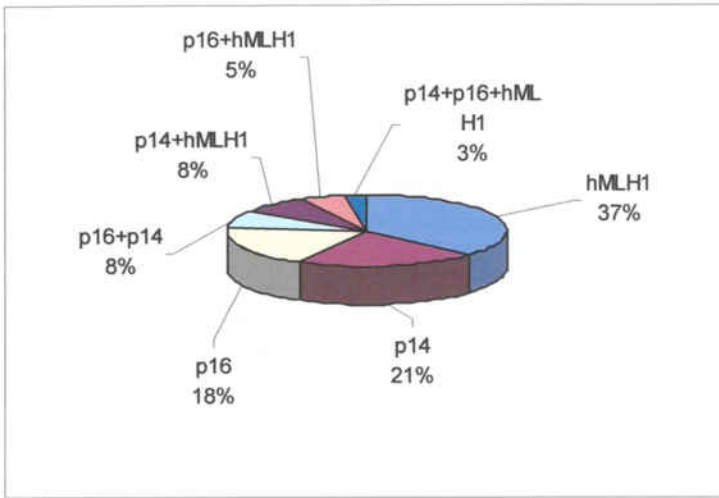


Figura 22. Distribución de la metilación en p14^{ARF}, p16^{INK4a} y hMLH1 en tumores de CRC con algún loci metilado (48% de los tumores del subgrupo CRC molecular).

Analizando estos patrones de metilación teniendo en cuenta los tres loci, se obtuvo una correlación significativa entre la metilación en p14^{ARF} y la metilación en p16^{INK4a} ($p=0.009$). De los 16 tumores metilados en p16^{INK4a} el 37.5% presentaron también metilación en p14^{ARF}, mientras que solo 10 de los 85 tumores que no presentaban metilación en p14^{ARF} presentaron p16^{INK4a} metilada (11.7%). Sin embargo la metilación en hMLH1 no correlaciona con la metilación en p14^{ARF} (el 25% de tumores con metilación en hMLH,1 también presentaban metilación en p14^{ARF}) ni con la metilación en p16^{INK4a} (el 20% de tumores metilados en hMHL1, también presentaron metilación en p16^{INK4a}).

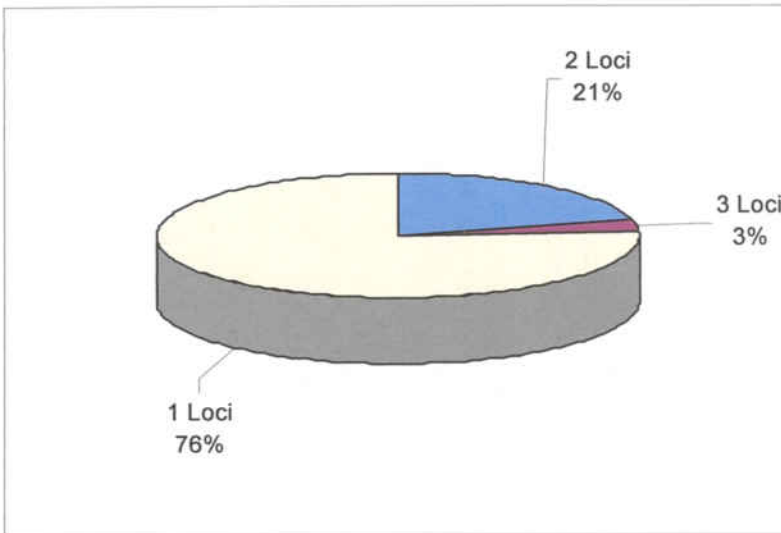


Figura 23. Frecuencia del número de loci metilados en los tumores con algún loci metilado.

4.6. Metilación en p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1 y otras variables patológicas (K-Ras) y genéticas (COMT).

Una de las características moleculares descritas comúnmente en el CRC son las mutaciones en K-Ras, en el codón 12 y codón 13. En un estudio anterior describimos las frecuencias de estas mutaciones en CRC³¹⁶. En nuestro estudio las mutaciones en el codón 12 y 13 de K-Ras no las hemos podido asociar a los patrones de metilación para p14^{ARF}, p16^{INK4a} y hMLH1. En la **Figura 24** puede verse como la frecuencia de mutaciones en los codones 12 y 13 de K-Ras es muy parecida en los distintos subgrupos moleculares de metilación.

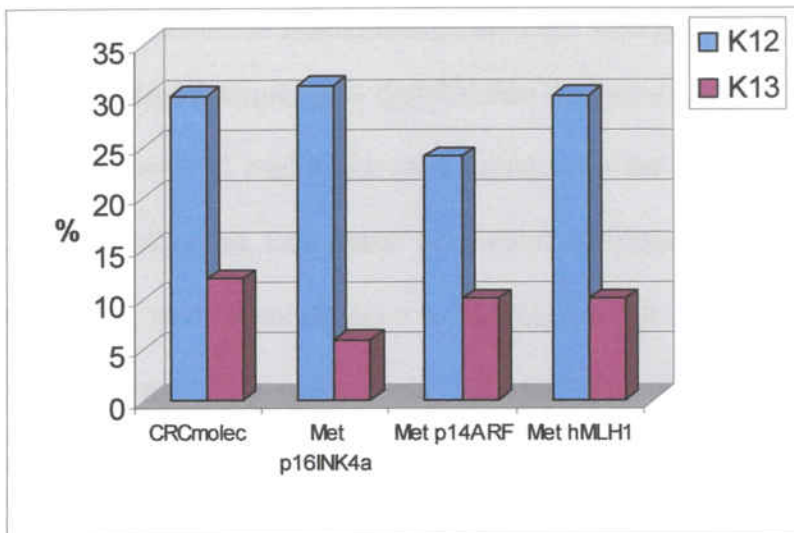


Figura 24. Frecuencia de mutaciones en los codones 12 y 13 de K-Ras. Las frecuencias entre el grupo CRC molecular y los distintos subgrupos caracterizados por su metilación en $p16^{INK4a}$, $p14^{ARF}$ y hMLH1 no difirieron significativamente.

También en otro estudio previo se analizó la posible asociación de los polimorfismos en el que que codifica la catechol-orto-methyltransfera (COMT), responsable de la síntesis de los catecolestrógenos, con el riesgo de CRC y específicamente con el riesgo de presentar tumores colorectales con mutaciones en K-Ras, provocadas por las estructuras quinona de los metabolitos estrogénicos³³². En el estudio actual nos hemos planteado la posible relación de este genotipo con las alteraciones en la metilación. El análisis estadístico no mostró ninguna asociación entre este polimorfismo y los patrones de metilación en $p16^{INK4a}$, $p14^{ARF}$ y hMLH1, ni se asoció con las características clinicopatológicas que los definen.

4.7.Características clinicopatológicas y genotipo MTHFR.

En la **Tabla 17** aparece la distribución del genotipo MTHFR homocigoto wt en el grupo de CRC molecular de acuerdo con las distintas características clinicopatológicas. Los datos no sugieren ninguna asociación del genotipo con el estadio, la diferenciación o la localización. A pesar de que el genotipo en cuestión fue más prevalente en los tumores pobremente diferenciados (66.6%) que en los tumores entre moderado y bien diferenciados (37.9%), este incremento no fue estadísticamente significativo ($p = 0.067$) aunque podría considerarse que existe una tendencia.

Tabla 17. Características clinicopatológicas y distribución del genotipo MTHFR en el grupo CRC.

Variable	MTHFR homo wt
Hombres	41%
Mujeres	39.2%
Todos	40.2%
Estadio	
A+B	41.6%
C+D	39.7%
Diferenciación	
Moderado/bien Dif.	37.9%
Pobremente Dif.	66.6%
Localización	
Proximal	35%
Distal	42.8%

4.8. MTHFR y Metilación.

En la **Tabla 18** se muestra la distribución de la frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo C677T MTHFR en los distintos grupos de pacientes estudiados; grupo CRC molecular, pacientes del grupo CRC molecular con metilación en hMLH1, pacientes del grupo CRC molecular con metilación en p14^{ARF} y pacientes del grupo CRC molecular con metilación en p16^{INK4a}. Las frecuencias en el grupo CRC molecular (40.2% CC; 44.4% CT; 15.4% TT) no presentaron grandes diferencias respecto a las frecuencias descritas en otros trabajos con grupos de pacientes de CRC (45.9% CC, 44.7% CT, 9.5% TT)³⁰⁶ y en poblaciones caucásicas^{299, 300}. En los grupos de pacientes con metilación en hMLH1 y p14^{ARF} la frecuencia de individuos homocigotos CC fue inferior a la observada en el grupo CRC molecular total, e inferior que en el grupo de pacientes con metilación en p16^{INK4a}. En los pacientes con metilación en hMLH1 la frecuencia fue del 30 % CC, y para los metilados en p14^{ARF} del 33%. Esta disminución se traduce, en el caso de la metilación de hMLH1, en un aumento en la frecuencia de individuos homocigotos TT (25%) y en los metilados en p14^{ARF}, en un aumento de los heterocigotos CT.

Tabla 18. Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas del gen MTHFR en los diferentes subgrupos moleculares del estudio.

MTHFR	CRC Molecular	p16^{INK4a}	p14^{ARF}	hMLH1
Hom CC	40.2%	45.1%	33.3%	30%
Hetero CT	44.4%	45.1%	52.3%	45%
Hom TT	15.4%	9.7%	14.2%	25%
Alelo C	0.62	0.67	0.59	0.52
Alelo T	0.38	0.33	0.41	0.48

La **tabla 19** refleja la distribución del considerado genotipo de riesgo de CRC de la MTHFR, homocigoto CC, en los distintos grupos del estudio estratificados por sexo. De nuevo se observan las diferencias en la frecuencia de este genotipo en los grupos de pacientes con metilación de hMLH1 y p14^{ARF}. Además, la frecuencia, en el caso de los tumores metilados en hMLH1 también es muy diferente entre los grupos de hombres (42.8%) y mujeres (21.4%). Esta diferencia podría explicarse por la mayor prevalencia de la metilación de hMLH1 en mujeres (25%) que en hombres (11,5%).

Tabla 19. Frecuencias del genotipo MTHFR homocigoto CC

MTHFR CC	Molecular CRC	p16 ^{INK4a} metilado	p14 ^{ARF} metilado	hMLH1 metilado
Mujeres	39.3%	45%	33.3%	21.4%
Hombres	41%	45.5%	33.3%	42.8%
Total	40.2%	45.1%	33.3%	30%

Tabla 20 .Análisis multivariante del riesgo de metilación dependiente del genotipo MTHFR

	p16 ^{INK4a}			P14 ^{ARF}			hMLH1		
	OR	CI	P	OR	CI	p	OR	CI	p
1. CC	1.258	0.347-1.940	0.607	0.612	0.587-4.513	0.358	0.57	0.391-1.518	0.207
2. Alélo C	1.343	0.705-2.419	0.167	0.834	0.564-1.187	0.396	0.604	0.422-1.615	0.616

Los resultados del análisis multivariante del riesgo de metilación dependiente del genotipo MTHFR ajustado por edad y sexo, se muestran en la **Tabla 20**. En el primer modelo se estudió el polimorfismo MTHFR en dos categorías; homocigotos CC versus heterocigotos y homocigotos TT. En este caso el genotipo MTHFR CC se asoció, aunque no significativamente, con un papel protector del riesgo de metilación en hMLH1 y p14^{ARF} (OR 0.57 y 0.61

respectivamente), como ya se había observado a través de los valores de frecuencias obtenidos en estos subgrupos. Para la metilación en p16^{INK4a} la asociación fue positiva (OR=1,2), es decir de riesgo, aunque tampoco en este caso fue significativa. En el segundo modelo se estudió el alelo C considerado como una variable continua ajustada por edad y sexo. En este caso se reprodujeron los resultados anteriores aunque la especificidad de la asociación disminuyó e igualmente no se alcanzó la significación estadística.

Por tanto la relación del genotipo MTHFR con el riesgo de presentar tumores colorectales con metilación en alguno de los genes seleccionados (p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1) no aportó en ningún caso resultados estadísticamente significativos.

4.9. Dieta y riesgo de Metilación.

Las **Tablas 21, 22 y 23** muestran los valores promedio del consumo de micronutrientes seleccionados en cada uno de los subgrupos según sus características de metilación y el análisis estadístico comparativo con el grupo control.

Tabla 21. Selección de la ingesta de micronutrientes en subgrupos de CRC con metilación en p16^{INK4a} y comparación con el grupo control.

Micronutriente	p16 ^{INK4a} (+)	p16 ^{INK4a} (-)	p ^a	p ^b
Fibra (g/d)	15.57±4	15.8±5	0.03	0.003
Folato(ug/d)	266.0±75	286.4±86	0.01	Ns
Vit A (ug/d)	2702±1359	3186±1923	0.01	Ns
Vit B1(mg/d)	1.09±0.22	1.18±0.33	0.007	Ns
Vit D (ug/d)	3.27±2	3.60±2	ns	Ns
VitE (mg/d)	8.38±3	8.15±3	ns	0.007
Potasio (mg/d)	2549.78±916	2858.34±1106	0.03	Ns
Calcio (mg/d)	711.8±302.3	789.5±316.3	ns	Ns
Hierro (g/d)	11.02±2.6	12.02±3.1	0.02	Ns

* analisis t-Student o U-Mann Whitney comparando controles con el grupo molecular CRC con metilación en p16^{INK4a} p^a, o el grupo molecular CRC sin metilación en p16^{INK4a} p^b.

De estos resultados se deduce que los pacientes con metilación en el locus de p16^{INK4a} consumieron significativamente menos folatos (p =0.01), vitamina A (p= 0.01), vitamina B1 (p=0.007), y en menor medida potasio (p=0.03) y hierro (p =0.02) que los controles, mientras que los pacientes con tumores no metilados presentaban niveles de ingesta similares a los del grupo control (**Figura 25, 26, 27**).

Tabla 22. Selección de la ingesta de micronutrientes en subgrupo de CRC con metilación en p14^{ARF} y comparación con los controles

Micronutriente	p14 ^{ARF} (+)	p14 ^{ARF} (-)	p ^a	p ^b
Fibra (g/d)	15.98 ±5	15.81±5	ns	0.002
Folato(ug/d)	286.8±75	281±13	ns	0.014
Vit A (ug/d)	2733±608	3147±1958	0.000	ns
Vit B1(mg/d)	1.09±0.21	1.18±0.2	0.023	0.051
Vit D (ug/d)	3.32±2	3.58±2	ns	ns
VitE (mg/d)	8.30±3	8.23±3	ns	0.01
Potasio (mg/d)	2728.77±1002	2790.63±1088	ns	0.028
Calcio (mg/d)	790.9±255.9	784.2±324.8	ns	ns
Hierro (g/d)	11.16±2.6	11.92±3.1	ns	ns

* analisis t-Student o U-Mann Whitney comparando controles con el grupo molecular CRC con metilación en p14^{ARF} p^a, o el grupo molecular CRC sin metilación en p14^{ARF} p^b.

Tabla 23. Selección de la ingesta de micronutrientes en subgrupo de CRC con metilación en hMLH1 y comparación con el grupo control.

Micronutriente	hMLH1(+)	hMLH1(-)	p ^a	p ^b
Fibra (g/d)	14.7 ±6	16.0±5	0.02	0.003
Folato(ug/d)	274.3±97	282±81	ns	0.01
Vit A (ug/d)	2785±1680	3118±1829	0.05	ns
Vit B1(mg/d)	1.11±0.29	1.17±0.31	0.05	0.02
Vit D (ug/d)	4.2±2	3.37±2	ns	0.02
VitE (mg/d)	8.31±3.3	8.19±2.9	ns	0.007
Potasio (mg/d)	2704.35±989.0	2794.0±1084.9	ns	0.02
Calcio (mg/d)	728.7±279.8	796.7±317.8	ns	ns
Hierro (g/d)	11.35±2.5	11.85±3.1	ns	ns

* analisis t-Student o U-Mann Whitney comparando controles con el grupo molecular CRC con metilación en hMLH1 p^a, o grupo molecular CRC sin metilación en hMLH1 p^b.

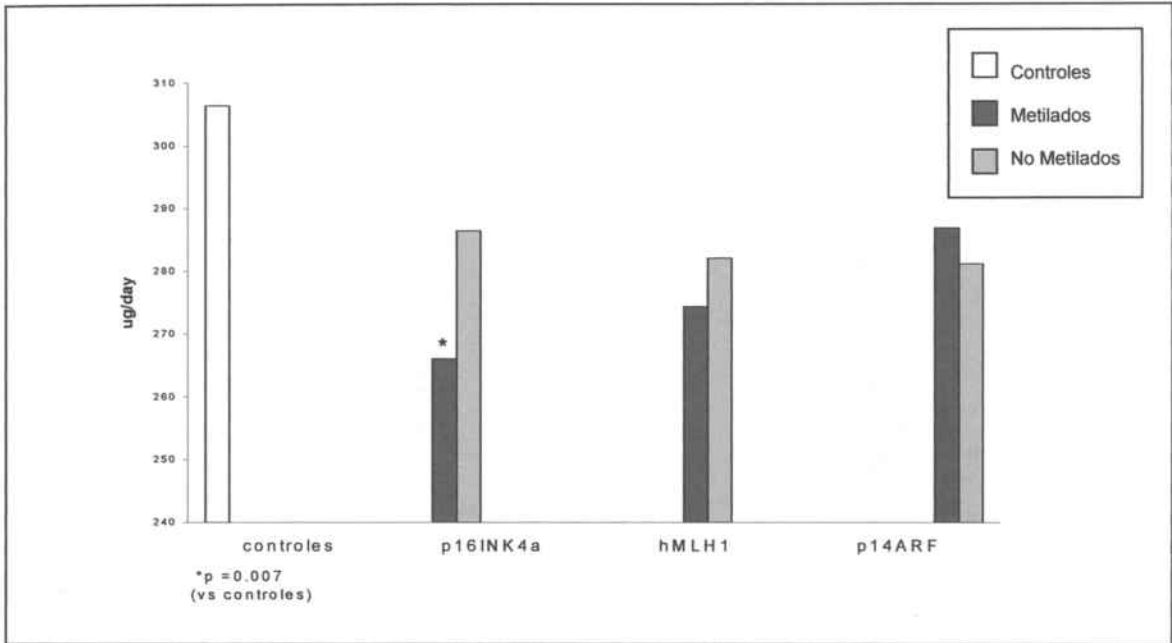


Figura 25. Consumo de folatos en controles y subgrupos moleculares de CRC.

Los pacientes con metilación en p14^{ARF} consumieron, de forma significativa, menor cantidad de vitamina A ($p < 0.000$) y de vitamina B1 ($p < 0,05$) que los controles. Sin embargo el consumo de folatos fue muy similar en ambos grupos, metilados y no metilados (**Figura 25, 26 y 27**).

La metilación en hMLH1 se asoció significativamente con una deficiencia en el consumo de vitamina A ($p=0,05$) y vitamina B1($p=0,05$) respecto los controles y se observó una tendencia a un menor consumo de folatos (**Figura 25, 26 y 27**).

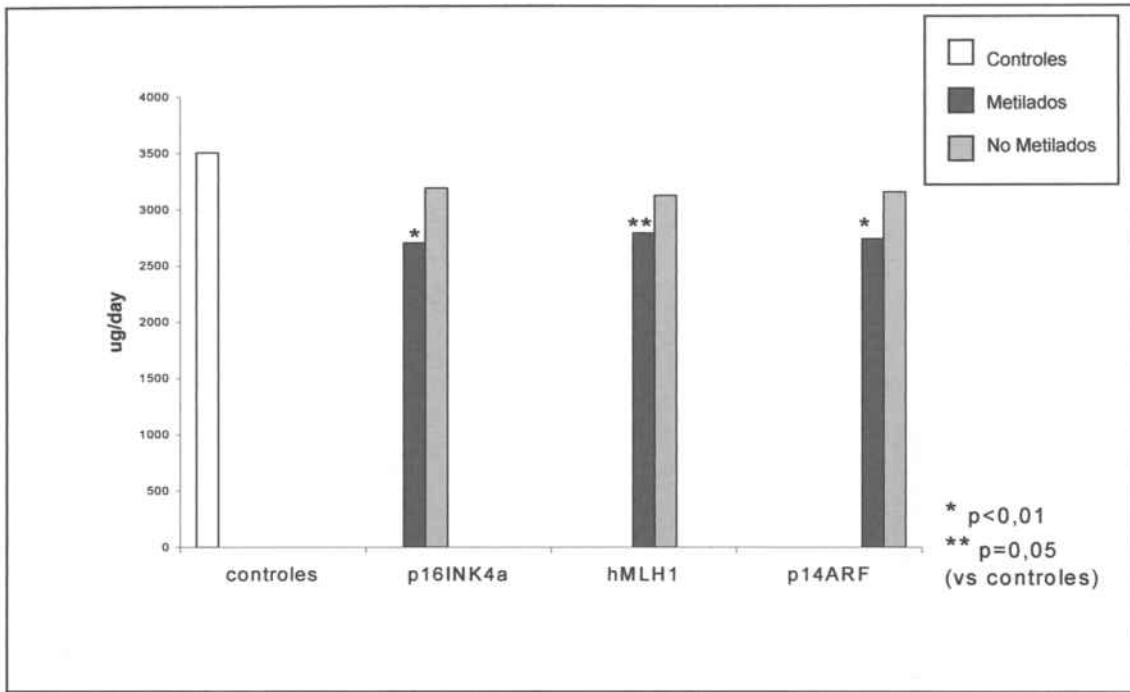


Figura 26. Consumo de vitamina A en controles y subgrupos moleculares de CRC.

En todos los subgrupos moleculares estudiados, la fibra fue un factor de protección inespecífico contra el CRC, sin llegar a discriminar entre tumores con metilación y sin metilación (**Figura 28**)

Se realizó un análisis multivariante, para analizar el riesgo de metilación en los distintos locus estudiados, ajustando por el genotipo MTHFR, consumo de folatos, consumo de energía y edad. No se obtuvieron valores significativos para ninguno de los subgrupos estudiados.

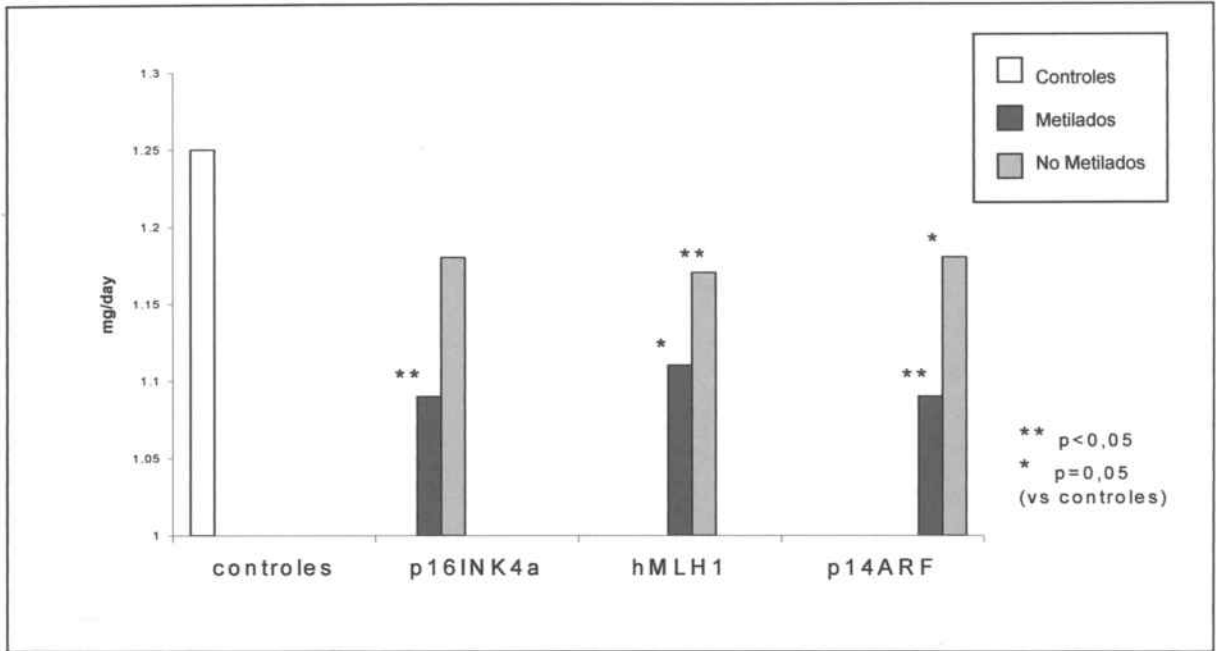


Figura 27. Consumo de vitamina B1 en controles y subgrupos moleculares de CRC.

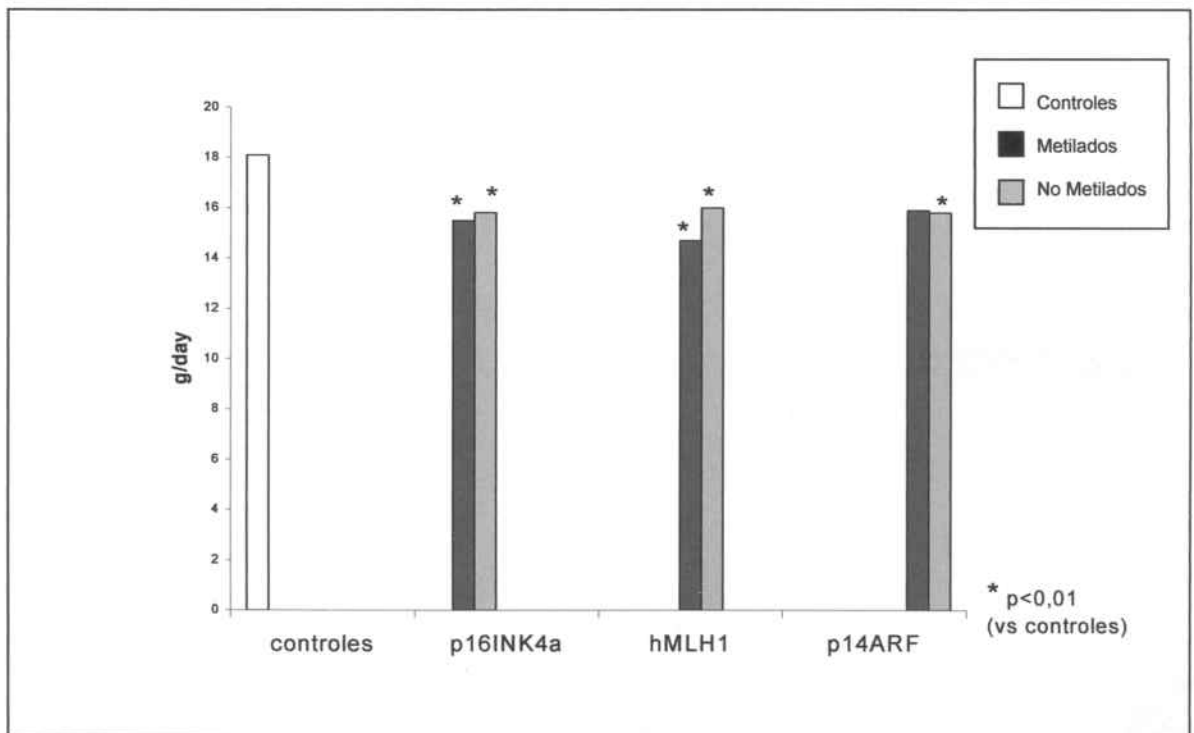


Figura 28. Consumo de fibra en controles y subgrupos moleculares CRC.

5. DISCUSIÓN



La hipermetilación del DNA es reconocida actualmente como una alteración epigenética común en una amplia variedad de cánceres¹⁴³. Esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de los patrones de metilación en tres genes supresores de tumores como p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1 y se han estudiado sus posibles asociaciones con factores nutricionales y genéticos como el polimorfismo C677T MTHFR.

Metodologicamente hay que comentar que el reclutamiento en casos y controles fue desigual en cuanto al sexo y al hábito tabaquico. Estas diferencias se deberían principalmente a que el grupo control fue reclutado en el servicio de traumatología, principalmente por intervenciones de prótesis de rodilla y otras fracturas óseas muy comunes en mujeres post-menopáusicas. Además, como es habitual en una cohorte de mujeres de edad avanzada en España, el consumo de tabaco fue inferior al de los hombres. Otra diferencia entre casos y controles es la edad, ya que el grupo control fue en promedio unos 10 años más joven. Esto puede explicarse por la propia enfermedad del CRC asociada con el envejecimiento.

Dentro del grupo de casos, se estableció un subgrupo de pacientes de los que se tuvo acceso a muestra de tejido tumoral. Este subgrupo, al que hemos llamado grupo CRC molecular, fue representativo del grupo CRC total ya que no han existido diferencias significativas en cuanto a sus características clinicopatológicas. La distribución de dichas características clinicopatológicas tumorales han sido muy similares a las descritas en otros trabajos con población española³¹⁸. Aproximadamente un 57% de los pacientes se encontraban en estadios C o D de la enfermedad y un 8% presentaban tumores clasificados como pobremente diferenciados. Además, los hombres

menores de 70 años han presentado con mayor frecuencia tumores distales (79.4% en el grupo de pacientes de CRC; 94.7% en el subgrupo molecular) mientras que las mujeres mayores de 70 años han desarrollado tumores proximales (46.5% en el grupo de CRC total y el 62.5% en el subgrupo CRC molecular).

El estudio de la metilación tumoral se llevó a cabo mediante la técnica de PCR específica de metilación, que se realizó después del tratamiento de la muestra con bisulfito sódico^{149, 296}. Este es uno de los métodos más utilizados para estudiar el estado de metilación de un loci concreto, dada su sensibilidad y especificidad^{149, 296}. Sin embargo únicamente permite estudiar una región muy concreta y relativamente pequeña y no es una técnica cuantitativa. Para mejorar estos aspectos existen otras técnicas, como la de combinar esta misma estrategia con la posterior digestión con enzimas de restricción sensibles a la metilación (COBRA)²⁹⁷, técnicas más avanzadas como el uso de "microarrays" de DNA²⁹⁶ o técnicas de "real-time" PCR²⁹⁶. En este estudio, los oligonucleotidos utilizados en la MS-PCR cubrieron las regiones del DNA, ricas en islas CpG, de las que se conoce la correlación entre su estado de metilación y la expresión del gen^{172, 174, 80}.

Las frecuencias de metilación descritas en este estudio para p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1 se encuentran dentro de los rangos presentados en otros estudios de CRC^{80, 81, 107, 172, 174}. En el caso de p16^{INK4a} hemos descrito que el 18% de tumores primarios de CRC esporádico presentaban metilación detectable en la región 5' del gen. Además hemos observado una fuerte asociación entre la metilación en p16^{INK4a} y la localización anatómica proximal del CRC. En conjunto, los tumores proximales han presentado una probabilidad 13 veces

mayor de exhibir metilación en p16^{INK4a} que las lesiones distales, observándose la mayor prevalencia en tumores cecales, lo que confirma los hallazgos previos en la literatura²⁹⁸. Nuestro estudio además también ha asociado la metilación en p16^{INK4a} con el género femenino y con una pobre diferenciación histopatológica. La metilación en p16^{INK4a} es uno de los mecanismos de inactivación más comunes de este gen en el CRC¹⁷². Su función en la regulación de pRb es de gran interés en el estudio del CRC, ya que esta es una vía molecular habitualmente alterada en tumores. Además, comparte secuencia, aunque en distinta pauta de lectura, con p14^{ARF}, otro gen supresor de tumores en este caso implicado en la regulación de p53, otra de las vías frecuentemente alterada en la carcinogénesis colorectal. Por ello el estudio conjunto del loci p16^{INK4a}/p14^{ARF} permite tener información de estas dos vías moleculares. Aunque parece que la regulación de ambos genes es independiente, es posible que existan puntos de contacto entre las vías de p53 (regulada por p14^{ARF}) y la vía de pRb (regulada por p16^{INK4a}). La metilación en p14^{ARF} la hemos observado aproximadamente en el 18% de los tumores estudiados y como en el caso de p16^{INK4a}, su distribución se ha asociado fuertemente con la localización anatómica proximal, la pobre diferenciación del tumor y con el género femenino. Además, como ya hemos comentado, la metilación en p14^{ARF} ha correlacionado positivamente con la metilación en p16^{INK4a}. Esta relación entre ambos procesos de metilación es controvertida, ya que no se ha puesto de manifiesto en todos los estudios donde se analiza el estado de metilación de ambos genes. Las divergencias entre los diferentes estudios podrían ser debidas a las diferencias en los tamaños muestrales y al tipo de población de CRC utilizados²⁹⁸⁻³⁰⁰. Si la regulación de ambos genes es

realmente independiente, esta asociación entre la metilación en ambos TSGs podría ser debida a la existencia de un fenotipo metilador real en estos tumores. El fenotipo metilador de islas CpG o CIMP se ha asociado en la mayoría de estudios con la metilación en p16^{INK4a}, y en menor medida con p14^{ARF}²⁹⁸. Este fenotipo se determina mediante el análisis de distintas secuencias de DNA frecuentemente metiladas en tumores (MNT, methylation in tumor). Habitualmente se analizan entre 4 y 6 MNTs y cuando el tumor presenta metilación en 3 o más de estos clones se define como CIMP+ alto¹⁷². Este fenotipo es el que correlaciona con la presencia de metilación en p16^{INK4a} y p14^{ARF} y en menor grado con la metilación en hMLH1 y la inestabilidad de microsatélites¹⁴⁷.

En algunos estudios la metilación en p16^{INK4a} y el fenotipo metilador en islas CpG (CIMP) se ha asociado a la inestabilidad de microsatélites (MSI)¹⁴⁷. Son muchos los estudios que explican esta relación entre ambas características por el mecanismo que predominantemente causa el MSI, la hipermetilación del promotor de hMLH1 y su consecuente represión⁷⁸. La observación de que el MSI en el CRC esporádico es mucho más común en el colon proximal versus distal y que existe una predisposición hacia mujeres de mayor edad³⁵, es muy similar a los resultados que nosotros hemos obtenido respecto al estudio de metilación en hMLH1. El 18% de tumores estudiados presentó hipermetilación en hMLH1 y esta se asoció claramente con la localización proximal, la pobre diferenciación del tumor y el género femenino. Sin embargo nosotros no hemos hallado correlación entre la metilación en p16^{INK4a} y/o p14^{ARF} con la metilación en hMLH1. La relación de MSI con CIMP se fundamenta principalmente en el análisis del fenotipo y en muchos estudios los tumores son seleccionados en

base a este fenotipo²⁹⁹. En el caso de MSI su clasificación puede variar en función del panel de microsatélites que se estudia y si bien la inactivación de hMLH1 por metilación es el mecanismo más habitual, también existen otros, como la metilación de MGMT o las alteraciones en otros genes reparadores⁴⁵. Por lo tanto, la ausencia de correlación en nuestro estudio, entre metilación en p16^{INK4a} y/o p14^{ARF} con la metilación en hMLH1, no implica que no exista relación entre MSI y CIMP, ya que nosotros no determinamos estos fenotipos. Los resultados de este estudio, en cuanto a las frecuencias de metilación y su asociación con características concretas, nos hace pensar en la existencia de un fenotipo metilador, como el definido CIMP, que operaría preferencialmente en mujeres y en colon proximal, sin especificidad de loci y que puede implicar distintas vías carcinogénicas.

Otros subtipos distintos de CRC implican mutaciones en p53 que ocurren predominantemente en el colon distal y el recto²⁹⁸. No se ha documentado una predisposición de género a las mutaciones de p53, pero es bien conocido que en el género masculino predominan los tumores en el colon distal y particularmente en el recto. Otras características moleculares descritas son las mutaciones en K-Ras, en el codón 12 y codón 13. En un estudio anterior describimos las frecuencias de estas mutaciones en CRC³¹⁶. No se encontró asociación entre las características clinicopatológicas y las mutaciones en K-Ras, del mismo modo que tampoco se hallaron en un reciente metanálisis de 2721 CRCs³⁰¹. Las mutaciones en el codón 12 y 13 de K-Ras no las hemos podido asociar a los patrones de metilación para p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1 (**Figura 28**), de modo que estos procesos parecen ocurrir de forma independiente tal y como describen otros autores^{302,303}.

Quizás las alteraciones más comunes en el CRC son las mutaciones en APC y DCC, que ocurren en elevada frecuencia (~70%) pero sin preferencia por localización anatómica o de género³⁰³. Por tanto, estas alteraciones pueden solaparse con varios mecanismos de la carcinogénesis colorectal. Además el promotor de APC es una diana común para la hipermetilación en el CRC³⁰⁴. La relación entre la metilación en p14^{ARF} y p16^{INK4a} y la edad, podría implicar una relación con el proceso del envejecimiento. Como ya se ha comentado dicho proceso se ha relacionado con una hipometilación general del genoma y una hipermetilación locus específica. Esta hipermetilación afecta a los llamados genes tipo A (ver el punto 1.3.2.), mientras que la metilación que se da exclusivamente en el tumor afecta a los genes tipo C, entre los que se encuentran p16^{INK4a} y p14^{ARF}. Las alteraciones en la metilación relacionadas con el envejecimiento podrían predisponer las células a la hipermetilación de genes importantes en el control del ciclo celular como los genes tipo C. Sería necesario el análisis de la metilación en genes tipo A y probar su correlación con la metilación en p16^{INK4a} y p14^{ARF}, tanto en tejido tumoral como en muestra de colon sano, para confirmar esta posible asociación.

Los resultados presentados plantean de nuevo la cuestión de la influencia del género femenino en el desarrollo del CRC. Una de las primeras hipótesis postula la influencia de los estrógenos y sus posibles metabolitos en la predisposición a sufrir mutaciones y en su influencia en la secreción de ácidos biliares¹². Los estrógenos, a través de su efecto en los niveles de colesterol, afectan la concentración de ácidos biliares secundarios que son tóxicos y promueven la proliferación del epitelio colónico. Los estrógenos, a través de su efecto en los niveles de colesterol, afectan la concentración de ácidos biliares

secundarios que son tóxicos y promueven la proliferación del epitelio colónico. En este sentido, en un estudio previo se analizó la posible relación de los polimorfismos en la catecol-orto-methyltransfera (COMT), responsable de la síntesis de los catecolestrógenos, con el riesgo de CRC y específicamente con el riesgo de presentar tumores colorectales con mutaciones en K-Ras, provocadas por las estructuras quinona de los metabolitos estrogénicos³³². Aprovechando estos resultados planteamos la posible relación de este genotipo con las alteraciones en la metilación basandonos tanto por la posible influencia de los estrógenos, como por la posible alteración en el pool de grupos metilos que pudiera ser común a todas las reacciones celulares de metilación. El análisis estadístico no mostró ninguna asociación entre este polimorfismo y los patrones de metilación en p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1, ni se asoció con las características clinicopatológicas que los definen.

Existen evidencias clínicas que también refuerzan una vía etiológica que opera en el colon proximal de mujeres y que implica alteraciones en los mecanismos de reparación del DNA. Por ejemplo, en familias de HNPCC las mujeres jóvenes tienen alrededor de la mitad del riesgo de desarrollar CRC que los hombres de la misma familia³⁰⁷.

La distribución anatómica y la predisposición de género encontrados en este estudio para la metilación de p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1 indican una vía molecular distinta en el CRC y proporcionan una pista importante para la etiología de estos subtipos de CRC esporádicos. La justificación del punto anatómico de división entre CRC proximal versus distal que hemos utilizado en este estudio, se basa en un estudio descriptivo de CRC con 38,931 casos que demostró una correlación entre esta subdivisión anatómica y incrementos en el

riesgo de CRC entre subgrupos étnicos y de género³⁰⁸. Se han realizado distintas propuestas para la división entre proximal versus distal que se basan en los distintos orígenes embrionarios y diferentes soportes vasculares de los segmentos distales y proximales. Cuando analizamos nuestros datos redefiniendo el CRC proximal en ángulo hepático, la asociación de la localización y el género con la metilación permanece altamente significativa. Además, la distribución anatómica del CRC y quizá la asociación a anomalías en la metilación, está influenciada por el tipo de población. España es históricamente un país de bajo riesgo de CRC en comparación con otros países europeos o con Estados Unidos. Sin embargo, en las décadas más recientes, la incidencia de CRC y la mortalidad asociada, se ha incrementado de forma importante en nuestro país, lo que parece acompañado de cambios significativos en los hábitos dietéticos⁸.

Nuestros resultados, además de ayudar a entender la etiología del CRC pretenden aportar herramientas en la monitorización clínica del CRC. La asociación de la metilación en p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1 con una pobre diferenciación del tumor puede indicar una forma más agresiva de la enfermedad, como ya se ha descrito en el caso de p16^{INK4a}, que también ha sido asociada a un peor pronóstico³⁰⁹. También se ha notado que la esperanza de vida aumenta en países occidentales y el CRC está cambiando a localizaciones proximales, preferentemente en individuos mayores, con lo que muchos tumores no podrían ser detectados con las prácticas actuales³¹⁰. Estos problemas podrían ser más exagerados en minorías poblacionales^{311, 312}.

Futuros estudios sobre la patobiología del silenciamiento por metilación en la carcinogénesis colorectal, podran ayudar a diseñar nuevas estrategias de

diagnóstico para poblaciones con mayor riesgo de estos subtipos específicos de CRC anatómicos y de género. Finalmente, hay que recordar que las aberraciones en la metilación del DNA son alteraciones potencialmente reversibles; por lo tanto, el desarrollo de fármacos con este fin pueden estar indicados en el tratamiento de pacientes concretos cuyos tumores presentan dichas alteraciones epigenéticas³¹³.

Una vez descritas las frecuencias de metilación para p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1 y estudiada la relación con las distintas características del tumor, hemos analizado la influencia que podían tener determinados factores genéticos y nutricionales en la aparición de estos fenómenos. Se conoce que los folatos pueden ser uno de los micronutrientes involucrados en el fenómeno de la metilación y dicha influencia puede ser modulada por la MTHFR. El estudio del polimorfismo C677T en este gen ha sido asociado al riesgo de CRC por distintos autores, pero estos resultados a veces son contradictorios y no se han llegado a confirmar²⁷⁶⁻²⁸⁴. Generalmente el alelo T es el que se ha asociado a un mayor riesgo de desarrollar CRC, supuestamente a través de alteraciones en la metilación (hipometilación) o alteraciones en el pool de nucleótidos y la síntesis de DNA, aunque ambas vías podrían coexistir. En nuestro trabajo el genotipo MTHFR se analizó tan solo en el subgrupo CRC molecular, ya que el objetivo planteado era estudiar la influencia de este polimorfismo en el riesgo de presentar tumores altamente metilados. El estudio del riesgo de CRC dependiente de dicho polimorfismo se está realizando en estos momentos y constituirá un estudio independiente. En relación con este objetivo, nuestra hipótesis planteaba el alelo C como alelo de riesgo, ya que al ser más activo podría favorecer un exceso de metilación aberrante “de novo”. Sin embargo no

debe descartarse el papel del alelo T en el riesgo de hipermetilación en genes supresores de tumores, ya que algunos autores relacionan una hipometilación general del genoma con una posterior hipermetilación regional^{324, 325}.

Las frecuencias genotípicas y alélicas descritas en este trabajo no han diferido significativamente de las presentadas por otros autores en poblaciones de CRC o incluso las descritas para poblaciones control de origen caucásico²⁷⁶⁻²⁸⁴. En cuanto a su posible asociación con la metilación en p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1, no se han hallado resultados significativos y en ningún caso los resultados otorgan dependencia de riesgo de metilación al alelo C.

En cuanto al análisis nutricional, hay que mencionar que el diseño del estudio no es equivalente al de un estudio dietético de riesgo de CRC, ya que este no era el objetivo del estudio ni de estudios anteriores. El proyecto inicial contemplaba un estudio molecular que incluía adicionalmente información dietética y características moleculares^{295, 316, 317, 332}. Por tanto y aprovechando la disponibilidad de estos datos, se examinaron las posibles relaciones entre micronutrientes concretos y aspectos moleculares del tumor.

Los resultados relativos al consumo de diferentes nutrientes en nuestra población²⁹⁵, representados en el **ANEXO IIa** son similares a los publicados por otros grupos españoles³¹⁸. El estudio de riesgo de CRC, asociado al consumo de micronutrientes²⁹⁵, se presenta en el **ANEXO IIb**. La asociación entre un déficit en el consumo de vitaminas E, D, B1, A, folatos, fibra, calcio y hierro y el riesgo de CRC ya habían sido descritos con anterioridad³²⁰⁻³³³. El objetivo de nuestro estudio en concreto fue conocer si el déficit de estos micronutrientes podía generar mutación en genes críticos, quizá como un paso más en la cadena de acontecimientos de la carcinogénesis colorectal.

El subgrupo de pacientes con metilación en p16^{INK4a}, mostraron deficiencias significativas respecto al grupo control en el consumo de folatos, vitamina A, vitamina B1, potasio y hierro. Los pacientes con metilación en hMLH1 presentaron deficiencias en el consumo de vitamina B1, aunque también presentaba diferencias no significativas para el consumo de vitamina A, folatos, potasio y hierro. Finalmente el grupo de pacientes con metilación en p14^{ARF} fue deficitario para el consumo de vitamina A y vitamina B1 de forma significativa, y en menor grado de potasio y hierro. En este último subgrupo los folatos no mostraron diferencias significativas, con niveles muy similares entre pacientes con y sin metilación en p14^{ARF} y respecto al grupo control. Todos los subgrupos con metilación también presentaron deficiencias en el consumo de fibra. El consumo diario de fibra ha sido asociado con la protección del CRC⁴⁵, desde los estudios pioneros de Burkitt³²⁰, sin embargo actualmente se debate el tipo de fibra que podría resultar más beneficioso. Sin embargo en nuestro estudio esta deficiencia de fibra también estuvo presente en los subgrupos sin metilación. Por lo que puede considerarse un factor de protección inespecífico, independiente del estado de metilación. Está ampliamente reconocido que una deficiencia en folatos o simplemente niveles bajos de su consumo, están relacionados con el CRC³²¹. Los folatos son los nutrientes que a priori, y según nuestra hipótesis podían tener una mayor influencia en las alteraciones en la metilación. Esta idea se vio reforzada por los resultados obtenidos para p16^{INK4a} y la tendencia observada en hMLH1. Los resultados negativos en p14^{ARF} probablemente expresan la participación en la metilación de otros factores dietéticos, especialmente aquellos que también participan en el metabolismo de los folatos, como podrían ser la vitamina B6, la

vitamina B12 o la metionina. Esta asociación entre deficiencia en el consumo de folatos y la hipermetilación del promotor de genes específicos no se ha descrito en otros trabajos, ya que la mayoría de trabajos publicados estudian el consumo de folatos dentro de la hipótesis con una hipometilación global del genoma. Nuestros resultados revelarían un punto de unión entre ambos fenómenos epigenéticos.

Entre otros micronutrientes que hemos asociado con la metilación, cabe destacar la vitamina A y la vitamina B1 o tiamina (su consumo deficitario es significativo en las tres dianas de metilación estudiadas). La vitamina A y los retinoides en general, son reguladores fisiológicos del crecimiento y la diferenciación celular y se utilizan en el tratamiento de diversas enfermedades malignas^{330, 331}; por lo tanto no es sorprendente encontrar esta vitamina entre los factores de protección del CRC. La deficiencia de vitamina A ha sido recientemente asociada con la metilación tumoral de CRBP1 (Celular Retinoid Binding Protein 1) y su silenciamiento transcripcional³³⁴. Estos resultados pueden explicarse a través de uno de los factores que regulan la metilación; el nivel de expresión del gen¹⁴⁵. Un déficit nutricional de vitamina A puede conllevar una menor expresión de su receptor, CRPB1, y por consiguiente a su hipermetilación. Sin embargo no es descartable la influencia de la vitamina A y su acción antioxidante en la regulación de la metilación. Una menor disponibilidad de antioxidantes podría favorecer un mayor ratio de mutaciones en el DNA, por lo tanto un mayor consumo del pool de nucleótidos. Esto podría implicar una demanda superior de 5-10-MetilenTHF o 10-formilTHF para la síntesis de nuevos nucleótidos, disminuyendo la cantidad de 5-metilTHF y la disponibilidad de metilos. Todo ello podría alterar el patrón de metilación

normal que resultaría en una hipometilación global que podría conllevar la posterior hipermetilación.

La vitamina B1 o tiamina, se comporta como un agente pro-proliferativo en modelos experimentales. Sin embargo por su metabolización a tiamina pirofosfatasa, el cofactor de la translocasa (implicado en la síntesis de ribosa y necesario para la replicación celular)³³², podría tener un papel opuesto, ya que dosis altas de tiamina causan una inhibición, alrededor del 35%, del crecimiento tumoral. Esto explicaría el efecto protector que se deriva de nuestros resultados. La mayoría de estudios en modelos experimentales valoran la progresión del tumor dependiente de dicha vitamina³³². El papel de las tiaminas en la síntesis de ribosas a través de la transketolasa, refuerza la idea de que una mayor síntesis de ribosas favorece la supervivencia del tumor, su resistencia a la quimioterapia y la proliferación³³⁵. Este efecto de la vitamina B1 es similar al descrito para los folatos, donde distintas concentraciones, en diferentes estadios de la carcinogénesis, dan lugar a efectos contrarios. Así pues, un déficit nutricional de vitamina B1 puede predisponer a la incidencia del CRC, al implicar alteraciones en la síntesis de ácidos nucleicos. Por el contrario un exceso, favorecería la proliferación de las lesiones ya establecidas. Los resultados de nuestro estudio reforzarían la idea de una posible asociación del consumo de tiaminas con las alteraciones en la metilación del DNA. La relación existente entre la síntesis de ácidos nucleicos y los procesos de metilación del DNA a través, principalmente, del metabolismo de los folatos, podría explicar la asociación descrita en este trabajo.

Las deficiencias en el consumo de hierro y potasio se han observado en los grupos de pacientes con metilación en p16^{INK4a}. En la mayoría de estudios

sobre el papel del hierro se le clasifica más que como un factor protección, como un factor de riesgo de CRC; esto es debido a que el hierro-hemo puede aumentar la presencia de compuestos fecales nitrosos carcinogénicos en el intestino. Sin embargo, el exceso de hierro está asociado con un mayor riesgo de tumores proximales³³³ que constituyen un grupo minoritario en nuestro estudio (38%). Es bien conocido que la célula cancerígena presenta una disminución en los niveles de potasio y que existe un menor riesgo de cáncer en pacientes con enfermedades hiperkaliémicas (p.e. Parkinson)³³⁶.

Recientemente se ha descrito el papel del potasio, entre otros, en la funcionalidad de los complejos nucleoproteicos de los telómeros, vitales para la integridad de la cromatina³³⁷. Una deficiencia en el consumo de potasio podría dar lugar a un malfuncionamiento de estos complejos. La hipermetilación de las regiones promotoras actúa inhibiendo la expresión del gen gracias a un proceso que implica el reclutamiento y la modificación de las histonas y supone una compactación de la región de DNA afectada. Esta relación de la hipermetilación con los mecanismos de modelación de la cromatina podría explicar el efecto nocivo de la deficiencia de potasio. Existen otros micronutrientes, como la vitamina B6, la vitamina B12 o la metionina, implicados en el metabolismo de los folatos, que otros estudios han asociado al CRC y a la alteración de la metilación tumoral. En nuestro trabajo no aportaron resultados significativos si bien algunos de ellos tan solo se manifiestan especialmente en situaciones de elevada ingesta de alcohol³³⁸. En nuestro estudio el alcohol no incremento la significación de las asociaciones ni se asoció al riesgo de CRC, si bien hemos de decir que el consumo de alcohol en las poblaciones estudiadas fue bajo o moderado.

Los estudios epidemiológicos y experimentales otorgan a los componentes dietéticos un papel relevante en la etiología del cáncer colorectal. Las diferencias en la dieta podrían llegar a explicar, en parte, la variabilidad geográfica en la incidencia de las neoplasias. Nuestros resultados refuerzan los datos publicados donde nutrientes específicos protegen de la carcinogénesis colorectal y aportan información novedosa respecto a su posible influencia en la aparición de alteraciones epigenéticas en tumores. Si las asociaciones observadas se confirman, estos nutrientes ayudarían a evitar el CRC a través de la prevención de la metilación del DNA. Sin embargo, dada la limitada información disponible sobre la asociación entre alteraciones genéticas y epigenéticas en tumores colorectales y la dieta, estos hallazgos deben interpretarse con cautela y utilizarse como herramientas generadoras de nuevas hipótesis.

6. CONCLUSIONES

1. Las frecuencias de metilación en los promotores de p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1 es parecida a las descritas en otras series de CRC.
2. La distribución de la metilación en p16^{INK4a} es superior en mujeres y en tumores proximales, pobremente diferenciados.
3. La distribución de la metilación en p14^{ARF} es superior en mujeres y en tumores proximales.
4. La distribución de la metilación en hMLH1 es superior en tumores proximales, pobremente diferenciados
5. Las frecuencias de los distintos genotipos del polimorfismo C677T MTHFR son parecidas a las descritas en otras series de CRC y en poblaciones caucásicas.
6. El polimorfismo C677T MTHFR no se ha relacionado con ninguna de las características clinicopatológicas contempladas en este estudio.
7. Los distintos genotipos del polimorfismo C677T MTHFR no se han asociado con los patrones de metilación en los promotores de p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1.
8. Un consumo deficitario de folatos caracteriza a los individuos con tumores con metilación aberrante p16^{INK4a}.
9. Un consumo deficitario de vitamina A caracteriza a los individuos con tumores con metilación aberrante en p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1.
10. Un consumo deficitario de vitamina B1 caracteriza a los individuos con tumores con metilación aberrante en p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1.
11. Un consumo deficitario de hierro y potasio caracteriza a los individuos con tumores con metilación aberrante en p16^{INK4a}.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Haenszel W. Cancer mortality among the foreign born in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1961; 26: 37-132.
2. Ferguson L.R., Philpott M., Karunasinghe N. Dietary and cancer prevention using antimutagens. *Toxicology* 2004; 198: 147-159.
3. World Cancer Research Foundation. Food, nutrition and the prevention of cancer; a global perspective. American Institute for cancer research 1997.
4. Slattery M.L., Curtin K.P., Edwards S.L. et al. Plant foods, fiber and rectal cancer. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 274-281.
5. Terry P., Giovannucci E., Michels K.B. et al. Fruit, vegetables, dietary fiber and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 525-533.
6. Serra Majem Ll., Ribas L., Garcia R., et al. Evaluation of the dietary intake, food consumption, energy and nutrients and the nutritional status through biochemical and anthropometric markers. Barcelona: Generalitat de Catalunya. Departament de Sanitat i Seguratat Social, 1996.
7. Agudo A., Amiano P., Barcos A. et al. Dietary intake of vegetables and fruits among adults in five regions of Spain. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition, Group of Spain. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53: 174-180.
8. Lopez-Abente G., Pollan M., Vergara A. et al. Age-period-cohort modeling of colorectal cancer incidence and mortality in Spain. *Cancer Epidemiol Biomarkers and Prev* 1997; 6: 999-1005.

9. Fernandez E., Gonzalez J.R., Maria Borrás J. et al. Trends in cancer mortality in Catalonia (1975-1998). *Med Clin* 2001; 5: 605-609.
10. Fernandez E., Gonzalez J.R., Maria Borrás J. et al. Recent decline in cancer mortality in Catalonia (Spain). A jointpoint regression analysis. *Eur J Cancer* 2001; 37: 2222-2228.
11. Eloubeidi M.A. Female Gender and other factors predictive of a limited screening flexible examination of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1634-1639.
12. Debruyne P.R. The role of bile acids in carcinogenesis. *Mut Res* 2001; 480-481: 359-369.
13. Järvinen H.J. The complex genotype-phenotype relationship in familial adenomatous polyposis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 5-8.
14. Chung D.C. The hereditary non polyposis cancer syndrome; genetics and clinical implications. *Ann Intern Med* 2003; 138: 560-570.
15. Smith G., Carey F.A., Beattie J. Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2002; 99: 9433-9438.
16. Bodmer W.F., Bailey C.J., Bodmer J. et al. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 1987; 328: 614-616.
17. Luchtnborg M. APC mutations in sporadic colorectal cancer; The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1219-1226.
18. Slattery M.L. Family history and colorectal cancer; predictors of risk. *Cancer Causes Control* 2003; 14: 879-887.

19. Crabtree M. Refining the relationship between first hits and second hits at the APC locus. *Oncogene* 2003; 22: 4257-4265.
20. Solomon E., Voss R., Hall V., et al. Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. *Nature* 1987; 828: 616-619.
21. Potter J.D. Colorectal cancer ; molecules and populations *J Natl Cancer Inst* 1999 ; 91 : 916-932.
22. Kinzler K.W., Vogelstein B. in *The Genetic Basis of Human Cancer* (eds Vogelstein B and Kinzler K.W) 538-612 (McGraw and Hill, New York 2001).
23. Brezden-Masley C. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer and colonic adenomas; Molecular basis. *Surg* 2003 ; 134 : 29-33.
24. Coleman M.G. Microsatellite instability is found in colorectal tumours with mismatch repair deficiency. *Br J Cancer* 2001; 85: 1486-1491.
25. Hawkins N.J. Sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1307-1313.
26. Jeong S.Y. Microsatellite instability and mutations in DNA mismatch repair genes in sporadic colorectal cancers. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1069-1077.
27. Mitchell R.J. Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 and colorectal cancer; a HUGE review. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 885-902.
28. Papadopoulos N., Nicolaidis N.C., Liu B., et al. Mutations in GTBP in genetically unstable cells. *Science* 1995; 368: 1915-1917.

29. Fodde R., Kuipers J., Rosenberg C., et al. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 4333-438.
30. Fishel R. Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction. *Genes Dev* 1998; 12: 2096-2101.
31. Fishel R. The selection of mismatch repair defects in hereditary nonpolyposis colorectal cancer; revising the mutator hypothesis. *Cancer Res* 2001; 61: 7369-7374.
32. Ionov Y., Peinado M.A., Malkhosyan S., et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363: 558-561.
33. Haydon A.M. Emerging pathways in colorectal cancer development. *Lancet Oncol* 2002; 3: 83-88 .
34. Thibodeau S.N., Bren G., Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-819.
35. Thibodeau S. N., French A.J., Cunningham J.M., et al. Microsatellite instability in colorectal cancer; different mutator phenotypes and the principle involvement of hMLH1. *Cancer Res* 1998; 58: 1713-1718.
36. Arnold C.N. Evaluation of microsatellite instability, hMLH1 expression and hMLH1 promoter Hypermethylation in defining the MSI phenotype in colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 73-78.
37. Kim H.C. Methylation of the hMLH1 and hMSH2 promoter in early onset sporadic colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 196-202 .

38. Deng G. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with the gene silencing with a region-specific manner in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002; 86: 574-579.
39. Jass J.R., Whitewall V.L.J., Young J. et al. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 2002; 123: 862-876.
40. Ahuja N., Mohan A.L., Li Q., et al. Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 3370-3374.
41. Hawkins N. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology* 2002; 122: 1376-1387.
42. Shin K.H., Wallinger S., Bocker T, et al. Mutational analysis of promoters of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and early onset colorectal cancer patients. *Cancer Res* 2002; 62: 38-42.
43. Boland C.R., Thibodeau S.N., Hamilton S.R., et al. Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-5257.
44. Cunningham J.M., Kim C.Y., Christensen E.R., et al. The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. *Am J Human Genet* 2001; 69:780-790.
45. Whitehall V., Walsh M.D., Young J., et al. Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterises a subset of

- colorectal cancer with low level DNA microsatellite instability. *Cancer Res* 2001; 61: 827-830.
46. Whitehall V.L. Morphological and molecular heterogeneity within microsatellite instability high colorectal cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 6011-6014.
47. Jass J.R., Walsh M.D., Barker M. et al. Distinction between familial and sporadic forms of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38: 856-866.
48. Luebeck E.G. Multistage carcinogenesis incidence of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15095-15100.
49. Weinberg R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; 81 : 323-330.
50. D'Amico M. The inhibitor of cyclin dependent kinase 4/alternative reading frame locus encoded proteins p16^{INK4a} and p14^{ARF}. *Cancer Res* 2004; 64: 4122-4130.
51. Sherr C.J. Principles of tumour suppression. *Cell* 2004; 116: 235-246.
52. Vidal A., Koff A. Cell cycle inhibitors; three families united by a common cause. *Gene* 2000; 247: 1-15.
53. Pavletich N.P. Mechanism of cyclin-dependent kinase regulation: structure of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 1999; 287: 821-828.
54. Ezhevsky S.A., Ho A., Becker-Hapak M. et al. Differential regulation of retinoblastoma tumour suppressor protein by G1 cyclin-dependent kinase complexes in vivo. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 4773-4784.

55. Ho A., Dowdy S.F. Regulation of G1 cell cycle progression by oncogenes and tumour suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 47-52.
56. Harbour J.W., Dean D.C. Corepressors and retinoblastoma protein function. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001; 254: 137-144.
57. Cory S., Adams J.S. Matters of life and death; programmed cell death at Cold Spring Harbor. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1377: R25-R44.
58. Vousden K.H., Lu X. Live or let die; the cell response to p53. *Nat Rev Genet* 2002; 2: 594-604.
59. Sherr C.J., Weber J.D. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10: 94-99.
60. Bunz F., Dutriax A., Lengauer C., et al. The induction of p21 by p53 is required for sustained G2 arrest following DNA damage. *Science* 1998; 282: 1497-1501.
61. Green D.R., Evan G.I. A matter of life and death. *Cancer Cell* 2002; 1: 19-30.
62. Seoane J., Le H.V., Massague J. Myc suppression of the p21Cip Cdk inhibitor influences the outcome of p53 response to DNA damage. *Nature* 2002; 419: 729-734.
63. Sandhu C., Peehl D.M., Slingerland J. p6^{INK4a} mediates cyclin dependent kinase 4 and 6 inhibition in senescent prostatic epithelial cell. *Cancer Res* 2000; 60: 2616-2622.
64. Gump J., Stokoe D., McCormick F. Phosphorylation of p16^{INK4a} correlates with cdk4 association. *J Biol Chem* 2003; 278: 6619-6622.

65. Krimpenfort P., Quon K.C., Mooi W. J. et al. Loss of p16^{INK4a} confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* 2001; 413: 83-86.
66. Sharpless N.E., Bardeesy N., Lee K.H. et al. Loss of p16^{INK4a} with retention of p19^{ARF} predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 2001; 413: 86-91.
67. Kamb A., Gruis N.A., Weaver-Feldhaus J. et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumour types. *Science* 1994; 264: 436-440.
68. Ruas M., Peters G. The p16^{INK4a}/CDKN2 tumour suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1378: F115-F177.
69. Sherr C.J., McCormick F. The Rb and p53 pathways in cancer. *Cancer cell* 2002; 2: 103-112.
70. Kamijo T., Zindy F., Roussel M. et al. Tumour suppression at mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 1997; 91: 649-659.
71. Larsen C.J. pRB, p53, p16^{INK4a}, senescence and malignant transformation. *Bull Cancer* 2004; 91: 399-402.
72. Dimri G.P., Itahana K., Acosta M. et al. Regulation of a senescent checkpoint response by the E2F transcription factor and p14^{ARF} tumour suppressor. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 273-285.
73. Parisi T., Pollice A., Di Cristofano A. et al. Transcriptional regulation of the human tumour suppressor p14^{ARF} by E2F1, E2F2, E2F3 and Sp1-like factors. *Biochem Biophys Res Comm* 2002; 291: 1138-1145.

74. Collins C.J., Sedivy J.M. Involvement of the INK4a/Arf locus in senescence. *Aging Cell* 2003; 2: 145-150.
75. Harfe B.D., Jinks-Robertson S. Deficient DNA mismatch repair and genetics instability. *Annu Rev Genet* 2000; 34: 359-399.
76. Sugarawa N., Paques M., Colaicovo J.E. et al. Role of *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh3 repair proteins in double strand break induced recombination. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 9214-9219.
77. Li G.M. The role of mismatch repair deficiency in DNA damage induced apoptosis. *Oncol Res* 1999; 11: 393-400.
78. Calij N., Riele H. Microsatellite instability in human cancer: a prognostic marker for chemotherapy? *Exp Cell Res* 1999; 246: 1-10.
79. Fallik D., Sabourin J.C., Borrini F. et al. Response of metastatic colorectal cancers to treatment with CPT11; implications of the mismatched base repair system. *Gastroenterol Clin Biol* 2000; 24: 917-922.
80. Jacob S., Aguado M., Fallik D. et al. The role of the DNA mismatch repair system in the cytotoxicity of the topoisomerase inhibitors to human colorectal cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 6555-6562.
81. Wheeler J.M., Bodmer W.F., Mortensen N.J. DNA mismatch repair genes and colorectal cancer. *Gut* 2000; 47: 148-153.
82. Feinberg A.P., Benjamin T. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev* 2004; 4: 143-153.

83. Feinberg A.P., Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983; 301: 89-92.
84. Jubb A.M., Bell S.M., Quirke P. Methylation and colorectal cancer. *J Pathol* 2001; 195: 111-134.
85. Robertson K.D., Wolffe A.P. DNA methylation in health and disease. *Nature Rev Genet* 2000; 1: 11-19.
86. Costello J.F., Plass C. Methylation Matters. *J Med Genet* 2001; 38: 285-303.
87. Strichman-Almashanu L.Z. A genome wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes. *Genome Res* 2002; 12: 543-554.
88. Feinberg A.P., Vogelstein B. Hypomethylation of ras oncogene in primary human cancers. *Biochem Biophys Commun* 1983; 111: 47-54.
89. De Smet C. The activation of the human MAGE-1 in tumour cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7149-7153.
90. Adorjan P. Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e21.
91. Lacobuzio-Donahoe C.A. Exploration of global gene expression patterns in pancreatic adenocarcinoma using cDNA microarrays. *Am J Pathol* 2003; 162: 1151-1162.
92. Akiyama Y., Maesawa C., Ogasawara S., et al. Cell-type-specific repression of the maspin gene is disrupted frequently by demethylation

- at the promoter region in gastrointestinal metaplasma and cancer cells. *Am J Pathol* 2003; 163: 1911-1919.
93. Cho M. Hypomethylation of the MN/CA9 promoter and upregulated MN/CA9 expression in human renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2001; 85: 563-567.
 94. Nakamura N, Takenga K. Hypomethylation of the metastasis associated S100A4 gene correlates with gene activation in human colon adenocarcinoma cell line. *Clin Exp Metastasis* 1998; 16: 471-479.
 95. Badal V. CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J Virol* 2003; 77: 6227-6234.
 96. De Capoa. DNA demethylation is directly related to tumour progression; evidence in normal, pre-malignant and malignant cells from uterine cervix samples. *Oncol Rep* 2003; 10: 545-549.
 97. Sato N. Frequent hypomethylation of multiple gene overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 4158-4166.
 98. Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2545-2550.
 99. Pao M.M. DNA methylator and mismatch repair phenotypes are not mutually exclusive in colorectal cancer cell lines. *Oncogene* 2000; 19: 943-952.

100. Kane M.F. Methylation of hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumours and mismatch repair defective human cancer cell lines. *Cancer Res* 1997; 57: 808-811.
101. Qu G.Z., Grundy P.E., Narayan A., et al. Frequent hypomethylation in Wilms tumours of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 109: 34-39.
102. Nakayama M. Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias. *Blood* 1998; 92: 4296-4307.
103. Takaguchi M., Achanzar W.E., Qu W., et al. Effects of cadmium on DNA(5-cytosine) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp Cell Res* 2003; 286: 355-365.
104. Okoji R.S., Yu R.C., Maronpot R.R., et al. Sodium arsenate administration via drinking water increases genome wide and Ha-ras DNA hypomethylation in methyl deficient C57BL/6J mice. *Carcinogenesis* 2002; 23: 777-785.
105. Li H., Minarovits J. Host cell dependent expression of latent Epstein-Barr virus genomes; regulation by DNA methylation. *Adv Cancer Res* 2003; 89: 133-156.
106. Hejimens B. A common variant of the methyltetrahydrofolireductase gene is associated with an increased risk of cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 1249-1253.
107. Poirier L.A. Folate deficiency in rats bearing the Walker tumour 256 and the Novikoff hepatoma. *Cancer Res* 1973; 33: 2109-2113.

108. Baylin S.B. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Res* 1986; 46: 2917-2922.
109. Greger V., Passarge E., Hopping W. et al. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* 1989; 83: 155-158.
110. Sakai T., Toguchida J., Ohtani N., et al. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumour suppressor gene. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 880-888.
111. Ohtani-Fujita N., Fujita T., Aoike A., et al. CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumour suppressor gene. *Oncogene* 1993; 8:1063-1067.
112. Lee S. Aberrant CpG island methylation of multiple genes in colorectal neoplasia. *Lab Invest* 2004; 84: 884-893.
113. Toyota M., Ahuja N., Ohe-Toyota M. et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8681-8686.
114. Rhee I. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002; 416: 552-556.
115. Robert M.F. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nature Genet* 2003; 33: 61-65.
116. Bachman K.E. Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of tumour suppressor gene. *Cancer Cell* 2003; 3: 89-95.
117. Clark S.J., Melki J. DNA methylation and gene silencing: which is the guilty part? *Oncogene* 2002; 21: 5380-5387.

118. Buschhausen G, Witting B., Graesmann M. et al. Chromatin structure is required to block transcription of the methylated herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1177-1181.
119. Keshet I., Lieman-Hurwitz J., Cedar H. DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* 1986; 44: 535-543.
120. Lewis J.D. Purification, sequence and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 1992; 69: 905-914.
121. Meehan R.R., Lewis J.D., Bird A.P. Characterization of the MeCP2, a vertebrate binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acid Res* 1992; 20: 5085-5092.
122. Jones P.L. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genet* 1998; 19: 187-191.
123. Wade P.A. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nature Genet* 1999; 23: 62-66.
124. Rea S. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 2000; 406: 593-599.
125. Strahl B.D, Ohba R., Cook R.G., et al. Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14967-14972.
126. Nguyen C.T. Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* 2002; 62: 6456-6461.

127. Yoder J.A., Walsh C.P., Bestor T.H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997; 13: 335-340.
128. Ahmad K., Henikoff S. Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: S16477-S16484.
129. Bannister A.J., Schneider R., Kouzarides T. Histone methylation; dynamic or static? *Cell* 2002; 109: 801-806.
130. Schofield P.N. Genomic imprinting and cancer; new paradigms in the genetics of neoplasia. *Toxicol Lett* 2001; 120: 151-160.
131. Smith J.R., Pereira Smith O.M. Replicative senescence; implications for in vitro aging and tumour suppression. *Science* 1996; 273: 63-67.
132. Dennis C. Epigenetics and disease; alteres states. *Nature* 2003; 421: 686-688.
133. Bandyopadhyay D. The emerging role of epigenetics in cellular and organismal aging. *Exp Gerontol* 2003; 38:1299-1307.
134. Hamet P. Genes of aging. *Metabolism* 2003; 52: 5-9.
135. Issa J.P., Ottaviano Y.L., Celano P. et al. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 1994; 7: 536-540.
136. Hu J.F. Allele specific histone acetylation accompanies genomic imprinting of the insulin like growth factor II receptor gene. *Endocrinol* 2000; 141: 4428-4435.
137. Issa J.P., Vertino P.M., Boehm C.D. et al. Switch from monoallelic to biallelic human IGF2 promoter methylation during aging and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11757-11762.

138. Yang I.C. De novo methylation at intronic CpG islands of Igf2r is associated with decreased expression of antisense RNA in aged mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 274: 722-726.
139. Liang G., Salem C.E., Yu M.C. et al. DNA methylation differences associated with tumour tissues identified by genome scanning analysis. *Genomics* 1998; 53: 260-268.
140. Huang T. H. M., Perry M.R., Laux D.E. Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Human Mol Genet* 1999; 8: 459-470.
141. Shiraishi M., Chuu Y.H., Sekija T. Isolation of DNA fragments associated with methylated CpG islands in human adenocarcinomas of the lung using a methylated binding column and denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2913-2918.
142. Ahuja N., Li Q., Mohan A.L. et al. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5489-5494.
143. Issa J.P., Baylin S.B., Belinsky S.A. Methylation of the estrogen receptor CpG islands in lung tumours is related to the specific type of carcinogen exposure. *Cancer Res* 1996; 56: 3655-3658.
144. Rashid A. CpG island methylation in colorectal adenomas. *Am J Pathol* 2001; 159: 1129-1135.
145. Jones P.A., Laird P.W. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999; 21: 163-167.

146. Bariol C. The relationship between DNA hypomethylation and CpG island methylation in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 2003;162, 1361-1371
147. Hawkins N., Norrie M., Cheong K., et al. CpG island methylator phenotype in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology* 2002; 122; 1376-1387.
148. van Rijnsoever M., Grieu F., Elsaleb H., et al. Characterisation of colorectal cancer showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut* 2002; 51: 797-802
149. Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S. et al. Methylation –Specific PCR; a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-9826.
150. Bird A.P. CpG rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986; 321: 209-213.
151. Toyota M., Issa J.P. CpG Island methylator phenotype in aging and cancer. *Cancer Biol* 1999; 9: 349-357.
152. Toyota M., Ho C., Ahuja N. et al. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 1999; 59: 2307-2312.
153. Suter C.M. CpG island methylation is a common finding in colorectal cancer cell lines. *Br J Cancer* 2003; 88: 413-419.
154. Dameron M., Volpert O.V., Tainsky M.A. et al. Control of angiogenesis in fibroblast by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265: 1582-1584.

155. Chen X., Mariappan S.V., Catasti P. et al. Hairpins are formed by the single DNA strands of the fragile X triplet repeats; structure and biological implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5199-5203.
156. Samowitz W.S., Slattery M.L. Transforming growth factor-beta receptor type 2 mutations and microsatellite instability in sporadic colorectal adenomas and carcinomas. *Am J Pathol* 1997; 151: 33-35.
157. Markowitz S., Wang J., Myeroff L. et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; 268: 1336-1338.
158. Rampino N., Yamamoto H., Ionov Y. et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers with microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; 275: 967-969.
159. Toyota M., Ohe-Toyota M., Ahuja N. et al. Distinct genetic profiles in colorectal tumours with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 710-715.
160. Esteller M, Herman J.G. Cancer as an epigenetic disease; DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 2002; 196: 1-7.
161. Koketsu S. Sporadic colorectal cancer in elderly people. *Hepatogastroenterol* 2003; 50: 1749-1752.
162. Greger V., Debus N., Lohmann D. et al. Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma. *Human Genet* 1994; 94: 491-496.

163. Kanai Y., Ushijima S., Hui A.M. et al The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1997; 71: 355-359.
164. Dobrovic A., Simpfendorfer D. Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 3347-3350.
165. Herman J.G., Jen J., Merlo A. et al. Hypermethylation associated inactivation indicates tumour supresor role for p15(INKB1). *Cancer Res* 1996; 56: 722-727.
166. Gerson S.L. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 296-307.
167. Nakagawachi T., Shimada Y., Harada H. et al. Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA-methyltransferase gene expression in human cancer. *Oncogene* 2003; 22: 8835-8844.
168. Nobori T. Deletions of the cyclin dependent kinase 4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; 368: 753-756.
169. Spruck C.H. p16^{INK4a} gene in uncultured tumours. *Nature* 1994; 370: 183-184.
170. Cairns P. Rates of p16 (MTS1). Mutations in primary tumours with 9p loss. *Science* 1994; 265: 415-417.
171. Reed A.L. High frequency of p16^{INK4a} inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 3630-3633.
172. Rocco J.W., Sidransky D. p16(MTS1/CDKN2/INK4a) in Cancer Progression. *Exp Cell Res* 2001; 264:42-55.

173. Bates S. p14^{ARF} links the tumour suppressors Rb and p53. *Nature* 1998; 395: 124-125.
174. Fargnoli M.C. p16^{INK4a} mutations and lack of p19^{ARF} involvement in familial melanoma kindreds. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 1202-1206.
175. Coleman A. Distinct deletions of chromosome 9p associated with melanoma versus glioma, lung cancer and leukaemia. *Cancer Res* 1994; 54: 344-348.
176. Sharpless N.E., Depinho R.A. The INK4a/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 22-30.
177. Gonzalo ML., Hayashida T., Bender CM., et al. The role of DNA methylation in expression of p19/p16 locus in human bladder cancer cell lines. *Cancer Res* 1998; 58: 1245-1252.
178. Huang J., Kuismanen S.A., Liu T. et al. MSH6 and MSH3 are rarely involved in genetic predisposition to nonpolyposic cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 1619-1623.
179. Terdiman J.P., Gum J.R., Conrad P.G. et al. Efficient detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene carriers by screening tumour microsatellite instability before germline genetic testing. *Gastroenterology* 2001; 120: 21-30.
180. Santini V., Kantarjian H.M., Issa J.P. Changes in DNA methylation in neoplasia; pathophysiology and therapeutics implications. *Ann Int Med* 2001; 134: 573-586.
181. Piskala A. Sorm F. Nucleic acids components and their analogues. Synthesis of 1-glycosalil derivatives of 5-azauracil and 5-azacytosine. *Chem Commun* 1964; 29: 2060-2076.

182. Pliml J., Sorm F. Synthesis of 2'-deoxy-D-ribofuranosyl-5-azacytosine. *Chem Commun* 1964; 29: 2576-2577.
183. Lubbert M. DNA methylation inhibitors in the treatment of leukemias, myelodysplastic syndromes and hemoglobinopathies: clinical results and possible mechanism of action. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 249: 135-164.
184. Juttermann J., Li E., Jaenisch R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11797-11801.
185. Lin K.T., Momparler R.L., Rivard G.E. High performance liquid chromatographic analysis of chemical stability of 5-aza-2'-deoxycytidine. *J Pharmacol Sci* 1981; 70: 1228-1232.
186. D'Incalci M., Covey J.M., Zaharko D.S. et al. DNA alkali-labile sites induced by incorporation of 5-aza-2'-deoxycytidine into DNA of mouse leukaemia L1210 cells. *Cancer Res* 1985; 45: 3197-3202.
187. Bender C.M., Pao M.M., Jones P.A. Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumour cell lines. *Cancer Res* 1998; 58: 95-101.
188. Attadia V. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on differentiation and oncogene expression in the human monoblastic leukaemia cell line U-937. *Leukemia* 1993; 7: S9-S16.
189. Momparler R.L., Samson J., Momparler L.F. et al. Cell cycle effects and cellular pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Chemother Pharmacol* 1984; 13: 191-194.

190. Crooke S.T. Potential roles of antisense technology in cancer chemotherapy. *Oncogene* 2000; 19: 6651-6659.
191. MacLeod A.R., Szyf M. Expression of antisense to DNA methyltransferase mRNA induces DNA demethylation and inhibits tumorigenesis. *J Biol Chem* 1995; 270: 8037-8043.
192. Goffin J., Eisenhauer E. DNA methyltransferases inhibitors. State of the art. *Ann Oncol* 2002; 13: 1699-1716.
193. Kantharidis P., El Osta A., deSilva M. et al. Altered methylation of the human MDR1 promoter is associated with acquired multidrug resistance. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 2025-2032.
194. Gaufet F. Induction of tumours in mice by genomic hypomethylation. *Science* 2003; 300: 489-492.
195. Uu P. Regulation of an endogenous locus using a panel of designed zinc finger proteins targeted to accessible chromatin regions. Activation of vascular endothelial growth. *J Biol Chem* 2001; 276: 11323-11334.
196. Fischle W., Kiemer V., Daquiedt F. et al. The emergency role of class II histone deacetylase. *Biochem Cell Biol* 2001; 79: 337-348.
197. Weldle U.H., Grossmann A. Inhibition of histone deacetylases a new strategy to target epigenetic modification for anticancer treatment. *Anticancer Res* 2000; 20: 1471-1485.
198. Gottficher M. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 2001; 20: 6969-6978.

199. Korretsu Y. Cyclic hydroxamic acid containing peptide 31, a potent synthetic histone deacetylase inhibitors with antitumour activity. *Cancer Res* 2001; 61: 4459-4466.
200. Furumai R. Potent HDAC inhibitors built from trichostatin A and cyclic therapeutics antibiotics including tapoxin. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 87-92.
201. Zhang Y., Reinberg D. Transcription regulation of histone methylation interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 2001; 15: 2343-2350.
202. Cameron E.E., Bachman K.E., Myohanen S. et al. Synergy of demethylation and histone deacetylases inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature Genet* 1999; 21: 103-107.
203. Armstrong B., Doll R. Environmental factors and cancer incidence in different countries, with special reference to dietary practice. *Int J Cancer* 1975; 15: 617-631.
204. Doll R., Peto R. The causes of cancer; quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66: 1291-1308..
205. Bingham S.A., Day N.E., Luben R. et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition; an observational study. *Lancet* 2003; 1496-1501.

206. Boutron M.C., Senesse P., Meance S. et al. Energy intake, body mass index, physical activity and the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nutr Cancer* 2001; 39: 50-57.
207. Faivre J., Boutron J.M., Hillton B. et al. Epidemiology of colorectal cancer In : Diet and human carcinogenesis (Joosens J., Hill M., Geboers J., eds), pp 123-136. *Experta Medica*, Amsterdam , The Netherlands 1999.
208. Giovannucci E., Stampfer M.J., Colditz G. et al. Epidemiologic studies of folate in colorectal neoplasia. *J Nutr* 2002; 132: 2350S-2355S.
209. Giovannucci E., Rimm E.B., Stampfer M.J. et al. Intake of fat, meat and fiber in relation to risk of colon cancer in man. *Cancer Res* 1994; 54: 2390-2397.
210. Alberts D.S., Martinez M.E., Roe D.J. et al. Lack of effect of a high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. *N Engl J Med* 2000; 342: 1156-1162.
211. Schatzkin A., Lanza E., Corle D. et al. Lack of effect of low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. *N Engl J Med* 2000; 342: 1149-1155.
212. Ommen G.S., Goodman G.E., Thormquist M.D. et al. Effects of combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996; 334: 1150-1155.
213. The ATBC cancer prevention study group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med* 1994; 330: 1029-1035.

214. Kim Y.I. Folate and carcinogenesis; Evidence, mechanisms and implications. *J Nutr Biochem* 1999; 10: 66-88.
215. Fenech M., Fergusson L.R. Vitamins/minerals and genomic stability in humans. *Mutat Res* 2001; 475: 1-6.
216. Ames B.N. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutat Res* 2001; 475: 7-20.
217. Halliwell B. Vitamin C and genomic stability. *Mutat Res* 2001; 475: 29-35.
218. Claycombe K.J., Meydani S.N. Vitamin E and genome stability. *Mutat Res* 2001; 475: 37-44.
219. Chatterjee M. Vitamin D and genomic stability. *Mutat Res* 2001; 475: 69-87.
220. Hartwing A. Role of magnesium in genomic stability. *Mutat Res* 2001; 475: 113-121.
221. De Freitas J.M., Meneghini R. Iron and its sensitive balance in the cell. *Mutat Res* 2001; 475: 153-159.
222. Collins A.R. Carotenoids and genomic stability. *Mutat Res* 2001; 475: 21-28.
223. Fenech M., Airtken C., Rinaldi J. Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults. *Carcinogenesis* 2000; 19: 1163-1171.
224. Wallwork J.C., Duene J.A. Effect of zinc deficiency on methionine metabolism, methylation reactions and protein synthesis in isolated perfused rat liver. *J Nutr* 1985; 115: 252-262.
225. Dreosti I.E. Zinc and the gene. *Mutat Res* 2001; 475: 161-167.

226. Davis C.D., Ulthus E.O. Finley J.W. Dietary selenium and arsenic affect DNA methylation in vitro in Caco-2 cells and in vivo rat liver and colon. *J Nutr* 2000; 130: 2903-2909.
227. E-Bayoumy K. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutat Res* 2001; 475: 123-139.
228. Piyathilake C.J., Bell W.C., Johanning G.L. et al. The accumulation of ascorbic acid by squamous cell carcinoma of the lung and larynx is associated with global methylation of DNA. *Cancer* 2000; 89: 171-176.
229. Zardo G., Caiafa P. The unmethylated state of CpG islands in mouse fibroblast depends on the poly(ADPribose)lilation polymerase-1 proces. *J Biol Chem* 1998; 272: 165517-16520.
230. Hageman G.J., Stierum R.H. Niacin poly(ADPribose)lilation polymerase-1 and genomic stability. *Mutat Res* 2001; 475: 45-46.
231. The Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine ans risk of ischemic heart diseases and stroke; a meta-analysis. *J Am Med Assoc* 2002; 2015-2022.
232. Berry R.J., Li Z., Erickson J.D. et al. Prevention of neural tube defects with folic acid in China. *N Engl J Med* 1999; 341: 1485-1490.
233. Vollset S.E., Refsum H., Irgens L.M. et al. Plasma total homocysteine, pregnancy complications and adverse pregnancy outcome; the Hordalan Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 962-968.

234. George L., Mills J.L., Johansson A.L. et al. Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. *J Am Med Assoc* 2002; 288: 1867-1873.
235. Seshadri S., Beiser A., Selhub J. et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 476-483.
236. U.S. Food and Drug administration. Food standards; amendment of standards of identity for enrich grain products to require addition of folic acid. Final Rule. 21 CFR Parts 136, 137 and 139. *Fed Regist* 61: 8781-8807. 1996.
237. Health Canda. Regulations amending the Food and Drug Regulations 1066. *Canada Gazzete* 1997, Part 1. 131: 3702-3737.
238. Choi S.W., Mason J.B. Folate status: effects on pathways of colorectal tumourogenesis. *J Nutr* 2002; 132: 2413S-2418S.
239. Scott J., Weir D. Folate/vitamin B12 interrelationship. *Essays in biochemistry* (vol 28). London: Portland Press; 1994. p.36-72.
240. Gregory J. The bioavailability of folate. In: Bailey L., ed. *Folate in health and disease*. New York: Marcel Dekker; 1995: p. 195-235.
241. Selhub J., D'Angelo A. Relationship between homocysteine and thrombotic diseases. *Am J Med Sci* 1998; 316: 129-141.
242. Henderson G. Transport of folate compounds into cells. In: Blakely R., Whitehead V., ed. *Folate and pterins: nutritional, pharmacological and physiological aspects* (vol 3). New York: John Wiley and Sons; 1986. p 207-250.

243. Scott J. Wier D. Folic acid, homocysteine and one carbon metabolism; a review of the essential biochemistry. *J Cardiovasc Risk* 1998; 3: 223-227.
244. Wagner C., Briggs W., Cook R. Inhibition of glycine N-methyltransferase by folate derivatives: implications for regulation of methyl group metabolism. *Biochem Biophys Res Comm* 1985; 127: 746-752.
245. Kutsbach C., Stokstad E. Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochem Biophys Acta* 1971; 250: 459-477.
246. Finkelstein J. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990; 1: 228-237.
247. Bailey L.B., Rampersaud G.C. Kauwell G.P. Folic acid supplements and fortification affect the risk for neural tube defects, vascular disease and cancer: evolving science. *J Nutr* 2003; 133: 1961S-1968S.
248. Giovanucci E. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia a review. *J Nutr* 2002; 132: 2350S-2355S.
249. Hillman R.S., Steinberg S.E. The effects of alcohol on folate metabolism. *Annu Rev Med* 1982; 33: 345-355.
250. Cravo M., Fidalgo P., Pereira A. D. et al. DNA methylation as a intermediate biomarker in colorectal cancer modulation by folic acid supplementation. *Eur J Cancer Prev* 1994; 3: 473-479.
251. Cravo M., Pinto A. G., Chaves P. et al. Effect of folate supplementation on DNA methylation of rectal mucosa in patients

- with colonic adenomas; correlation with nutrient intake. *Clin Nutr* 1998; 17: 45-49.
252. Paspatis A.G., Karamanolis D.G. Folate supplementation and adenomatous colonic polyps. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 1340-1341.
253. Kim Y.I., Baik H.W., Fawaz K. et al. Effects of folate supplementation on two provisional molecular markers of colon cancer: a prospective randomized trial. *Gastroenterol* 2001; 96: 184-195.
254. Khosraviani K., Weir H.P., Hamilton P. et al. Effects of folate supplementation on mucosal cell proliferation in high risk patients for colon cancer. *Gut* 2002; 51: 195-199.
255. Cravo M., Gloria L., Salazar de Sousa L. et al. Folate status, DNA methylation and colon cancer risk in inflammatory bowel disease. *Clin Nutr* 1995; 14: 50-53.
256. Boland C.R. Molecular genetics of hereditary non-poliposys colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 910: 50-59.
257. Brentnall T.A., Crispin D.A., Bronner C.E. et al. Microsatellite instability in nonneoplastic mucosa from patients with chronic ulcerative colitis. *Cancer Res* 1996; 56: 1237-1240.
258. Cravo M. L., Albuquerque C.M., Salazar de Sousa L. et al. Microsatellite instability in nonneoplastic mucosa of patients with ulcerative colitis; effect of folate supplementation. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2060-2064.
259. Bostick R.M., Fosdick L., Grandits G.A. et al. Colorectal epithelial cell proliferative kinetics and risk factors for colon cancer in sporadic

- adenoma patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 1011-1019.
260. Wickramasinghe S., Fida S. Missincorporation of uracil into the DNA folate and B12 deficient HL60 cells. *Eur J Haematol* 1993; 50: 127-132.
261. James S., Miller B., Basnakian A. et al. Apoptosis and proliferation under conditions of deoxynucleotide pool imbalance in liver of folate/methyl deficient rats. *Carcinogenesis* 1997; 18: 287-293.
262. Kim Y., Mason J. Folate, epithelial dysplasia and colon cancer. *Proc Assoc Am Physicians* 1995; 107: 218-227.
263. Feinberg A., Vogelstein B. Hypomethylation of ras oncogene in primary human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 111: 47-54.
264. Sharrard R., Royds J., Rogers S. et al. Patterns of methylation of the c-myc gene in human colorectal cancer progression. *Br J Cancer* 1992; 65: 667-672.
265. Kim I., Pogribny I, Basnakin A. et al. Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within p53 tumour suppressor gene. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 46-52.
266. Kim Y.I., Shirwadkar S., Choi S-W. et al. Effects of dietary folate on DNA strand breaks within mutations-prone exons of the p53 gene in the rat colon. *Gastroenterology* 2000; 119: 151-161.
267. Kubbutat M.H.G., Vousden K.H. Keeping an old friend under control; regulation of p53 stability. *Mol Med Today* 1998; 250-256.

268. Leks J., Bird A. DNA methylation and chromatin structure. *FEBS Lett* 1991; 285: 155-159.
269. Frosst P., Blom H.J., Milos R. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease; a common mutations in methylenetetrahydrofolic reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-113.
270. Kang S.S., Wong P.W. Genetic and non-genetic factors for moderate hyperhomocysteinemia. *Atherosclerosis* 1996; 119: 135-138.
271. Matthews R.G., Sheppard C., Goulding C. Methylenetetrahydrofolic reductase and methionine synthase: biochemistry and molecular biology. *Eur J Pediatr* 1998; 157(suppl 2); S54-S59.
272. Franco R.F., Araujo A.G., Guerreiro J.F. et al. Analysis of the C677T mutations of the MTHFR gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost* 1998; 79: 119-121.
273. Abbate R., Sardi I., Pepe G. et al. The high prevalence of thermolabile MTHFR in italians is not associated to an increased risk for coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1998; 79: 727-730.
274. Gudnason V., Stansbie D., Scott J. et al. C677T MTHFR; its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. *Atherosclerosis* 1998;136: 347-354.
275. Brattstrom L., Wilchen D.E.I., Ohrvik J. et al. Common methylenetetrahydrofolic reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease-the results of a meta-analysis. *Circulation* 1998; 98: 2520-2526.

276. Chen J., Giovanucci E., Kelsey K. et al. A Methylenetetrahydrofolic reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 4862-4864.
277. Esteller M., Garcia A., Martinez-Palones J. et al. Germ line polymorphisms in cytochrome P450 1A1 and Methylenetetrahydrofolic reductase polymorphism and endometrial cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 1997; 18: 2307-2311.
278. Ma J., Stampfer M., Giovanucci E. Methylenetetrahydrofolic reductase polymorphism, dietary interactions and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 1098-1102.
279. Chen J., Giovanucci E., Hankinson S. et al. A prospective study of Methylenetetrahydrofolic reductase and methionine synthase gene polymorphisms and risk of colorectal adenoma. *Carcinogenesis* 1998; 19: 2129-2132.
280. Slattery M., Potter J., Samowitz W. et al. Methylenetetrahydrofolic reductase, diet and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 513-518.
281. Ulrich C., Kampmann E., Bigler J. et al. Colorectal adenomas and the C677T MTHFR polymorphism; evidence for gene-environment interaction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 659-668.
282. Ulrich C., Kampmann E., Bigler J. et al. Lack of association between the C677T MTHFR polymorphism and colorectal hyperplastic polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 427-433.

283. Marugame T., Tsuji E., Inoue H. et al. Methylenetetrahydrofolic reductase polymorphism and the risk of colorectal adenoma. *Cancer Lett* 2000; 151: 181-186.
284. Ryan B., Molloy A., McManus R. et al. The Methylenetetrahydrofolic reductase C677T polymorphic genotype is a risk factor for colorectal cancer. *J Lab Clin Med* 2001; 138: 164-176
285. Ma J, Stampfer M., Selhub J. et al. Methylenetetrahydrofolic reductase polymorphisms, plasma folate, homocysteine and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 1996; 94: 2410-2416.
286. Molloy A., Daly S., Mills J. et al. Thermolabile variant of the 5-10-Methylenetetrahydrofolic reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. *Lancet* 1997; 349: 1591-1593.
287. Djurhuus D., Svardal A., Mansoor M. et al. Modulation of glutathione content and the effect on methionine auxotrophy and cellular distribution of homocysteine and cysteine in mouse cell lines. *Carcinogenesis* 1991; 12: 241-247.
288. Hoffman R., Methioninase: a therapeutic for diseases related to altered methionine metabolism and transmethylaton ; cancer, heart disease, obesity, aging and Parkinson's disease. *Human Cell* 1997; 10: 69-80.
289. Pereira P., Santon V., Jothy S. et al. Loss of heterozygosity of Methylenetetrahydrofolic reductase in colon carcinomas. *Oncol Rep* 1999; 6: 597-599.

290. Martin-Moreno J.M., Boyle P., Gorjogo L., et al. Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain. *Int J Epidemiol* 1993; 22: 512-519.
291. Aguilar M.: *Dietetica: un programa para la nutrición, versión 2.0*; CONAYCITE. Madrid, 1991.
292. Andujar M.M., Moreiras-Varela O., Gil F.: *Tablas de Composición de alimentos*. Instituto de Nutrición (CSIC). Madrid 1987.
293. Jimenez A., Cervera P. *Tabla de composición de alimentos*. Laboratorios Wander. Barcelona 1988.
294. Andujar M.M., Moreiras-Varela O., Gil F.: *Tablas de Composición de alimentos*. Instituto de Nutrición y Bromatología (CSIC). Madrid 1990.
295. Laso N., Mas S., Lafuente M.J. et al. Decrease in specific micronutrient intake in colorectal cancer patients with tumors presenting k-Ras mutation. *Anticancer Res* 2004; 24: 2011-2020.
296. Fraga M.F. DNA methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques* 2002; 33: 636-649.
297. Xieng Z., Laird P.W. COBRA; a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acid Res* 1997; 25: 2532-2534.
298. Wynter C.V. Methylation patterns define two types of hyperplastic polyps associated with colorectal cancer. *Gut* 2004; 53: 573-580.
299. Pufulete M. Folate status, genomic DNA hypomethylation, and risk of colorectal cancer; a case control study. *Gastroenterology* 2003; 124: 1240-1248.

300. Breivick J., Loth R.A., Melin et al. Different genetic pathways to proximal and distal colorectal cancer influenced by sex-related factors. *Int J Cancer* 1997; 74: 664-669.
301. Andreyev, H.J.N., Norman A.R., Cunningham D., et al. Ras mutation in patients with colorectal cancer; the multicenter RASCAL study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 675-684.
302. O'Brien M.J. Hyperplastic serrated polyps of the colorectum; relationship of CpG island methylator phenotype and k-ras mutation to location and histologic subtype. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 423-434.
303. Gryfe R., Swallow C., Bapat B. et al. Molecular biology of the colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 1997; 21: 233-300.
304. Hiltunen M.O., Alhonen L., Koostinaho J. et al. Hypermethylation of the APC gene promoter region in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 1997; 70:644-648.
305. McMichael A.J. and Potter J.D. Do intrinsic sex differences in lower alimentary tract physiology influence the sex-specific risks for bowel cancer and other biliary and intestinal diseases? *Am J Epidemiol* 1983; 118:620-627.
306. Slattery M.L., Potter J.D., Coates A. et al. Plant foods and colorectal cancer; an asesment of specific foods and their related nutrients. *Cancer Causes Control* 1997; 8: 575-590.
307. Gaglia P., Atkin W.S., Whitelaw S. et al. Variables associated with the risk of colorectal adenomas in asymptomatic patients with a family history of colorectal cancer. *Gut* 1995; 36: 385-390.

308. Nelson R.L., Dollear T., Freels S. and Persky V. The relation age.race.gender to the subsite localitation of colorectal carcinoma. *Cancer* 1997; 801: 193-197.
309. Esteller M., Gonzalez S., Risques R.A. et al. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 299-304.
310. Cooper G.S., Yuan Z., Landfeld C.S et al. A national population-based study of incidence of colorectal cancer and age. Implications for screening older Americans. *Cancer* 1995; 75: 775-781.
311. Dermers R.Y., Severson R.K. , Shottenfeld D. et al. Incidence of colorectal adenocarcinoma by anatomic subsite; an epidemiologic study of time trends and racil differences in the Detroit Michigan area. *Cancer* 1997; 79: 441-447.
312. Chao A., Gilliland F., Hunt W.C. et al. Increasing incidence of colon and rectal cancer among Hispanics and Indian American in New Mexico, 1969-1994. *Cancer Causes Control* 1998; 9: 137-144.
313. Zingg J.M. and Jones P.A. DNA methylation as a target for drug design. *Pharm Res* 1998;15: 175-187.
314. Van Engeland M., Weijenberg M.P., Roemen G.M. et al. Effects of dietary folate and alcohol intake on Promoter Methylation in Sporadic Colorectal Cancer: The Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 3133-3137.
315. Warnecke P.M., Bestor T.H. Cytosine Methylation and human cancer. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 68-73.

316. Lafuente M.J., Casterad X., Trias M. et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase-dependent risk for colorectal cancer and its association with the presence of k-ras mutations in tumours. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1813-1819.
317. Laso N., Lafuente M.J., Mas S. et al Glutatgione S-transferse (GSTM1 and GSTT1)-dependent risk for colorectal cancer. *Anticancer Res* 2002; 22: 3399-3404.
318. Benito E., Stiggelbout A., Bosch F.X., et al. Nutritional factors in colorectal cancer risk: a case-control study in Majorca. *Int J Cancer* 1991; 49: 161-167.
319. Harris P.J., Fergusson L.R. Dietary fibres may protect or enhance carcinogenesis. *Mutat Res* 1999; 443: 95-110.
320. Burkit D.S. Related disease-related cause?. *Lancet* 1969; 2: 1229-1231.
321. La Vecchia C., Negri E., Pelucchi C., et al. Dietary folate and colorectal cancer. *Int J Cancer* 2002;102: 545-547.
322. Lipkin M., Newmark H. Calcium and the prevention of colon cancer. *J Cell Biochem* 1995; (Supp) 22: 65-73.
323. Giovannucci E. Diet, body weight and colorectal cancer: a summary of the epidemiologic evidence. *J Women's Health* 2003; 12: 173-182.
324. Pritchard R.S., Baron J.A., Gerhardsson de Verdier M. Dietary calcium, vitamin D, and the risk of colorectal cancer in Stockholm, Sweden. *Cancer Epidemiol Biomar* 1996; 5: 897-900.
325. Garland C., Garland F.C. Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int J Epidemiol* 1979; 27:155.



326. Giovannucci E., Stampfer M.J., Colditz G.A., et al. Multivitamin use, folate and colon cancer in women in the Nurses' Health study. *Ann Intern Med* 1998; 129: 517-524.
327. Jedrychowski W., Steindorf K., Popiela T., et al. Alcohol consumption and the risk of colorectal cancer at low levels of micronutrient intake. *Med Sci Monit* 2002; 8: 357-363.
328. Ames B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 1983; 221: 1256-1263.
329. Bostick R.M., Potter J.D., McKenzie D.R., et al. Reduced risk of colon cancer with high intake of vitamin E ; the Iowa Women's Health Study. *Cancer Res* 1993; 53: 4230-4237.
330. Roninson I.B., Dokmanovic M. Induction of senescence-associated growth inhibitors in the tumour-suppressive function of retinoids. *J Cell Biochem* 2003; 88: 83-94.
331. Altucci L., Gronemeyer H. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 181-193.
332. Mas S., Laso N., Lafuente M.J. et al. Cancer, genes and catechol estrogen metabolites. *Int J Clin Oncol* 2003; 8: 65-66.
333. Wurzelmann J.L., Silver A., Schreinemachers D.M. et al. Iron intake and the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidem Biomar* 1996; 5: 503-507.
334. Esteller M. Hypermethylation-associated inactivation of the Cellular Retinol Binding Protein 1 Gene in human cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 5902-5905.

335. Cascante M. Role of thiamine and transketolase in tumour cell proliferation. *Nutr Cancer* 2000; 36: 150-154.
336. Jansson B. Potassium, Sodium and Cancer: a review. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1996; 15: 65-73.
337. Fletcher T.M. Telomere higher-order structure and genomic instability. *IUBMB Life* 2003; 55: 442-449.
338. Jedrychowski W., Steindorf K., Popiela T. et al. Risk of colorectal cancer from alcohol consumption at lower vitamin intakes. A hospital based case-control study in Poland. *Epidemiol Prev Med* 2001; 16: 213-222.

8. ANEXO

ANEXO I. CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS. Martin-Moreno y cols (Versión reducida, 1994)

I - LACTEOS

ALIMENTOS - CANTIDADES	Uso promedio anual				
	NUNCA	AÑO	MES	SEMA.	DIA
1- Leche entera (1 taza, 200 cc)					
2- Leche descremada (1 taza, 200 cc)					
3- Yogurt (1, 125 grs)					
4- Queso en porciones o cremoso (1, porción)					
5- Otros quesos: curados ó semicurados (50 grs)					
6- Otros productos lácteos: natillas, flan, puding, cuajada ó helados de leche (1 taza, 200 cc)					

II - HUEVOS, CARNES, PESCADOS

(Un plato o ración de 110 grs excepto, cuando se indica)

ALIMENTOS - CANTIDADES	Uso promedio anual				
	NUNCA	AÑO	MES	SEMA.	DIA
1- Huevos de gallina (uno)					
2- Pollo o pavo (1 ración o pieza)					
3- Carnes: de ternera o vaca, de cerdo, ó de cordero (1 plato)					
4- Otros productos cárnicos: jamón serrano, jamón York, chorizo, salchichón, mortadela, salchichas, sobrasada, hamburguesa (50 grs)					
5- Hígado y otras vísceras (riñones, sesos, corazón, mollejas) (1 plato)					
6- Pescado blanco: pescadilla, merluza, besugo, mero, ... (1 plato, pieza o ración)					
7- Pescado azul: sardinas, atún, bonito, caballa, salmón, (1 plato o ración 130 grs)					
8- Pescados salados y/o ahumados: bacalao, arenques, ... (1 ración, 60 grs en seco)					
9- Moluscos y crustáceos: almejas, mejillones, gambas, langostino, pulpo, calamares, ... (1 ración)					

III - VERDURAS Y HORTALIZAS

(Un plato o ración de 250 grs, excepto cuando se indica)

ALIMENTOS - CANTIDADES	Uso promedio anual				
	NUNCA	AÑO	MES	SEMA.	DIA
1- Lechuga, endivias, escarola, acelgas, ó espinacas					
2- Col, coliflor, ó brocoles					
3- Tomate crudo (1, 150 grs)					
4- Judias verdes					
5- Berenjenas, calabacines, pepinos, zanahoria, calabaza, ó pimientos					
6- Patatas asadas ó cocidas (1 ración, 150 grs)					
7- Patatas fritas (caseras, de bolsa (1 ración, 150 grs)					
8- Champiñones, setas ó niscalos					
9- Gazpacho Andaluz (1 vaso, 200 grs)					

IV - FRUTAS

ALIMENTOS - CANTIDADES	Uso promedio anual				
	NUNCA	AÑO	MES	SEMA.	DIA
1- Naranja, pomelo (una), ó mandarina (dos)					
2- Plátano (uno)					
3- Manzana, pera, melocotón, albaricoque, ó nectarina (una)					
4- Fresas/fresones, cerezas, ó picotas (1 plato de postre)					
5- Sandía, ó melón (1 cala, 200-250 grs)					
6- Frutas en conserva -en almíbar ó en su jugo- (2 unidades)					
7- Frutos secos: dátiles, higos secos, uvas pasas, ó ciruelas pasas (150 grs)					
8- Otros frutos secos: cacahuetes, castañas, avellanas, almendras,... (50 grs)					
9- Aceitunas (10 unidades)					

V - LEGUMBRES Y CEREALES

ALIMENTOS - CANTIDADES	Uso promedio anual				
	NUNCA	AÑO	MES	SEMA.	DIA
1- Lentejas, garbanzos, alubias, ó guisantes (1 plato, 60 grs en seco)					
2- Pan blanco (3 rodajas, 60 grs)					
3- Pan negro integral (3 rodajas, 60 grs)					
4- Cereales desayuno (30 grs en seco)					
5- Arroz blanco (60 grs en seco)					
6- Pasta: fideos, macarrones, espaguetis,... (60 grs en seco)					



VI - ACEITES Y GRASAS

(Una cucharada)

ALIMENTOS - CANTIDADES	Uso promedio anual				
	NUNCA	AÑO	MES	SEMA.	DIA
1- Aceite de oliva					
2- Aceite de maíz					
3- Aceite de girasol					
4- Aceite de soja					
5- Mezcla de los anteriores (por favor, especifique en espacio abierto)					
6- Margarina					
7- Mantequilla, manteca					

VII - BOLLERIA Y PASTELERIA

ALIMENTOS - CANTIDADES	Uso promedio anual				
	NUNCA	AÑO	MES	SEMA.	DIA
1- Galletas (tipo maría, de chocolate) (4-6 unidades, 50 grs)					
2- Magdalenas, ensaimada, donuts, croissant, ... (uno, 50 grs)					
3- Pasteles (uno, 50 grs)					
4- Churros, porras y similares (1 ración, 100 grs)					
5- Chocolate: en polvo, bombones (30 grs)					
6- Pastas, mantecados, mazapán (1 ración, 90 grs)					

VIII - BEBIDAS

ALIMENTOS - CANTIDADES	Uso promedio anual				
	NUNCA	AÑO	MES	SEMA.	DIA
1- Vino blanco, tinto, rosado (1 vaso, 100 cc)					
2- Vino dulce (1 copa, 50 cc)					
3- Cerveza (1 jarra, 330 cc)					
4- Licores o anisetes (1 copa, 50 cc)					
5- Destilados: whisky, ginebra, coñac,... (1 copa, 50 cc)					
6- Bebidas carbonadas (Casera, Coca-cola, Fanta, ...) (1 botella, 200 cc)					
7- Zumos naturales de frutas (1 vaso, 200 cc)					
8- Zumos de frutas en botella o enlatados (200 cc)					
9- Horchata (1 vaso, 200 cc)					
10- Café (1 taza, 50 cc)					
11- Otros: EKO, Nescafé descaf.,... (1 taza, 50 cc)					

IX - PRECOCINADOS O PREELABORADOS

ALIMENTOS - CANTIDADES	Uso promedio anual				
	NUNCA	AÑO	MES	SEMA.	DIA
1- Croquetas, buñuelos, ó San Jacobo (uno)					
2- Palitos de merluza, pescado empanado (uno)					
3- Sopas y cremas de sobre (1 plato o sobre)					

X - MISCELANEOS

ALIMENTOS - CANTIDADES	Uso promedio anual				
	NUNCA	AÑO	MES	SEMA.	DIA
1- Mayonesa (1 cucharadita de postre)					
2- Salsa de tomate (1/2 taza)					
3- Picante: tabasco, pimienta, ... (1/2 cucharadita)					
4- Mostaza (1 cucharadita de postre)					
5- Sal (una pizca)					
6- Azúcar (1 cucharadita)					
7- Miel (1 cucharadita)					
8- Mermeladas (1 cucharadita)					

XI - VITAMINAS

Durante el año pasado, ¿ha tomado vitaminas o minerales? 1. Si 2. No

|

Ponga la marca de las vitaminas y/o minerales que usted toma habitualmente y la cantidad al día (si es posible):

ANEXO IIa. Ingestas promedio de nutrientes en los grupos control, pacientes de CRC y grupo CRC molecular, calculadas a partir del cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.

	CONTOLES	CRC	p ¹	CRC	p ²
				MOLECULAR	
	N=296	N=246		n=117	
	Todos	Todos		Todos	
	Hombre	Hombre		Hombre	
	Mujeres	Mujeres		Mujeres	
Kcalories kcal	2286.51± 569.6	2283.14±565.4		2257.2±598.4	
	2443.15± 630.7***	2373.07±605.3		2332.10±624.9	
	2192.53±508.6	2180.7±499.3		2173.96±561.6	
Grasas g	94.05 ± 25.5	93.45±28.3		93.26±30.2	
	97.51±26.9	95.6±30.3		94.06±33.6	
	91.98±24,6	91±25.7		92.37±26.2	
Polinsaturadas g	11.23 ± 5.0	10.88±5.0		10.35±4.5	
	11.87±4.9	11.57±5.4		10.80±5.1	
	10.84±5.1	10.09±4.3		9.85±3.8	
Monoinsaturada g	40.85±10.2	41.03 ± 11.2		41.31±11.7	
	42.35±11.0	42.32±12.1		42.02±13.2	
	39.95±9.7	39.56±10.0		40.51±10.0	
Saturadas g	28.11±11.6	28.72 ±13.4		29.06±14.9	
	28.17±12.5	29.05±14.2		29.05±16.3	
	28.07±11.1	28.34±12.4		29.07±13.4	
Colesterol mg	456.99± 185.4	448.36±203.5		468.42±251.0	
	486.37±208.0*	481.4±244.0		513.97±316.3	
	439.35±168.6	410.52±135.6		417.91±134.2	
Proteinas g	81.45 ±20.3	79.68 ±19.8		78.75±20.8	
	80.33±23.0	81.07±20.9		79.71±21.9	
	82.12±18.5	78.10±18.5		77.67±19.7	

Vegetales g	25.64\pm 7.9	25.71 \pm 7.8		25.37\pm7.6	
	25.84 \pm 7.9	26.29 \pm 7.4		25.78 \pm 7.1	
	25.52 \pm 7.9	25.04 \pm 8.3		24.92 \pm 8.1	
No-vegetales g	50.68 \pm16.2	48.83\pm 15.6		48.29\pm16.4	
	49.32 \pm 18.4	49.51 \pm 17.1		48.76 \pm 17.9	
	51.49 \pm 14.7	48.05 \pm 13.7	0.04	47.77 \pm 14.8	
Carbohidratos g	256.14\pm75.5	260.60\pm80.9		253.4\pm77.7	
	265.89 \pm 75.7	268.21 \pm 88.3		259.83 \pm 76.6	
	250.29 \pm 75.0	251.94 \pm 71.0		246.27 \pm 78.9	
Fibra g	18.11 \pm 6.3	16.47\pm6.2	0.003	15.80\pm5.2	0.001
	17.32 \pm 5.5	16.74 \pm 6.8		15.58 \pm 4.9	0.04
	18.59 \pm 6.8	16.15 \pm 5.5	0.001	16.04 \pm 5.6	0.01
Calcio mg	865.29\pm416.4	823.09 \pm323.2		784.90\pm311.5	0.06
	778.81 \pm 487.6**	823.60 \pm 359.8		770.95 \pm 347.8	
	917.17 \pm 358.6	822.52 \pm 277.3	0.01	800.56 \pm 267.9	0.02
Fosforo mg	1417.72\pm 442.0	1386.99\pm415.0		1349.79\pm413.2	
	1384.23 \pm 496.2	1387.70 \pm 428.8		1331.15 \pm 415.5	
	1437.81 \pm 406.2	1386.11 \pm 400.4		1370.46 \pm 413.5	
Potasio mg	3173.47 \pm 1568.9	3044.97\pm2136.3		2778.74\pm1065.4	0.01
	2993.00 \pm 1423.3	3152.80 \pm 2652.1		2728.14 \pm 1049.7	0.05
	3281.46 \pm 1644.3	2922.08 \pm 1326.0	0.04	2834.44 \pm 1089.5	0.05
Sodio mg	2010.49\pm649.2	1938.36\pm641.5		1928.56\pm692.0	
	2162.54 \pm 674.5**	2013.36 \pm 686.9		2002.45 \pm 750.6	
	1919.27 \pm 617.7	1852.92 \pm 576.5		1846.61 \pm 617.0	
Hierro mg	12.38 \pm 3.1	11.96\pm3.3		11.76\pm3.0	
	12.42 \pm 3.3	12.31 \pm 3.5		11.92 \pm 3.1	
	12.35 \pm 2.9	11.55 \pm 2.9	0.02	11.59 \pm 3.0	
Magnesio mg	354.96 \pm137.2	340.19 \pm124.8		334.18\pm118.8	
	330.68 \pm 137.7**	337.04 \pm 121.3		326.57 \pm 115.4	
	369.53 \pm 135.1	343.76 \pm 129.2		342.61 \pm 123.0	

Zinc	mg	9.07± 3.5	9.09± 4.8		9.35±6.4	
		9.24±4.4	9.5±5.9		9.89±8.2	
		8.96±2.9	8.54±2.9		8.75±3.4	
Vitamina B1	mg	1.25±0.3	1.20 ±0.3	0.06	1.16±0.3	0.007
		1.26±0.3	1.24±0.3		1.16±0.3	0.06
		1.25±0.3	1.16±0.2	0.01	1.15±0.3	0.05
Vitamina B2	mg	1.98 ±0.7	1.91±0.6		1.88±0.6	
		1.93±0.8	1.97±0.7		1.91±0.7	
		2.01±0.6	1.84±0.4	0.01	1.85±0.5	
Vitamina B6	mg	2.01± 0.4	1.98 ± 0.5		1.97±0.6	
		1.99±0.4	2.01±0.5		1.97±0.6	
		2.02±0.4	1.94±0.5		1.96±0.5	
Vitamina B12	mg	7.95± 4.0	7.67± 4.7		8.00±6.0	
		8.70±4.9 *	8.22±5.8		8.61±7.8	
		7.49±3.3	7.04±2.9		7.33±3.0	
Folatos	ug	306.44±87.1	288.10 ± 89.1	0.01	281.2±83.9	0.008
		300.4±79.1	293.82±87.9		282.69±77.7	
		310.01±91.6	281.6±90.4	0,009	279.55±91.0	0.03
Vitamina C	mg	101.87± 43.7	96.87±44.8		94.45±42.1	
		94.04±42.1**	95.31±46.5		91.06±40.2	
		106.57±44.0	98.65±42.9		98.20±44.3	
Vitamina A	ug	3505.15 ±1647.2	3050. 55±1636.2	0.001	1801.05±1801.7	p0.02
		3413.72±1642.3	3102.27±1681.5		3008.91±1852.1	
		3560.00±1652.1	2991.63±1588.4	0.004	3118.88±1759.2	
Vitamina D	ug	4.03±2.5	3.55±2.5	0.02	3.51±2.3	0.05
		4.10±2.2	3.45±2.0	0.02	3.52±2.1	
		3.99±2.7	3.65±3.0		3.51±2.5	
Vitamina E	mg	9.19±3.18	8.65± 3.2	0.05	8.21±3.0	0.005
		9.22±3.2	8.78±3.3		8.16±3.1	0.04
		9.17±3.1	8.51±3.2		8.26±2.9	0.05

Alcohol	g	11.29±22.6	9.94±18.4		10.31±19.4
		23.98±31.8***	14.91±22.7	0.01	15.4±23.7
		3.67±7.9	4.28±8.9		4.56±10.7

p1 Diferencias estadísticas (Student t-test o U-Mann Withney) para controles vs casos y p2, Diferencias estadísticas para controles vs CRC molecular.

Diferencias estadísticas entre hombres y mujeres; (Student t-test o U-Mann Withney)

*p<0.05; **p<0.01 ***p<0.001

ANEXO IIb. Selección de nutrientes y riesgo asociado de CRC. Cada nutriente es analizado independientemente ajustado por edad y energía (kcal).

	Controles vs todo CRC			Controles vs Molec CRC		
	OR	CI	p	OR	CI	P
Fibra	0.95	0.942-0.979	0.009	0.92	0.887-0.960	0.001
Vitamina B1	0.50	0.25-1.02	0.05	0.21	0.081-0.60	0.003
Folatos	0.99	0.996-0.999	0.03	0.99	0.995-0.998	0.01
Vitamina A	0.99	0.9996-0.9999	0.003	0.99	0.9996-0.9999	0.04
Vitamina E	0.95	0.90-1.01	0.1	0.88	0.828-0.968	0.008
Potasio	1	0.99-1.00	0.3	0.99	0.9995-0.9999	0.007
Vitamina D	0.93	0.879-0.998	0.05	0.91	0.83-1.01	0.09
Calcio	0.99	0.999-1.00	0.1	0.99	0.998-0.999	0.03
Hierro	0,93	0,879-0,998	0,05	0,89	0,836-0,978	0,02

ANEXO III. ÍNDICE de FIGURAS

Fig 1.	<i>Vías de Comunicación entre el CRC Hereditario y el Esporádico.</i>	3
Fig 2.	<i>Clasificación de la Inestabilidad en Microsatélites según el NCI.</i>	8
Fig 3.	<i>Estructura y Organización del loci INK4a/ARF.</i>	11
Fig 4.	<i>Vías para la Supresión de Tumores implicadas en el loci INK4a/ARF.</i>	12
Fig 5.	<i>Sistemas de Reparación MisMatch del DNA.</i>	16
Fig 6.	<i>Complejos Protéicos Involucrados en el MMR.</i>	17
Fig 7.	<i>Organización y Cooperación de los Mecanismos Epigenéticos.</i>	24
Fig 8.	<i>Tipos de Metilación en el CRC.</i>	29
Fig 9.	<i>Modelo de Carcinogénesis integrando los Mecanismos Epigenéticos.</i>	35
Fig 10.	<i>Metabolismo de los Folatos.</i>	54
Fig 11.	<i>Diseño del Estudio y Poblaciones Utilizadas.</i>	68
Fig 12.	<i>Protocolo para la valoración de la Metilación.</i>	79
Fig 13.	<i>Distribución de la Metilación en $p16^{INK4a}$ entre hombres y mujeres.</i>	84
Fig 14.	<i>Distribución de la Metilación en $p16^{INK4a}$ en función del grado de diferenciación del tumor.</i>	85
Fig 15.	<i>Distribución de la Metilación en $p16^{INK4a}$ en función de la localización anatómica.</i>	85
Fig 16.	<i>Distribución de la Metilación $p14^{ARF}$ en entre hombres y mujeres.</i>	86
Fig 17.	<i>Distribución de la Metilación en $p14^{ARF}$ en función de la localización anatómica.</i>	86
Fig 18.	<i>Distribución de la Metilación en $p14^{ARF}$ en función del grado de diferenciación del tumor.</i>	87
Fig 19.	<i>Distribución de la Metilación en $hMLH1$ entre hombres y mujeres.</i>	88
Fig 20.	<i>Distribución de la Metilación en $hMLH1$ en función del grado de diferenciación del tumor.</i>	88
Fig 21.	<i>Distribución de la Metilación en $hMLH1$ en función de la localización anatómica.</i>	89
Fig 22.	<i>Distribución de la Metilación en $p16^{INK4a}$, $p14^{ARF}$, y $hMLH1$ en tumores con al menos un loci metilado.</i>	90
Fig 23.	<i>Frecuencia de Loci Metilados en tumores con al menos un loci metilado.</i>	91
Fig 24.	<i>Frecuencia de Mutaciones en K-Ras en Subgrupos Moleculares</i>	92
Fig 25.	<i>Consumo de Folatos en el grupo Control y Subgrupos Moleculares</i>	99
Fig 26.	<i>Consumo de Vitamina A en el grupo Control y Subgrupos Moleculares</i>	100
Fig 27.	<i>Consumo de Vitamina B1 en el grupo Control y Subgrupos Moleculares</i>	101
Fig 28.	<i>Consumo de Fibra en el grupo Control y Subgrupos Moleculares</i>	101

ANEXO IV. ÍNDICE de TABLAS.

Tabla 1.	<i>Características de los tumores MSI respecto los tumores MSS.</i>	5
Tabla 2.	<i>Modelos de Iniciación y Progresión del CRC.</i>	9
Tabla 3.	<i>Genes Metilados en el CRC.</i>	31
Tabla 4.	<i>Mecanismos de inactivación de p16^{INK4a} en distintos tumores.</i>	37
Tabla 5.	<i>Ensayos Clínicos de Fase II con inhibidores de las DNMTs.</i>	42
Tabla 6.	<i>Ensayos Clínicos con inhibidores de las HDACs.</i>	44
Tabla 7.	<i>Efecto de distintos Factores de Riesgo en la secuencia del CRC.</i>	46
Tabla 8.	<i>Epidemiología del CRC en función de la localización del tumor.</i>	47
Tabla 9.	<i>Estudios de Intervención con Folatos en Humanos.</i>	57
Tabla 10.	<i>Limitaciones de los Estudios de Intervención con Folatos en Humanos.</i>	58
Tabla 11.	<i>Estudios sobre el riesgo de CRC asociado al polimorfismo C677T MTHFR.</i>	62
Tabla 12.	<i>Parámetros Nutricionales, Características y Unidades de Medida.</i>	71
Tabla 13.	<i>Primers Utilizados para el análisis de la Metilación en p16^{INK4a}, p14^{ARF}, hMLH1.</i>	78
Tabla 14.	<i>Características de las poblaciones de pacientes de CRC y Controles.</i>	81
Tabla 15.	<i>Características ClínicoPatológicas del grupo de pacientes de CRC y del subgrupo de CRC molecular.</i>	82
Tabla 16.	<i>Características ClínicoPatológicas de los subgrupos moleculares de Metilación en p16^{INK4a}, p14^{ARF} y hMLH1,.</i>	84
Tabla 17.	<i>Características ClínicoPatológicas del genotipo MTHFR wt.</i>	93
Tabla 18.	<i>Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C677T MTHFR en los subgrupos moleculares.</i>	94
Tabla 19.	<i>Frecuencia del genotipo MTHFR wt en hombres y mujeres en los subgrupos moleculares.</i>	95
Tabla 20.	<i>Análisis Multivariante del riesgo de Metilación asociado al polimorfismo C677T MTHFR.</i>	95
Tabla 21.	<i>Ingesta de Micronutrientes en pacientes con metilación en p16^{INK4a} y comparación con el grupo control.</i>	97
Tabla 22.	<i>Ingesta de Micronutrientes en pacientes con metilación en p14^{ARF} y comparación con el grupo control.</i>	98
Tabla 23.	<i>Ingesta de Micronutrientes en pacientes con metilación en hMLH1 y comparación con el grupo control.</i>	98