

Rol de los genes metabolizadores de folatos MTR A2756G y MTRR A66G en las mujeres ecuatorianas afectadas de cáncer mamario

Role of folate metabolizing genes MTR A2756G and MTRR A66G in the Ecuadorian women affected by breast cancer

Carolina Echeverría¹, Andrés López Cortés¹, Fabián Oña Cisneros¹,
María Eugenia Sánchez¹, Felipe Rosales², César Paz y Miño¹.

*Instituto de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de las Américas, Quito - Ecuador¹;
Departamento de Patología, Hospital Oncológico Solón Espinosa Ayala, Quito - Ecuador².*

Recibido: 22 de octubre 2014. Aceptado: 31 de octubre 2014.

Resumen:

El cáncer de mama es la segunda causa de muerte a nivel mundial seguido del cáncer de ovario. La incidencia en el Ecuador es 35.8 / 100.000 individuos. Los genes MTR y MTRR están involucrados en la alteración del metabolismo de los folatos en varias poblaciones mundiales.

Se analizaron 114 individuos afectados del Hospital Oncológico Solón Espinosa Ayala y 195 individuos sanos del Hospital de Machachi, durante el período 2012-2013. Los genotipos MTR A2756G y MTRR A66G no se relacionaron significativamente con el riesgo de desarrollar cáncer de mama. MTR G/G (OR = 0.29; IC = 0.06-1.38; p = 0.186); MTRR G/G (OR = 0.93; IC = 0.2-4.9; p = 1). No hubo riesgo significativo de cáncer de mama en los polimorfismos MTR A2756G y MTRR A66G de la población ecuatoriana.

Palabras claves: cáncer de mama, MTR, MTRR, PCR-RFLP, polimorfismo.

Abstract:

Breast cancer is a cell alteration of the mammary tissue, becoming the second cause of death worldwide followed by ovarian cancer. Ecuador has an incidence of 35.8 / 100,000 individuals. MTR and MTRR genes have involved in alterations of folate metabolism in some populations worldwide. The MTR A2756G and MTRR A66G genotypes were not significantly related with the risk of breast cancer development. MTR G/G (OR = 0.29; CI = 0.06-1.38; P = 0.186); MTRR G/G (OR = 0.93; CI = 0.2-4.9; P = 1). It was not found significantly risk of breast cancer development under presence of the MTR A2756G and MTRR A66G polymorphisms in the Ecuadorian population.

Key words: breast cancer, MTR, MTRR, PCR-RFLP, polymorphism.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia más común de las mujeres de todo el mundo. Se prevé que en 2014 se diagnostiquen alrededor de 232.340 casos y haya 39.620 fallecimientos en Estados Unidos¹. En el Ecuador, el último registro de la

tasa de incidencia en la ciudad de Quito es de 35.8 / 100.000 habitantes entre los años 2003 y 2005². Desafortunadamente, en la mayoría de los casos, el cáncer mamario es detectado en etapas avanzadas, lo que complica el tipo de tratamiento y conduce a un mal pronóstico³; por tanto, es de gran importancia identificar los biomarcadores moleculares asociados con el desarrollo, crecimiento y progresión del carcinoma mamario.

Correspondencia: César Paz y Miño, MD.
Teléfonos: (593-2) 3340229-3970073.
e-mail: cesar.pazymino@udla.edu.ec; andres.lopez@udla.edu.ec

Alrededor de 10% de los casos se los relaciona con la herencia de patrones genéticos que predisponen a la proliferación celular; v.gr., varios genes ya identificados: BRCA1, BRCA2 y HER2/neu⁴. Sin embargo, la susceptibilidad genética de desarrollar neoplasias también se asocia con los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en genes asociados con las vías de señalización molecular como apoptosis, reparación del ADN, supresión tumoral, proliferación celular o implicados en procesos metabólicos⁵. Los genes MTR, MTRR, TS y MTHFR están involucrados en el metabolismo de los folatos⁶, y sus proteínas codificadas son relevantes en los procesos de reparación, síntesis y metilación del ADN, ARN y proteínas⁷.

La metionina, aminoácido esencial y precursor de la molécula S-adenosil-metionina (SAM), es el donador universal del grupo metilo involucrado en diferentes reacciones de metilación⁸. La re-metilación de la metionina es catalizada por la enzima metionina sintetasa (MTR), en una reacción dependiente de la vitamina B₁₂ que actúa como un transportador intermediario del grupo metilo⁹. La enzima MTR se inactiva cuando la vitamina B₁₂ es oxidada por la metionina sintetasa reductasa (MTRR)^{10,11}. MTRR cataliza la regeneración de metilcobalamina, cofactor de MTR, manteniendo el estado activo de la metionina sintetasa¹². El polimorfismo MTR A2756G se asocia con decrecimiento de los niveles de homocisteína plasmática^{13,14}. El polimorfismo MTRR A66G tiene baja afinidad por la enzima MTR y se asocia indirectamente con los niveles de homocisteína^{15,16,17}. La presencia de estos SNP en el ADN incrementan el riesgo de causar defectos del tubo neural, problemas cardiovasculares, enfermedades congénitas y varios tipos de cáncer^{18,19,20,21}.

Debido a que los folatos son importantes en la fisiología humana, esta investigación tiene como objetivo evaluar los polimorfismos MTR A2756G y MTRR A66G, y asociarlos con características histopatológicas de mujeres que padecen de cáncer de mama.

SUJETOS Y MÉTODOS

Muestras biológicas

Se realizó un estudio retrospectivo caso-control durante el período 2013-2014 que fue aceptado por el Comité de Bioética de la Universidad de las Américas. Se analizaron 305 mujeres ecuatorianas. Del grupo de casos, las 114 muestras de tejido tumoral embebido en parafina demostraron cáncer de mama entre los años 2010 y 2012, y se las obtuvo gracias a la colaboración del Departamento de Patología del Hospital Oncológico Solón Espinosa Ayala (SOLCA). Las historias clínicas de cada paciente mostraron diferentes características patológicas: edad, estadio tumoral (T1-T4), clasificación pTNM, pruebas inmunohistoquímicas (IHQ), ganglios axilares, tipo de invasión tumoral, glándula mamaria afectada, consumo de anticonceptivos e invasión a otros órganos o tejidos. El grupo control estuvo formado por 195 individuos sanos seleccionados al azar con el apoyo del Área de Análisis Clínico del Hospital de Machachi; los sujetos sanos presentaron

características biogeográficas similares a los afectados, no presentaron antecedentes de consumo de alcohol, tabaquismo ni diagnóstico familiar o personal de cáncer de mama. Todos los sujetos firmaron el respectivo consentimiento informado.

Análisis genético

Antes de la extracción de ADN de los tumores mamarios se utilizó xilol para eliminar la parafina y lograr una digestión por 1 día a 50 °C con proteinasa K. Se extrajo el ADN de los tejidos tumorales de los individuos afectados y el ADN de la sangre periférica de los sanos. El kit utilizado fue PureLink Genomic DNA (Invitrogen, Madison, WI), obteniendo así una concentración promedio de ADN tumoral de 84.35 ng / µl y una concentración promedio de 35.15 ng / µl para ADN de sangre periférica, que fue medido mediante NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA). Para la reacción de PCR-RFLP se utilizó un volumen final de 50 µl, que contenía 4 µl de ADN, 34 µl de H₂O Milli-Q, 0.4 µM de primers sentido (FW) y anti-sentido (RV), 1.5 mM de MgCl₂, 5 µl de 10X buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4 y 500 mM KCl), 0.2 µM de dNTP y 2.5 U de Taq polimerasa Platinum (Invitrogen, Madison, WI).

En el análisis del polimorfismo MTRR A66G (arg/gln) se amplificó un fragmento de 66 pb utilizando los primers FW 5'-GCAAAGGCCATCGCAGAAGACAT-3' y RV 5'-GTGAAGATCTGCAGAAAATCCATGTA-3'⁽²²⁾. Cabe mencionar que el primer FW presenta una base nitrogenada alterada (nucleótido C subrayado) que permite generar un sitio de corte enzimático. El programa de amplificación se realizó durante 35 ciclos con una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95 °C, 30 segundos a 94 °C, 45 seg a 56 °C, 45 seg a 72 °C y 3 min a 72 °C. Para la digestión del fragmento amplificado se utilizó 5 U de la enzima de restricción NdeI (Promega, Madison, WI) por 4 horas a 37 °C. Los productos digeridos por la enzima se los separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 5% con bromuro de etidio y se observaron los resultados en un transiluminador ImageQuan 300 (General Electric, Fairfield, USA). Los homocigotos normales (A/A) presentaron fragmentos de 44 y 22 pb, los heterocigotos (A/G) de 66, 44 y 22 pb y los homocigotos mutantes (G/G) de 66 pb. El análisis del polimorfismo MTR A2756G (gly/asp) del cromosoma 1q43, exón 26, logró amplificar un fragmento de 219 pb utilizando los primers FW 5'-AGAAGAAATGAAGTTAAGGAA-3' y RV 5'-TACCACTTACCTTGAGAGAC-3'⁽²³⁾. La desnaturalización inicial se realizó a 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94 °C, 45 seg a 50°C, 30 seg a 72 °C, y una elongación final de 1 min a 72 °C. El producto amplificado se lo digirió a 37 °C por 4 horas con 5 U de la enzima HaeIII (Promega, Madison, WI). Los homocigotos normales (A/A) presentaron un fragmento de 219 pb, los heterocigotos (A/G) de 219, 190 y 29 pb y los homocigotos mutantes (G/G) de 190 y 29 pb.

Los diferentes resultados de la PCR-RFLP se confirmaron mediante análisis de secuenciación capilar con el equipo Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, Austin, TX). El

volumen final de la reacción fue de 12 µl, de 3 a 10 ng de producto de PCR, 2.8 µl de agua Milli-Q, 2 µl de 5X buffer, 3.2 µl (1 µM) de primer FW, 1 µl del estándar de secuencia BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Austin, TX). En la reacción de secuenciación se estableció el siguiente programa: 3 min a 96 °C, 30 ciclos de 10 seg a 96 °C, 5 seg a 50 °C y 4 min a 60 °C. Por último, el alineamiento de secuencias y posterior análisis de resultados se realizó mediante el Sequencing Analysis Software 5.3.1 (Applied Biosystems, Austin, TX).

Análisis estadístico

Toda la información obtenida, incluyendo las historias clínicas, se almacenó en una base de datos. Las frecuencias alélicas y las frecuencias genotípicas se calcularon a partir de la información obtenida de los genotipos. Se calculó mediante la fórmula de Hardy-Weinberg que determina el equilibrio de los alelos de la población mediante una página que se encuentra disponible en la Internet (<http://www.oege.org/software/hwemr-calc.shtml>). Se aplicaron las pruebas estadísticas de odds ratio (OR) (intervalo de confianza del 95%) y chi-cuadrado (χ^2) utilizando el programa PASW 18 (SPSS; Chicago, IL). Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

- **Tabla 1:** detalla las diferentes características clínico-patológicas de la población de estudio. El 55.3% de los individuos afectados tenían una edad ≥ 50 años y 44.7% una edad menor de 50 años. El 58.7% presentó afección de la glándula mamaria derecha, y 41.3% de la izquierda. Con respecto al estadio tumoral (pTNM): 46.5% de los casos fueron diagnosticados de cáncer de mama en estadio II, 31.6% en estadio I y 21.9% en estadio III. Con las pruebas inmunohistoquímicas se determinó que el 63.2% de las mujeres presentan estrógeno positivo y 36.8% estrógeno negativo; 58.7% de casos presentó progesterona positiva y 41.3% progesterona negativa; para el receptor HER2/neu negativo hubo 71.1% negativo.
- **Tabla 2:** detalla la distribución genotípica y alélica de los polimorfismos MTRR A66G y MTR A2756G. Del polimorfismo A66G, el homocigoto mutante (G/G) presentó una frecuencia genotípica de 0.06 en casos y 0.08 en controles; la frecuencia genotípica del homocigoto normal (A/A) fue de 0.03 en los casos y en los controles, y el heterocigoto (A/G) tuvo una frecuencia de 0.91 en los casos y 0,89 en los controles. Según la prueba de Hardy-Weinberg, la población de estudio se encuentra en equilibrio ($p > 0.05$).
- **Tabla 3:** detalla la clasificación histopatológica del cáncer de mama, que asocia con las frecuencias de los genotipos MTRR A66G y MTR A2756G. 81 sujetos de la población estudiada presentan carcinoma ductal invasor, y 6 mujeres tienen carcinoma lobulillar invasor.

- **Tabla 4:** presenta la asociación de los polimorfismos MTRR A66G y MTR A2756G con los diferentes perfiles inmunohistoquímicos encontrados en cada paciente. Es evidente que existe una mayor dominancia de los receptores con el siguiente patrón: estrógeno positivo, progesterona positiva y HER2/neu negativo y los siguientes genotipos: AA: 2, AG: 39, GG: 3 (MTRR A66G); AA: 33, AG: 10, GG: 1 (MTR A2756G).
- **Tabla 5:** presenta las diferentes asociaciones de los polimorfismos con el riesgo de desarrollar cáncer mamario. Del polimorfismo MTRR A66G, los heterocigotos (A/G) presentaron un OR de 1.2 (95% IC = 0.3-4.5; $p = 1$), y aquellos que combinan genotipos A/G+ G/G presentaron un OR de 1.18 (95% IC = 0.29-4.79; $p = 1$), que se traduce en un valor de p estadísticamente no significativo. En el genotipo MTR A2756G no hubo diferencia estadísticamente significativa –OR 0.4 y 1.0 ($p > 0.05$)–. Elsevier. 2012.

Tabla 1. Información clínico-patológica de los pacientes con cáncer de mama.

Variables	n=114	Porcentaje (%)
Edad (años)		
< 50	51	44,7
≥ 50	63	55,3
Seno afectado		
Derecho	67	58,7
Izquierdo	47	41,3
Estadio tumoral (pTNM)		
\leq Estadio I	36	31,6
Estadio II	53	46,5
\geq Estadio III	25	21,9
Estrógeno		
Positivo	72	63,2
Negativo	42	36,8
Progesterona		
Positivo	67	58,7
Negativo	47	41,3
Receptor HER2/neu		
+1	14	12,3
+2	5	4,3
+3	14	12,3
Negativo	81	71,1

Tabla 2. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos MTR A2756G y MTRR A66G.

Polimorfismos	Genotipos	Frecuencias genotípicas			Frecuencia alélicas			HWE, Chi-cuadrado	HWE ^a , P
		Casos	Conroles	Todos	Casos	Conroles	Todos		
MTR A2756G	A/A	0,82	0,64	0,70	0,9	0,8	0,83	0,01	> 0,05
	A/G	0,16	0,32	0,26	0,1	0,2	0,17		
	G/G	0,02	0,05	0,04					
MTRR A66G	A/A	0,03	0,03	0,03	0,49	0,48	0,48	0,64	> 0,05
	A/G	0,91	0,89	0,9	0,51	0,52	0,52		
	G/G	0,06	0,08	0,07					

a Equilibrio Hardy-Weinberg de toda la población de estudio.

Tabla 3. Clasificación histopatológica del cáncer de mama asociada con la frecuencia de individuos con cada uno de los genotipos de MTRR A66G y MTR A2756G

Polimorfismo	Ductal intraductal n (%)	Ductal invasor n (%)	Lobulillar intraductal n (%)	Lobulillar invasor n (%)	Papiliar invasor n (%)	Musinoso n (%)	Medular n (%)	Total n (%)
MTRR A66G								
AA	0(0)	1(0.9)	0(0)	0(0)	1(0.9)	1(0.9)	0(0)	3(2.7)
AG	14(12.3)	78(68.4)	2(1.8)	4(3.5)	2(1.8)	3(2.7)	1(0.9)	104(91.2)
GG	2(1.8)	2(1.8)	1(0.9)	2(1.8)	0(0)	0(0)	0(0)	7 (6.3)
Total	16(14.1)	81(71.1)	3(2.7)	6(5.3)	3(2.7)	4(3.6)	1(0.9)	114(100)
MTR A2756G								
AA	15(13.2)	64(56.1)	2(1.8)	5(4.4)	3(2.7)	4(3.6)	1(0.9)	94(82.7)
AG	1(0.9)	15(13.2)	1(0.9)	1(0.9)	0(0)	0(0)	0(0)	18(15.9)
GG	0(0)	2(1.8)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.8)
Total	16(14.1)	81(71.1)	3(2.7)	6(5.3)	3(2.7)	4(3.6)	1(0.9)	114(100)

Tabla 4. Asociación de los polimorfismos MTRR A66G y MTR A2756G con el perfil inmunohistoquímico.

Receptores			MTRR A66G			MTR A2756G		
E ^a	P ^b	H ^c	AA	AG	GG	AA	AG	GG
-	-	-	0 (0)	16 (14.1)	3 (2.6)	18 (15.8)	1 (0.9)	0 (0)
-	-	+	0 (0)	12 (10.5)	1 (0.9)	11 (9.6)	2 (1.8)	0 (0)
-	+	+	0 (0)	3 (2.6)	0 (0)	3 (2.6)	0 (0)	0 (0)
-	+	-	0 (0)	7 (6.1)	0 (0)	4 (3.5)	2 (1.8)	1 (0.9)
+	+	-	2 (1.8)	39 (34.2)	3 (2.6)	33 (28.9)	10 (8.8)	1 (0.9)
+	-	+	0 (0)	4 (3.5)	0 (0)	4 (3.5)	0 (0)	0 (0)
+	+	+	0 (0)	13 (11.4)	0 (0)	10 (8.8)	3 (2.6)	0 (0)
+	-	-	1 (0.9)	10 (8.8)	0 (0)	11 (9.6)	0 (0)	0 (0)

a Estrógeno, b Progesterona, c HER2/neu

Tabla 5. Asociación de los polimorfismos MTRR A66G y MTR A2756G con el riesgo a desarrollar neoplasia de mama.

Polimorfismos	Genotipos	Casos n (%)	Controles n (%)	OR	95% IC	p	Chi-cuadrado de Pearson	p de Chi-cuadrado
MTRR A66G	A/A ^a	3 (2,63)	6 (3,07)	1,0				
	A/G	104 (91,22)	174(89,23)	1,2	0,3 - 4,5	1	0,062	0,803
	G/G	7 (6,14)	15 (7,69)	0,93	0,2 - 4,9	1	0,007	0,935
	A/G+ G/G	111 (97,36)	189 (96,32)	1,18	0,29 - 4,79	1	0,05	0,822
MTR A2756G	A/A ^a	94 (82,5)	124 (63,58)	1,0				
	A/G	18 (15,7)	62 (31,79)	0,4	0,21 - 0,69	0,002	10,6	0,001
	G/G	2 (1,8)	9 (4,61)	0,29	0,06 - 1,38	0,186	2,7	0,102
	A/G+ G/G	20 (17,5)	71 (36,4)	0,37	0,21 - 0,65	0,001	12,3	0

^aReferencia

DISCUSIÓN

Alrededor del mundo se han realizado varios estudios que relacionan los polimorfismos genéticos de las enzimas metabolizadoras de folatos con el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, defectos del tubo neural y varios tipos de cáncer: colorrectal, gástrico, esofágico, ovárico y leucemia²⁴⁻²⁸.

En el cáncer de mama se ha observado resultados controversiales entre las variantes MTRR A2756G, MTR A66G y el riesgo de desarrollar esta enfermedad. El presente estudio es el primero que se realiza en la población femenina y mestiza del Ecuador (por interés científico, cabe mencionar que el primer estudio en población masculina ecuatoriana se lo realizó en pacientes afectados de cáncer de próstata)²⁹.

Información clínico-patológica: el mayor porcentaje de mujeres afectadas presentó ≥ 50 años, afección de la mama derecha (58.7%), estadio tumoral II (46.5%), estrógeno positivo (63.2%), progesterona positivo (58.7%), receptor HER2/neu negativo (71.1%).

Los genes MTR y MTRR han sido ampliamente estudiados en los procesos de metilación, reparación y síntesis del ADN; por tanto, resulta de interés científico conocer sus frecuencias genotípicas y alélicas en la población ecuatoriana para entender el comportamiento de sus enzimas codificadas. De los casos, las frecuencias alélicas más altas fueron la de los alelos MTR A (0.9) y MTRR G (0.51), y de los controles, las más altas fueron MTR A (0.8) y MTRR G (0.52). La población de estudio presentó equilibrio poblacional Hardy-Weinberg ($p > 0.05$), y fijación de los alelos analizados en los sanos y en los enfermos.

Clasificación histopatológica: el tipo de cáncer mamario más frecuente en la población de estudio fue ductal invasor (71.1%), seguido de ductal infiltrante (14.1%), lobulillar invasor (5.3%), mucinoso (3.6%), lobulillar intraductal (2.7%), papilar invasor (2.7%) y medular (0%).

Asimismo, es importante resaltar que los genotipos más frecuentes de carcinoma ductal invasor son MTRR A/G (68.4%) y MTR A/A (56.1%), y en el carcinoma ductal infiltrante MTRR A/G (12.3%) y MTR A/A es de 13.2%. Las pruebas IHQ determinaron presencia o ausencia de los receptores de estrógeno, progesterona y HER2/neu.

Asociación de los receptores con las variantes genéticas MTRR A66G y MTR A2756G: los genotipo MTRR A/G (34.2%) y MTR A/A (28.9%) fueron más frecuentes en el patrón IHQ (+,+,-), lo que confirma la importancia de la realización de estudios cada vez más específicos y moleculares para diagnosticar de manera temprana la enfermedad. Por su parte, el patrón IHQ (-,-,-) estuvo presente en 16.7% de la población afectada, en la que hubo predominio del genotipo MTRR A/G (14.1%) y de MTR A/A (15.8%).

La prueba OR expresa el riesgo que presenta una población de desarrollar una enfermedad cuando hay mutaciones del material genético. En este estudio se observó que los genotipos MTRR A/G, G/G y A/G + G/G no se relacionaron significativamente con el riesgo de desarrollar cáncer de mama ($p = 1$). Estos resultados son similares a diferentes poblaciones del mundo: Polonia ($p = 0.57$)³⁰, Canadá ($p = 0.37$)³¹, Estados Unidos ($p = 0.9$)³², China ($p = 0.77$)³³, Japón ($p = 0.28$)³⁴, Rusia ($p = 0.08$)³⁵ y Tailandia ($p = 0.09$)³⁶. Asimismo, los genotipos MTR A/G, G/G y A/G + G/G no presentaron valores OR significativos, lo que es similar a las poblaciones de: Brasil ($p = 0.7$)³⁵, Alemania ($p = 0.48$)³⁶, Estados Unidos ($p = 0.91$)³², Rusia ($p = 0.74$)³⁷, China ($p = 0.74$)³³, Taiwán ($p = 0.88$)³⁸ y Japón ($p = 0.34$)³⁴; pero diferente a Canadá ($p = 0.04$)⁴². La mayor similitud de los resultados entre el Ecuador y el resto del mundo es que el cáncer de mama no sólo ocurre por alteraciones de las enzimas metabolizadoras de folatos sino que también son importantes: carga hormonal, ambiente, alimentación, rayos UV; es decir, los factores epigenéticos.

En conclusión, la cascada genética encargada de metabolizar los folatos se altera con más frecuencia en los polimorfismos del gen MTHFR comparados con los de los genes MTR y MTRR. Además, es importante mencionar que la ingesta de ácido fólico previene el cáncer de mama.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Departamento de Patología del Hospital Solón Espinosa Ayala (SOLCA) y al Área de Análisis Clínico del Hospital de Machachi por la colaboración en la obtención de las muestras biológicas.

Conflicto de interés

Los autores no tienen conflicto de intereses relacionados con este artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y FUENTES DE INFORMACIÓN

1. **American Cancer Society.** Breast Cancer Facts & Figures 2013-2014. Atlanta: American Cancer Society. 2014.
2. **Cueva P, Yépez J.** Epidemiología del Cáncer en Quito 2003-2005. Registro Nacional de Tumores SOLCA. Quito, Ecuador: AH Editorial; 2009;p.133-141.
3. **Weiner A, Boyarskikh U, Voronina E, Selezneva I, Sinkina T, Lazarev A,** et al. Polymorphisms in the folate-metabolizing genes MTR, MTRR, and CBS and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology* 2012;36:e95-e100.
4. **González L, Ávila A, Echeverri C, Jaramillo S, Salazar R, Aristizábal B.** HER2/neu and Breast Cancer: Diagnosis and Clinical Issues. *Rev Colomb Cancerol.* 2011;11(1):40-57.
5. **Oldenburg RA, Meijers-Heijboer H, Cornelisse CJ, Devilee P.** Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found?. *Crit Rev Oncol hematol.* 2007;63(2):125-149.
6. **Bai J, Zheng M, Xia X, Ter-Minassian M,** et al. MTHFR C677T polymorphism contributes to prostate cancer risk among Caucasian: A meta-analysis of 3511 cases and 2762 controls. *Eur J Cancer.* 2009;45:1443-1449.
7. **Muslumanoglu MH, Tepeli E, Demir S, Uludag A,** et al. The analysis of the relationship between A1298C and C677T polymorphisms of the MTHFR gene with prostate cancer in Eskiseir population. *Genet test Mol Biomarkers.* 2009;13(5):641-645.
8. **Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, Giovannucci E, Hunter DJ, Chen J,** et al. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocysteine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;8(9):825-829.
9. **Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclere D,** et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab.* 1999;67:317-323.
10. **Hubner R, Muir K, Lui J, Sellick G,** et al. Folate metabolism polymorphisms influence risk of colorectal adenoma recurrence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(9):1607-1613.
11. **Johansson M, Van Guelpen B, Hutdin J, Wiklund F,** et al. the MTHFR C677T polymorphism and risk of prostate cancer: results from the CAPS study. *Cancer Causes Cont.* 2007;18:1169-1174.
12. **Hobbs Ch, Sherman S, Yi P, Hopkins S,** et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factor for down syndrome. *Am J Hum Genet.* 2000;67:623-630.
13. **Leclerc D, Campeau E, Goyette P,** et al. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cbIG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Human Mol Genet* 1996;5:1867-1874.
14. **Chen J, Stampfer MJ, Ma J,** et al. Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infraction. *Atherosclerosis* 2001;154:667-672.
15. **Olteanu H, Munson T, Banerjee R.** Differences in the efficiency of reductive activation of methionine synthase and exogenous electron acceptors between the common polymorphic variants of human methionine synthase reductase. *Biochem* 2002;1:13378-85.
16. **Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barbaux S,** et al. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis* 2001;157:451-456.
17. **Jacques PF, Bostom AG, Selhub J,** et al. Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis* 2003;166:49-55.
18. **Wilson A, Platt R, Wu Q,** et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab* 1999;67:317-323.
19. **Hobbs CA, Sherman SL, Yi P,** et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 623-30.
20. **Choi SW, Mason JB.** Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr.* 2000;130(2):129-132.
21. **Szyf M.** DNA methylation and demethylation as targets for anticancer therapy. *Biochemistry.* 2005;70(5):651-669.
22. **Zhang Z, Shi Q, Liu Z, Sturgis E,** et al. Polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;1188-1193.
23. **Ulvik A, Ueland P.** Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping in unprocessed whole blood and serum by real-time PCR; application to SNPs affecting

- homocysteine and folate metabolism. *Clin Chem* 2001;2050-2053.
24. **Sharp L, Little J.** Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: A huge review. *Am J Epidemiol* 2004;159:423-443.
 25. **Robien K, Ulrich C.** 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: A huge review. *Am J Epidemiol* 2003;157:571-582.
 26. **Shen H, Xu Y, Zheng Y, et al.** Polymorphisms of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase and risk of gastric cancer in a Chinese population: A case-control study. *Int J Cancer* 2001;95:332-336.
 27. **Song C; Xing D, Tan W.** Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms increase risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Cancer Res* 2001;61:3272-3275.
 28. **Gershonia-Baruch R, Dagan E, Israeli D.** Association of the C677T polymorphism in the MTHFR gene with breast and/or ovarian cancer risk in Jewish women. *Eur J Cancer* 2000;36:2313-2316.
 29. **López-Cortés A, Jaramillo-Koupermann G, Muñoz MJ, et al.** Genetic polymorphisms in MTHFR (C677t, A1298C), MTR (A2756G) and MTRR (A66G) genes associated with pathological characteristics of prostate cancer in the Ecuadorian population. *Am J Med Sci.* 2013 (In Press).
 30. **Lissowska J, Gaudet MM, Brinton LA, Chanock SJ, Peplonska B, et al.** Genetic polymorphisms in the one-carbon metabolism pathway and breast cancer risk: a population-based-case-control study and meta-analyses. *Int J Cancer* 2007;120(12):2696-2703.
 31. **Kotsopoulos J, Zhang WW, Zhang S, McCready D, Trudeau M, Zhang P, et al.** Polymorphisms in folate-metabolizing enzymes and transport proteins and the risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008;112(3):585-593.
 32. **Stevens VL, McCullough ML, Pavluck AL, Talbot JT, Feigelson HS, et al.** Association of polymorphisms in one-carbon metabolism genes and postmenopausal breast cancer incidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(6):1140-1147.
 33. **Shrubsole MJ, Gao YT, Shu XO, Dai Q, Jin F, et al.** MTR and MTRR polymorphisms, dietary intake, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(3):586-588.
 34. **Suzuki T, Matsuo K, Hirose K, Hiraki A, Kawase T, Watanabe M, et al.** One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of breast cancer. *Carcinogenesis* 2008;29(2):356-362.
 35. **Weiner A, Boyarskikh U, Voronina E, Selezneva I, Sinkina T, et al.** Polymorphisms in the folate-metabolizing genes MTR, MTRR, and CBS and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology* 2012;36:e95-e100.
 36. **Sangrajrang S, Sato Y, Sakamoto H, Ohnami S, Khuhaprema T, Yoshida T.** Genetic polymorphisms in folate and alcohol metabolism and breast cancer risk: a case-control study in Thai women. *Breast Cancer Res Treat* 2010;123(3):885-893.
 37. **Nazareno M, Puzyrev V, Kazantseva O, Strakevich E, Malinovskaya E, Litvyakov N, et al.** Folate-metabolizing genes and breast cancer risk. *Meditinskaya genetika* 2009;1:31-37 [in Russian].
 38. **Yu C, Wu M, Chou Y, Yang T, You S, Chen C, et al.** Breast cancer risk associated with multigenotypic polymorphisms in folate-metabolizing genes: a nested case-control study in Taiwan. *Anticancer Res* 2007;27(3B):1727-1732.
-