Chirurgia (2010) 105: 373-378
Nr. 3, Mai - Iunie
Copyright© Celsius

Relaţia mutaţiilor *C677T* şi *A1298C* ale genei *MTHFR* cu elemente de prognostic terapeutic în cancerul colorectal

G. Osian[1], L. Procopciuc[2], L. Vlad[1], T. Mocan[3], P.G. Cristea[1]

[1]Clinica Chirurgie 3, UMF "Iuliu Haţieganu" Cluj-Napoca
[2]Catedra Biochimie, UMF "Iuliu Haţieganu" Cluj-Napoca
[3]Catedra Fiziologie, UMF "Iuliu Haţieganu" Cluj-Napoca

Rezumat

Polimorfismul genei *MTHFR* poate influenţa riscul pacienţilor de a dezvolta un cancer colorectal. Scopul acestui studiu este să determine relaţia dintre mutaţiile acestei gene şi unele aspecte legate de practica chirurgicală: rezecabilitatea tumorală, recidiva tumorală şi intervalul liber de boală. Au fost selectaţi randomizat 69 de pacienţi cu cancer colorectal operaţi în Clinica Chirurgie 3 Cluj-Napoca în intervalul octombrie 2003 - mai 2005. S-au analizat corelaţiile dintre mutaţiile *C677T* şi *A1298C* şi factorii de prognostic menţionaţi. Rezultatele obţinute indică că prezenţa mutaţiei *C677T* aduce un risc crescut de nerezecabilitate (OR=3,5, p=0,099), pe când în cazul mutaţiei *A1298C* nu există diferenţe în ceea ce priveşte rezecabilitatea (OR=1,1). În cazul mutaţiei *A1298C* există o creştere majoră a riscului de recidivă (OR=3,063), dar în grupul cu mutaţia *C677T* există numai o mică creştere, nesemnificativă statistic (OR=1,196). Atât pacienţii care prezintă mutaţia *C677T* cât şi cei cu genotip sălbatic *1298AA* prezintă recidive mai precoce decât celelalte grupuri, deci un interval liber de boală mai scurt (HR=0.9458 respectiv 3.1070). Pacienţii cu mutaţia *A1298C* au mai frecvent recidive nerezecabile. În concluzie, mutaţiile genei *MTHFR* sunt un factor de prognostic pentru tratamentul şi evoluţia pacienţilor cu CRC.

Cuvinte cheie: *MTHFR*, cancer colorectal sporadic, rezecabilitate, interval liber de boală

Abstract

The correlations between the C677T and A1298C mutations of the MTHFR gene and therapeutic prognostic elements in colorectal cancer

The *MTHFR* gene polymorphism may influence the risk of developing sporadic CRC. The aim of this study is to assess the relationship between the mutations of this gene and certain aspects of the surgical practice: the tumoral resectability, the tumoral recurrence and the disease-free interval. 69 patients with sporadic colorectal cancer that underwent surgery at the 3rd Surgery Department of Cluj-Napoca between October 2003 – May 2005 were randomly selected. The correlations between the *C677T*, *A1298C* mutations and the prognostic factors mentioned above were analyzed. The results show that the *C677T* mutation increases the risk of non-resectability (OR=3,5, p=0,099), while the *A1298C* mutation does not (OR=1,1). For the *A1298C* mutation there is a major risk of recurrence (OR=3,063), but in the group with *C677T* mutation there is only a small increase of the risk, non-significant statistically (OR=1,196). Both the groups with the *C677T* mutation and the "wild" genotype *1298AA* have more precocious recurrences then the other groups, so a shorter disease-free interval (HR=0.9458 respectively 3.1070). The patients with the *A1298C* mutations have more often non-resectable recurrences. In conclusion, the mutations of the *MTHFR* gene are a prognostic factor for the treatment and evolution of patients with CRC.

Key words: MTHFR, sporadic CRC, resectability, disease-free interval

Corespondenţă: Gelu Osian
Str. Croitorilor nr. 19-21, Cluj-Napoca
Tel. 0264-432022
E-mail: geluosian@yahoo.com

Introducere

Progresele geneticii şi ale biologiei moleculare au permis o nouă înţelegere a genezei cancerelor colonului şi rectului, cu implicaţii directe în diagnosticul precoce şi tratamentul multifactorial al acestor afecţiuni.

În cursul vieţii, sub acţiunea unor factori oncogeni, ADN-ul celular suferă mutaţii succesive care duc la alterări ale structurii sale (1). Sumarea unui număr de mutaţii poate duce în final la izolarea unei clone de celule maligne care are un avantaj de creştere faţă de celelate celule.

Metilentetrahidrofolatreductaza (*MTHFR*) catalizează reacţia ce stabileşte echilibrul dintre 5,10 metilentetrahidrofolat (5,10 metilen THF) şi metiltetrahidrofolat (metil-THF). 5,10 metilen THF este utilizat pentru sinteza ADN iar metil-THF pentru metilarea ADN. *MTHFR* este codată de gena *MTHFR* situată pe braţul scurt al comozomului 1. Dintre multiplele mutaţii ale genei MTHFR 2 cele mai importante sunt: *C677T*, în care nucleotidul din poziţia 677, codonul 222, este modificat şi duce la înlocuirea alaninei cu valina în poziţia respectivă a enzimei şi *A1298C*, în care nucleotidul din poziţia 1298, codonul 429, este modificat şi duce la înlocuirea glutamatatului cu alanina.

Datorită variabilităţii testelor biochimice care evaluează nivelul intermediarilor din lanţul metabolismului folatului (2) identificarea genotipului reprezintă metoda cea mai exactă de evaluare a relaţiilor cu cancerul colorectal.

Studiile publicate ce analizează genotipul *MTHFR* au evaluat în principal mutaţia *C677T*. În majoritatea acestora a fost evidenţiat efectul protectiv al mutaţiei *C677T*, existând însă şi studii care au evidenţiat o creştere a riscului de apariţie a cancerului colorectal la aceşti pacienţi *(Tabelul 1)*.

Studiile mutaţiei *A1298C* au evidenţiat de asemenea efectul protectiv al acesteia, cu o reducere a riscului de apariţie al cancerului colorectal al homozigoţilor CC faţă de cei AA - valori ale OR cuprinse între 0,6 şi 0,8 (10-11).

În concluzie studiile efectuate până în prezent au evidenţiat efectul protectiv al mutaţiei *677CC* faţă de apariţia cancerului colorectal, dispariţia acestui efect fiind constatată la pacienţii cu aport insuficient de folat. Mutaţia *A1298C* are efecte similare dar mai reduse. Mecanismele prin care acţionează aceste mutaţii sunt hipometilarea şi alterarea sintezei ADN. Nu există studii concludente asupra efectului prognostic al polimorfismului genei *MTHFR*.

Am publicat anterior rezultatele noastre în ceea ce priveşte rolul mutaţiilor *C677T* şi *A1298C* ca şi factori de risc pentru cancerul colorectal (12). Dorim să stabilim impactul acestor mutaţii asupra unor aspecte legate de practica chirurgicală: rezecabilitatea tumorală, recidiva tumorală şi intervalul liber de boală.

Pornind de la premiza teoretică că indivizii care prezintă cel puţin o alelă mutantă au o activitate a enzimei *MTHFR* redusă şi un nivel redus al metilării, respectiv sintezei-reparării AND, şi ca urmare sunt supuşi la un risc mai mare de apariţie a cancerului colorectal, dorim să studiem relaţia mutaţiilor *C677T* şi *A1298C* ale genei *MTHFR* cu rezecabilitatea tumorală, apariţia recidivei tumorale, intervalul liber de boală precum şi rezecabilitatea recidivei.

Tabel 1. *Riscul de apariţie al cancerului colorectal la pacienţii cu genotip MTHFR 677TT - date din literatură*

Autor	Cazuri CCR	Control	OR
Ma 1997 (3)	202	326	0,58
Chen 1998 (4)	258	713	1,44
Park 1999 (5)	200	460	0,81
Slattery 1999 (6)	1467	1816	0,83
Ulrich 1999 (7)	527	645	0,80
Levine 2000 (8)	471	510	1,09
Marugame 2000 (9)	205	220	1,24

Material şi Metodă

Selecţia pacienţilor

Populaţia studiată, etnici caucazieni din zona Transilvaniei, este omogenă şi are o dietă săracă în folaţi.

Am studiat un lot de 69 pacienţi cu cancer colorectal sporadic, operaţi în Clinica Chirurgie 3 Cluj în intervalul octombrie 2003 - mai 2005. Selecţia cazurilor s-a făcut randomizat. Criteriile de selecţie au fost confirmarea histologică a cancerului colorectal şi intervenţia chirurgicală în Clinica Chirurgie III. Criteriile de excludere au fost antecedentele personale sau heredocolaterale de polipoză adenomatoasă familială, cancer ereditar non-polipozic sau antecedente de boală inflamatorie intestinală. Datele au fost colectate prospectiv şi retrospectiv. Am întocmit o fişă de urmărire a acestor cazuri în care am consemnat date legate de afecţiunea de bază. Datele au fost colectate de către medici rezidenţi special instruiţi, care simultan cu recoltarea probelor biologice au solicitat consimţământ informat scris al pacienţilor studiaţi. Datele apărute pe parcurs: rezultatele histopatologice, stadializarea, evoluţia postoperatorie, rezultatele tipizării genetice, etc. au fost completate odată ce au fost eliberate. Selectarea pacienţilor, culegerea şi selectarea datelor au fost supravegheate şi aprobate de Comisia de Etică a Universităţii de Medicină şi Farmacie "Iuliu Haţieganu" Cluj-Napoca. Am încheiat studiul la data de 15 martie 2008. La această dată am evaluat supravieţuirea tuturor cazurilor studiate.

Intervenţiile chirurgicale au fost efectuate în Clinica Chirurgie 3 Cluj-Napoca. Colonoscopiile au fost efectuate în Departamentul de Endoscopie Digestivă a Clinicii Medicală 3 Cluj-Napoca. Examenele histopatologice au fost efectuate în Departamentul de Anatomie Patologică a Spitalului Clinic de Urgenţă "Prof. Dr. Octavian Fodor" Cluj-Napoca. Identificarea mutaţiilor genei *MTHFR* s-a efectuat la Catedra de Biochimie a Universităţii de Medicină şi Farmacie "Iuliu Haţieganu" Cluj.

Recoltarea probelor. Extragerea ADN. Identificarea variaţiilor genei MTHFR

S-au recoltat probe de sânge periferic de la toţi pacienţii în

tuburi vacutainer conținând EDTA. Acestea au fost stocate la -20°C. Extragerea ADN s-a făcut din leucocitele din sângele periferic, utilizând metoda lui Lahiri (13). Întreaga metodologie utilizată am publicat-o anterior în alte studii legate de polimorfismul *MTHFR* (12, 14).

Polimorfismul *C677T* localizat în exonul 4 al genei *MTHFR* a fost examinat prin amplificarea ADN-ului genomic prin PCR şi digestie enzimatică cu endonucleaza de restricție a fragmentului amplificat (tehnica PCR- RFLP) (primerul sens a avut secvența: 5'- ACCCACAGAAAATGATGCCCAG-3'; primerul antisens a avut secvența: 5'- TGCCCCATTATT-TAGCCAGGAG-3') (Sigma Genosys).

Polimorfismul A1298C localizat în exonul 7 al genei *MTHFR* a fost examinat prin amplificarea ADN-ului genomic prin PCR şi digestie enzimatică cu endonucleaza de restricție a fragmentului amplificat (tehnica PCR- RFLP) (primerul sens a avut secvența: 5'- CACTTTGTGACCATTCCGGTTT-3'; primerul antisens a avut secvența: 5'- CTTTGGGGAGCT-GAAGGACTA-3') (Sigma Genosys).

Tabelul 2. *Caracteristicile loturilor studiate*

Caracteristici	**Cazuri (N=69)**
Localizarea tumorii	
Colon drept nr (%)	13 (18.84%)
Colon stâng, nr. (%)	27 (39.13%)
Colon transvers, nr (%)	5 (7.24%)
Rect, nr. (%)	24 (34.78%)
Vârstă (ani)	
50- 59, nr (%)	25 (34,28%)
60- 69, nr (%)	21 (30%)
> 70 ani, nr (%)	25 (35,71)
Vârstă (ani) ±*DS*	
Mediană	65,78 ± 9,55 (64,5)
Sex	
Femei, nr (%)	34 (49.27%)
Bărbați, nr (%)	35 (50.72%)

Analiza statistică

Statistica descriptivă

Statistica descriptivă este reprezentată prin calculul indicilor de dispersie şi centralitate: medie, mediană, deviație standard, etc. pentru variabilele numerice, precum şi prin calculul tabelelor de frecvențe pentru variabilele de tip calitativ. De asemenea s-a utilizat calculul tabelelor de contingență pentru exprimarea ponderii mutațiilor analizate în relație cu diverse variabile calitative. Acestor tabele le corespund valori de semnificație statistică.

Statistica inferențială

Analiza variabilelor calitative s-a realizat prin testele Chi Square sau Fischer, conform criteriilor standard de conformitate cu tabelul de contingență. Pentru ambele teste valoarea prag a fost de 0.05. Evaluarea corelațiilor a fost dublată de calculul indicelui epidemiologic odds ratio (OR) şi a intervalului de confidență (IC95%), cu respectarea semnificației:

OR(IC95%) < 1 factor protectiv

OR(IC95%) = 1 factor neutru

OR(IC95%) > 1 factor de risc.

Analizele intervalului liber de boală s-au realizat utilizând metoda aquarială (curbe de supraviețuire scalariforme tip Kaplan-Mayer) şi incluzând calculul timpului median de supraviețuire. Comparațiile între două sau mai multe categorii s-au realizat prin intermediul Logrank test, considerând valoarea prag p<=0.05. În cazul comparării a două grupuri de pacienți, analiza s-a completat prin calculul riscului de hazard (HR) cu limitele de confidență de 95%. În interpretare s-au respectat semnificațiile:

- HR(IC95%) < 1 intervalul liber de boală este mai mic în prezența factorului studiat.
- HR(IC95%) = 1 intervalul liber de boală este egal în prezența ca si în absența factorului studiat.
- HR(IC95%) > 1 intervalul liber de boală este mai mare în prezența factorului studiat.

Rezultate

Caracteristicile loturilor studiate sunt prezentate în *Tabelul 2* (date publicate anterior)(12). Am identificat mutațiile studiate la toți cei 69 de pacienți studiați. Fecvența alelelor mutante *C677T* şi *A1298C* este prezentată în *Tabelul 3*.

Tabelul 3. *Distribuția alelelor C677T și A1298C la pacienții cu cancer colorectal*

Cazuri (N= 69)			**C677T**			**Fecvența Alelică**	
			CC (%)	**CT (%)**	**TT (%)**	**C**	**T**
			38 (55,07%)	25 (36,23%)	6 (8,70%)	0,73	0,27
A1298C	AA (%)	33 (47,82%)	17 (24,63%)	11 (15,94%)	5 (7,24%)		
	AC (%)	4 (5,81%)	19 (27,53%)	12 (17,39%)	1 (1,46%)		
	CC (%)	4 (5,81%)	2 (2,89%)	2 (2,89%)	0		
Fecvența Alelică	A	0,71					
	C	0,29					

Rezecabilitatea tumorală

Am analizat în mod special rezecabilitatea tumorală în raport cu genotipul. Rezultatele în cazul mutației C677T sunt prezentate în *Tabelul 4*. Mutația C677T are un risc crescut pentru nerezecabilitate, 29,04% dintre pacienții cu mutația prezentă în formă hetero- sau homozigotă fiind nerezecabili față de doar 10,53% dintre cei fără mutație.

Mutația A1298C nu pare a influența rezecabilitatea *(Tabelul 4)*. Procentul de pacienți cu tumori nerezecabile este aproximativ acelaşi în ambele grupe, 19,19% față de 19,45%.

Evoluția postoperatorie

Am obținut rezultate concludente cu privire la evoluția postoperatorie după externare la un număr de 54 de pacienți. Au prezentat recidive locale 9 pacienți (16,66%) *(Tabelul 5)*.

Deşi există o uşoară creştere a procentului de recidive în grupul cu mutația C677T (OR=1,19) aceasta nu are semnificație majoră statistică. În cazul mutației A1298C există o creştere majoră a riscului de recidivă la pacienții cu mutația prezentă (OR=3,063) dar şi de această dată nu am obținut valori semnificative statistic.

Intervalul liber de boală

Am analizat durata intervalului de timp până la apariția recidivei în cazul celor 9 pacienți cu recidivă. În *Fig. 1* este prezentată curba de interval liber de boală în cazul mutației *C677T*. Pacienții care prezintă mutația *C677T*, sub formă hetero- sau homozigotă, au tendința de a face mai precoce recidive, deci un interval liber de boală mai scurt. Valorile au fost însă sub pragul statistic. Evoluția acestor cazuri este analizată detaliat în *Tabelul 6*.

În cazul mutației *A1298C* am obținut rezultate diferite, dar valorile nu au fost nici de această dată semnificative statistic (*Fig. 2*, *Tabelul 6*). Se poate observa că pacienții cu genotip sălbatic AA prezintă recidive mai precoce.

Tabelul 4. *Relația genotipurilor C677T și A1298C cu rezecabilitatea tumorală*

Genotip	Rezecabil	Nerezecabil	OR, 95% IC	p
C677C	34 (89,47%)	4 (10,53%)	3,5[0,9-12,7]	0.099
C677T+ T677T	22 (70,96%)	9 (29,04%)		
A1298A	27 (81,81%)	6 (19,19%)	1,1[0,3-3,6]	0.861
A1298C+ C1298C	29 (80,55%)	7 (19,45%)		

Tabelul 5. *Relația genotip C677T, A1298C – recidivă tumorală*

Genotip	Recidivă (-)	Recidivă (+)	OR, 95% IC	p
C677C	22 (48,9%)	4 (44,4%)	-	-
C677T+ T677T	23 (51,1%)	5 (55,6%)	1,196 [0,284-5,041]	1,0
A1298A	21 (46,7%)	2 (22,2%)	-	-
A1298C+ C1298C	24 (53,3%)	7 (77,8%)	3,063 [0.284-5.041]	0,273

Rezecabilitatea recidivelor

Analiza rezecabilității recidivelor arată o rezecabilitate globală de 44%, 4 cazuri din 9. Nu am constatat o legătură semnificativă statistic cu genotipul *MTHFR* din acest punct de vedere. Datele privind rezecablitatea recidivelor sunt prezentate în *Tabelul 7*. Se poate observa că pacienții cu mutația *C677T* prezentă au o rezecabilitate redusă a recidivelor, şi pacienții cu mutația *A1298C* prezentă au mai frecvent recidive nerezecabile.

Discuții

Mecanismele metilării ADN sunt frecvent alterate în procesul de carcinogeneză. Polimorfismul *MTHFR* joacă un rol important în acest mecanism.

În literatura de specialitate nu există studii sistematice ale asocierii genotipului *MTHFR* cu rezecabilitatea. După

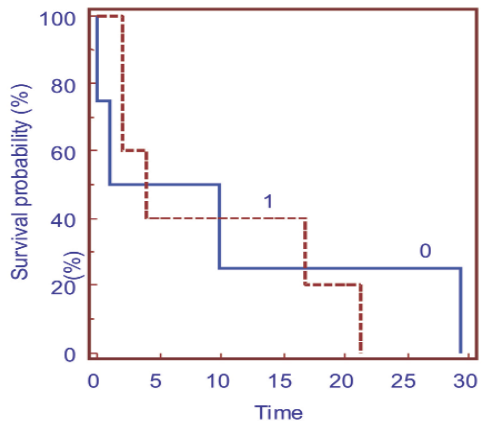


Figura 1. *Relația mutației C677T cu intervalul liber de boală la pacienții cu recidivă tumorală; în figură, 0= CC, 1= CT/TT*

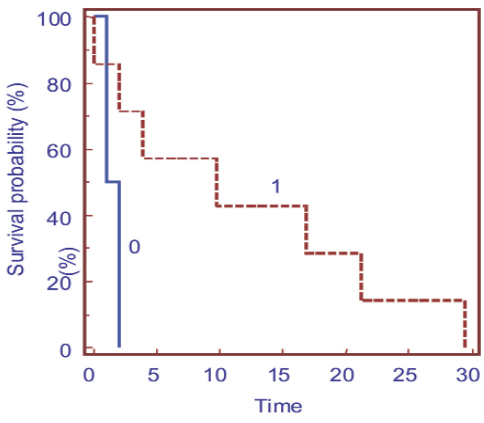


Figura 2. *Relația mutației A1298C cu intervalul liber de boală la pacienții cu recidivă tumorală; în figură, 0= AA, 1= AC/CC*

Tabelul 6. *Relația mutațiilor C677T și A1298C cu intervalul liber de boală la pacienții cu recidivă tumorală (9 cazuri)*

Genotip	Interval liber de boală						Chi-Sq	HR	95% CI	Significance
	1 lună	2 luni	4 luni	10 luni	16 luni	30 luni				
C677C	0.500 (0.250)	0.500 (0.250)	0.500 (0.250)	0.250 (0.217)	0.250 (0.217)	0.000 (0.000)	0.0086	0.9458	0.2150 to 4.0469	P = 0.9259
C677T+ T677T	-	0.600 0.219)	0.400 (0.219)	0.400 (0.219)	0.200 (0.179)	0.000 (0.000)				
A1298A	0.500 (0.354)	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)	2.7333	3.1070	0.6648 to 122.6677	P = 0.0983
A1298C+ C1298C	0.857 (0.132)	0.714 (0.171)	0.571 (0.187)	0.429 (0.187)	0.286 (0.171)	0.000 (0.000)				

Tabelul 7. *Relația genotip C677T, A1298C – rezecabilitatea recidivei tumorale*

Genotip	Rezecabilitate Recidivă (-)	Rezecabilitate Recidivă (+)	OR, 95% IC	p
C677C	1 (20%)	3 (75%)	-	-
C677T+ T677T	4 (80%)	1 (25%)	0,083 [0,004-1,945]	0,206
A1298A	0	2 (50%)	-	-
A1298C+ C1298C	5 (100%)	2 (50%)	-	0,167

cunoştinţele noastre acesta este primul studiu din această literatură care evaluează impactul mutațiilor *MTHFR* asupra rezecabilității tumorale şi a apariției recidivelor în cancerul colorectal.

Fără a obține rezultate semnificative statistic am evidențiat o relație cu rezecabilitatea tumorală, element de importanță primordială în prognosticul cancerului colorectal. Astfel prezența mutației *C677T* aduce un risc crescut de nerezecabilitate cu p=0,099 (pentru 677CT/TT vs. 677CC), aproape de limita semnificației statistice.

În cazul mutației *A1298C* nu există diferențe în ceea ce priveşte rezecabilitatea în funcție de genotip, p=0,861 (pentru 1298AC/CC vs. 1298AA).

Un element major în evoluția cazurilor a fost apariția recidivei tumorale, pe care am întâlnit-o în 16,66% din cazuri. Deşi există o uşoară creştere a procentului de recidive în grupul cu mutația *C677T* (OR=1,19) aceasta nu are semnificație majoră statistică. În cazul mutației A1298C există o creştere majoră a riscului de recidivă la pacienții cu mutația prezentă (OR=3,063).

Nici din punct de vedere al intervalului la care apare recidiva nu am obținut valori semnificative statistic. Pacienții care prezintă mutația *C677T*, sub formă hetero- sau homozigotă, au tendința de a face mai precoce recidive, deci un interval liber de boală mai scurt (HR=0,9458). Pacienții cu genotip sălbatic 1298AA prezintă recidive mai precoce decât cei cu mutații, deci un interval liber de boală mai scurt (HR=3,1070).

Din punct de vedere al rezecabilității recidivelor prezența ambelor mutații are un efect negativ, scăzând mult rezecabilitatea, OR=0,083 în cazul mutației *C677T*. Pacienții cu mutația *A1298C* (AC/CC) au mai frecvent recidive nerezecabile. Valorile obținute nu au fost însă semnificative statistic.

Suntem conştienți de limitările studiului nostru, în special în privința numărului de cazuri. Mărimea eşantionului prezentat poate induce scăderi parțiale ale puterii analizei statistice.

Mulțumiri

Acest studiu a fost finanțat în cea mai mare parte printr-un grant VIASAN, cod VIASAN 363, director de proiect dr. Lucia Procopciuc.

Bibliografie

1. Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD. Destabilisation of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutation affecting DNA mismatch repair. Nature. 1993;365(6443):274-6. Erratum in: Nature 1994;368(6471);569. Comment in: Nature. 1993; 365(6443):207-8.
2. Molloy AM, Mills JL, Kirke PN, Whitehead AS, Weir DG, Scott JM. Whole-blood folate values in subjects with different methylenetetrahydrofolate reductase genotypes: differences between the radioassay and microbiological assays. Clin Chem. 1998;44(1):186-8.
3. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphysm, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. Cancer Res. 1997;57(6):1098-102.
4. Chen J, Giovannucci E, Hankinson SE, Ma J, Willett WC, Spiegelman D, et al. A prospective study of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase gene polymorphisms, and risk of colorectal adenoma. Carcinogenesis. 1998;19(12):2129-32.
5. Park KS, Mok JW, Kim JC. The 677C > T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and colorectal cancer risk. Genet Test. 1999;3(2):233-6.
6. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1999;8(6):513-8.
7. Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, Bostick R, et al. Colorectal adenomas and the C677T MTHFR polymorphism: evidence for gene-enviroment interaction? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1999; 8(8):659-68.
8. Levine AJ, Siegmund KD, Ervin CM, Diep A, Lee ER, Frankl

HD, Haile RW. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T polymorphism and distal colorectal adenoma risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000;9(7):657-63.
9. Marugame T, Tsuji E, Inoue H, Shinomiya S, Kiyohara C, Onuma K, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and risk of colorectal adenomas. Cancer Lett. 2000;151(2):181-6.
10. Le Marchand L, Donlon T, Hankin JH, Kolonel LN, Wilkens LR, Seifried A. B-vitamin intake, metabolic genes, and colorectal cancer risk (United States). Cancer Causes Control. 2002;13(3):239-48.
11. Keku T, Millikan R, Worley K, Winkel S, Eaton A, Biscocho L, et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in African Americans and whites. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002;11(12):1611-21.
12. Osian G, Procopciuc L, Vlad L. MTHFR polymorphisms as prognostic factors in sporadic colorectal cancer. J Gastrointestin Liver Dis. 2007;16(3):251-6.
13. Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. A rapid non- enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Res. 1991;19(19):5444.
14. Osian G, Procopciuc L, Vlad L, Iancu C, Mocan T, Mocan L. C677T and A1298C mutations in the MTHFR gene and survival in colorectal cancer. J Gastrointestin Liver Dis. 2009;18(4):455-60.